



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CAMPECHE

POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN
EL TRÓPICO

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL JITOMATE
RIÑÓN O ROSAPA´AK (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) UN ECOTIPO NATIVO
DE CAMPECHE**

EDGAR ENRIQUE MATOS CANUL

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN, CAMPECHE

2017

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS
REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el(la) que suscribe Edgar Enrique Matos Canul, Alumno(a) de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. José Humberto Caamal Velázquez , por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Caracterización morfológica y molecular del jitomate Riñón o Rosapa'ak (*Solanum lycopersicum*) un ecotipo nativo de Campeche y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y El que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Sihochac, Champotón, Campeche a de 03 de enero de 2018.



Edgar Enrique Matos Canul

Firma



Dr. José Humberto Caamal Velázquez
Vo.Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada **Caracterización morfológica y molecular del jitomate Riñón o rosapa'ak (*Solanum lycopersicum*) un ecotipo nativo de Campeche**, realizado por el alumno Edgar Enrique Matos Canul, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. JOSÉ HUMBERTO CAAMAL VELÁZQUEZ

ASESOR

DR. JUAN FLORENCIO GÓMEZ LEYVA

ASESOR

DR. ALFREDO SÁNCHEZ VILLARREAL

ASESOR

DR. CATARINO ÁVILA RESÉNDIZ

Sihochac, Champotón, Campeche 04 de Diciembre 2017

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL JITOMATE RIÑÓN O ROSAPA'AK (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) UN ECOTIPO NATIVO DE CAMPECHE
Edgar Enrique Matos Canul, M.C.

Colegio de Postgraduados 2017

Resumen

Una de las aportaciones vegetales más importantes de México es el jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), a nivel mundial se cultivada 5 023 810 de hectáreas y se produce más de 170 millones de toneladas que se consumen en casi todos los países del mundo. En las comunidades rurales del norte del estado de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, se cultiva un jitomate de aspecto arriñonado, el cual es muy valorado en la cocina tradicional y posee mayor tolerancia a plagas y enfermedades, según observaciones de los agricultores. Sin embargo, los productores prefieren sembrar híbridos comerciales como el jitomate Saladet, bola, Cherry entre otros. Estas variedades han sido sometidas a un constante mejoramiento genético para aumentar el rendimiento y calidad de los productos pero paralelamente, se ha reducido la variabilidad genética. Por ello es necesario recurrir a la variabilidad presente en los parientes nativos y silvestres con el fin de identificar resistencia o tolerancia al estrés biótico, abiótico y para mejorar la calidad en los productos. En el presente trabajo, se desarrolló un protocolo para la micropropagación masiva del jitomate Riñón o Rosapa'ak y variedades comerciales. Se obtuvo más de cinco brotes por explante en medio MS suplementado con 2 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de AIA, las variedades comerciales evaluadas se comportaron de forma variable, sin embargo, se obtuvo un número de brotes similar al de las colectas tipo riñón. Por medio de marcadores

moleculares ISSR, se demostró que no existe variación somaclonal hasta el subcultivo cinco. Por otra parte, se realizó la caracterización morfológica a partir de los descriptores, propuestos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), se observó que las colectas de jitomate Riñón se comportan de forma similar en más del 85% de los descriptores morfológicos, sin embargo Mediante el uso de marcadores moleculares ISSR se identificaron dos poblaciones genéticamente diferentes, una de ellas formada por las colectas de Calkiní y Champotón y un segundo grupo integrado por la colecta característica (C-S1) y Tenabo.

Palabras clave: Variabilidad genética; cultivo *in vitro*; marcadores moleculares ISSR; Descriptores morfológicos.

Matos Canul Edgar Enrique M.C.
Colegio de Postgraduados, 2017

Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is an important vegetable contribution of Mexico, 5 023 810 hectares is cultivate and more than ~~over~~ 170 million tons is produced, it's consumed in every country in the world, a kidney-shaped tomato is cultivate in rural communities from state of Campeche, Yucatan and Quintana Roo, highly valued in typical gastronomy and it has greater tolerance to pests and sickness according farmers observations. They prefer to plant commercial hybrids like the tomato Saladet, Ball, Cherry etc. These varieties have been constantly

submit under genetic modification, purpose increasing yield and quality, unfortunately, but genetic variability decrease. Therefore, an alternative to resolve this problem, it evaluated genetic variability in native relatives. This investigation developed a protocol to massive micropropagation. This investigation developed a protocol to massive micropropagation tomato “Riñón or Rosapa’ak” and commercial varieties. More than five shoots were obtained per explant in MS medium supplemented with 2 mg / L of BAP and 0.5 mg / L of IAA, the commercial varieties evaluated behaved in a variable manner, however, a number of outbreaks was obtained similar to those of the kidney type collections. By means of ISSR molecular markers, it was demonstrated that there is no somaclonal variation until subculture 5. On the other hand, the morphological characterization was made from the descriptors, proposed by the International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV), it was observed that tomato kidney collections behave in a similar way in more than 85% of the morphological descriptors, however, through the use of ISSR molecular markers two genetically different populations were identified, one of them formed by the Calkiní and Champotón collections and a second group composed of the characteristic collection (C-S1) and Tenabo.

Keywords: Genetic variability; in vitro culture; molecular markers ISSR; Morphological descriptors.

Dedicatoria

A mi razón de sonreír y ser feliz todos los días Edgar Israel Matos Bobadilla, siempre pienso en ti hijo mío.

Al Dr. José Humberto Caamal y M.C. María Asunciona Criollo Chan, los regaños y desvelos, rindieron frutos.

A mi amigo y maestro Dr. Juan José Sandoval Gío, en las buenas y las malas, nunca dejamos de planear.

A mi madre Hassibi Verónica Canul Chablé, mi padre Raymundo Basilio Matos Cruz por guiarme siempre por el camino del bien e inducirme a cumplir mis metas.

A Luisa Rosalía Méndez Can, porque a pesar de todo creíste en mí y me ayudaste, me enseñaste a soñar y luchar por un mundo mejor.

A mis hermanos, que siempre me apoyaron aun con mis más locas ideas.

En memoria del Dr. Catarino Ávila Reséndiz "*Somos polvo de estrellas que piensa acerca de las estrellas*" Carl Sagan.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados Campus Campeche, por la oportunidad de formarme académicamente en el Programa de Bioprospección y Sustentabilidad Agrícola en el Trópico.

Al Instituto Tecnológico de Tlajomulco, en particular al Dr. Juan Florencio Gómez Leyva por darme la oportunidad de realizar una estancia y por todas las atenciones recibidas durante la misma.

A todo el personal del Colegio de Postgraduados Campeche por el apoyo para efectuar la presente investigación.

A mi consejo particular: Dr. José Humberto Caamal Velázquez, Dr. Juan Florencio Gómez Leyva, Dr. Alfredo Sánchez Villarreal y Dr. Catarino Ávila Reséndiz, por todas las recomendaciones durante el desarrollo de esta investigación.

A mis amigos José, Misael, Hilda, Gisela, Susy, Laura, Brenda, Juanito, Alma y demás compañeros, por los gratos momentos de convivencia intelectual y social.

Contenido

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 3 |
| HIPÓTESIS | 3 |
| OBJETIVOS | 3 |
| JUSTIFICACIÓN | 4 |
| LITERATURA CITADA | 4 |
| CAPITULO I. EL JITOMATE ROSAPA'AK O RIÑÓN, UN ECOTIPO NATIVO DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN | 7 |
| 1.1 Introducción..... | 7 |
| 1.2 Poblaciones de jitomate nativo de México y su caracterización | 8 |
| 1.3 El jitomate Rosapa'ak, Cultivo, Usos y costumbres en Campeche | 12 |
| 1.4 Avances sobre el rescate del tomate Riñón (RosaPa'ak) en Campeche | 13 |
| 1.5 Conclusiones..... | 15 |
| 1.6 Literatura citada..... | 16 |
| CAPÍTULO II. POTENCIAL DE MICROPROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE JITOMATE ARRIÑONADO E HÍBRIDOS COMERCIALES | 20 |
| 2.1 Introducción..... | 21 |
| 2.2 Materiales y métodos. | 22 |
| Material biológico | 22 |
| Desinfección | 22 |
| Germinación de semillas e inducción de brotes in vitro. | 23 |
| Aclimatación de brotes..... | 23 |
| Análisis de variabilidad clonal | 24 |
| Análisis estadístico..... | 25 |
| 2.3 Resultados y discusión..... | 25 |
| Fase de germinación e inducción de brotes..... | 26 |
| Análisis de variabilidad clonal | 31 |
| Conclusión. | 35 |

| | |
|--|-----------|
| Agradecimientos..... | 35 |
| 2.4 Literatura citada..... | 35 |
| CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL JITOMATE RIÑÓN UN ECOTIPO NATIVO DE CAMPECHE..... | 43 |
| 3.1 Introducción..... | 43 |
| 3.2 Materiales y Métodos | 45 |
| Material Vegetal | 45 |
| Desarrollo del cultivo..... | 45 |
| Evaluación de caracteres morfológicos..... | 46 |
| Extracción de ADN y PCR | 46 |
| Análisis..... | 48 |
| 3.3 Resultados y discusión..... | 48 |
| Caracterización morfológica..... | 48 |
| Descriptores en la planta | 48 |
| Descriptores en la hoja | 49 |
| Descriptores en flor..... | 50 |
| Descriptores en fruto..... | 51 |
| Caracterización molecular..... | 55 |
| Conclusión | 57 |
| 3.4 Literatura citada..... | 58 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES..... | 60 |
| Conclusiones..... | 60 |
| Recomendaciones..... | 61 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Trabajos de caracterización realizados en los últimos años en poblaciones nativas de jitomate | 10 |
| Tabla 2. Análisis de germinación, clorofilas totales y porcentaje de materia seca en colectas del jitomate arriñonado..... | 29 |
| Tabla 3. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la formación de brotes de tomate comercial y colectas nativas de tomate arriñonado..... | 29 |
| Tabla 4. Cebadores ISSR usados para detectar la variación somaclonal en las colectas de tomate arriñonado | 33 |
| Tabla 5. Niveles de expresión de los Caracteres para descripción armonizada. | 48 |
| Tabla 6. Descriptores en planta | 49 |
| Tabla 7. Descriptores en hoja | 50. |
| Tabla 8. Descriptores en flor | 51 |
| Tabla 9. Descriptores en fruto | 54 |
| Tabla 10. Continuación de los descriptores en fruto | 54 |
| Tabla 11. Muestras y número de carril..... | 55 |
| Tabla 12. Cebadores ISSR usados para detectar diferencias genéticas en las colectas de tomate arriñonado e híbridos comerciales..... | 56 |

LISTA DE FOTOGRAFIAS

| | |
|--|----|
| Fotografía 1. A) Germinación de las semillas en charolas de 200 cavidades. B) Aplicación de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metharidium anisopliae</i> , para prevenir plagas. C) Desarrollo del cultivo. D) Cosecha de los frutos. E) Diferentes morfologías del fruto. | 15 |
| Fotografía 2. A) Germinación de semillas para siembra en campo. B) Siembra de colecta de tomates con forma arriñonada para la obtención de semillas y | 30 |
| Fotografía 3. A) Formación de tejido calloso 25 días después de la siembra de los explantes. B) Regeneración de brotes a los 35 días después de la siembra de los explantes. C) Aumento de tamaño y diferenciación de los brotes regenerados a partir de tejido calloso a los 45 días. D) Separación de los brotes para su siembra en medio MS1/2 para enraizamiento. E) Enraizamiento de los brotes separados. F) aclimatación de las plantas previamente enraizadas..... | 31 |
| Fotografía 4. Perfil de bandeo de Marcadores ISSR en gel de agarosa al 1% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio, 1Kb: marcador de peso molecular. Carril 1,2 y 3: Subcultivos 1, 3 y 5 respectivamente de la colecta Calkiní; Carril 4: planta <i>ex vitro</i> colecta Calkiní. Carril 5, 6 y 7: Subcultivos 1, 3 y 5 respectivamente de la colecta Champotón. Carril 8: planta <i>ex vitro</i> Colecta Champotón. Carril 9, 10 y 11: subcultivos colecta seleccionada (CS-1). Carril 12: planta <i>ex vitro</i> colecta CS-1. Carril 13: <i>Rubus ideaus</i> . Carril 14: control negativo. A) cebador DYD (CT)7C y B) cebador (GA)8YG | 34 |
| Fotografía 5. Imagen en gel de agarosa 1.2% y teñido con bromuro de etidio..... | 56 |
| Fotografía 6. Dendograma realizado a partir del patrón de bandeo PCR-ISSR..... | 56 |

INTRODUCCIÓN GENERAL

En el contexto económico y agroalimentario el jitomate es una de las hortalizas de mayor importancia, a nivel mundial se cultivada una superficie de 5 023 810 ha y se produce más de 170 millones de toneladas; el principal continente productor es Asia con más de 60% de la producción global y China el país que con mayor producción (SIAP, 2016). El continente americano con alrededor del 15% de la producción mundial, es la segunda región productora de jitomate (FAOSTAT, 2016). México es el décimo productor mundial de este fruto, esta producción se concentra en cinco estados del país; Sinaloa 27.59%, Michoacán 7.04%, San Luis Potosí 9.15%, Baja California 6.74% y Zacatecas 5.72% (Atlas agroalimentario, 2017). En contraste en el estado de Campeche se sembraron 214 ha con una producción de 4 797 toneladas lo cual representa el 0.14 % de la producción total a nivel nacional que fue de 3 349 154 de Toneladas en 2016, en este mismo año, el jitomate fue el principal producto agroalimentario de exportación (SIAP, 2017). A nivel comercial, solo se cultivan híbridos como el Saladet, Bola y Cherry lo cual reduce considerablemente el cultivo de jitomates nativos y por lo tanto, la variabilidad genética (Moreno y Ramírez, 2009; Doebley *et al*, 2006). En México, existe gran variabilidad genética y morfológica en jitomates nativos distribuidos prácticamente en todo el país por factores como el clima, suelo y la presencia de grupos humanos, lo cual ha favorecido la evolución y en muchos casos la domesticación de poblaciones silvestres (Chávez *et al*, 2011). En las comunidades de origen maya del norte de Campeche y Yucatán, los campesinos cultivan un jitomate con forma arriñonada, conocido como jitomate Rosado, Riñón o Rosapa'ak (lengua maya), el cual es muy apreciado por tener sabor ácido característico, una pequeña proporción de mesocarpio y endocarpio carnosos, pero

sobre todo por poseer mayor tolerancia a plagas, enfermedades y diversos factores abióticos, según observaciones empíricas de los agricultores locales. Describir y caracterizar estas poblaciones es importante para los programas de mejoramiento actual, debido a que están adaptadas para vivir en condiciones adversas y probablemente poseen genes de tolerancia a estrés biótico y abiótico que no se encuentran en los tomates cultivados, debido a la erosión genética, resultado del proceso de domesticación o porque simplemente estos genes nunca estuvieron en las variedades ancestrales. La presente tesis está estructurada en la modalidad de capítulos. El primer apartado corresponde a la introducción, el cual incluye un párrafo introductorio, planteamiento del problema que dio origen a la investigación, los objetivos y la hipótesis planteada. En el primer capítulo se efectuó una revisión de literatura que lleva como título: El Jitomate Rosapa'ak o Riñón, un ecotipo nativo de la península de Yucatán. Los temas que aborda dan soporte teórico conceptual a la investigación. En el capítulo II se aborda una estrategia de micropropagación del cultivo de jitomate Riñón como una estrategia para generar líneas puras con las características de forma y tamaño propios de este ecotipo, así como una herramienta para su multiplicación y utilización en sistemas de mejoramiento genético en donde se involucre la utilización del ecotipo "Riñón o Rosapa'ak". En el capítulo III se muestran los resultados de la caracterización morfológica y molecular que se realizó a partir de los marcadores morfológicos propuestos por la unión Internacional para la protección de las obtenciones vegetales (UPOV) y los Marcadores moleculares Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), esto con la finalidad de caracterizar este ecotipo para futuras investigaciones y su posible registro ante diferentes instancias. Finalmente se presenta un apartado de conclusiones y recomendaciones generales en el que se

incluyen sugerencias y comentarios sobre hacia donde puede dirigirse esta investigación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La variabilidad genética ha disminuido debido al empleo de híbridos comerciales como Saladet y Bola, esta situación ha reducido el cultivo de jitomates nativos entre los productores locales. En el estado de Campeche no se aplican estrategias de conservación y recuperación de ecotipos nativos.

HIPÓTESIS

¿Es posible determinar la presencia de diferentes ecotipos entre las colectas de jitomate Rosapa'ak mediante el uso de marcadores morfológicos y moleculares?

OBJETIVOS

General

Caracterizar la diversidad morfológica y genética del jitomate Rosapa'ak que se cultiva en las comunidades mayas del estado de Campeche.

Específicos

- Caracterizar morfológicamente las plantas y frutos de jitomates Riñón colectados en los municipios del norte de Campeche.
- Cultivar y propagar *in vitro* el jitomate Riñón para la generación de líneas con las características de forma y tamaño del fruto.
- Caracterizar por medio de marcadores moleculares ISSR (inter-simple sequence repeats) las colectas de jitomate Riñón del norte del estado de Campeche.

JUSTIFICACIÓN

En México existe enorme variedad de jitomate nativos y silvestres distribuidos en diferentes condiciones ambientales en todo el país, esta situación los vuelve una fuente importante de genes de resistencia contra enfermedades, plagas y factores de estrés (Flores, 2012). En los últimos años la preferencia de comer en forma saludable ha incrementado la popularidad del jitomate por ser excelente contribuyente de nutrientes y principalmente antioxidantes (Labate *et al.*, 2007), numerosos estudios han demostrado que las variedades silvestres presentan calidad del fruto y comportamiento agronómico muchas veces superior a las variedades mejoradas (Juárez - López *et al.*, 2009). Como parte del proyecto estratégico de la MAP Champotón (Microrregión de atención prioritaria), se pretende complementar el cultivo de frutales de alta densidad con la plantación de tomate riñón y promover el uso esta variedad de gran valor ecológico, científico, social y con alto potencial comercial.

LITERATURA CITADA

- Chávez, J., Cruz, J., Vera, A., Rodríguez, E. & Lobato, R. (2011). Utilización actual y potencial del jitomate silvestre mexicano. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. 72 p.
- Doebley, J., Gaut, B. y Smith, B. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell*. 127(29):1309-1321.

FAOSTAT. (2016). Agriculture data. Recuperado el 5 de noviembre de 2016 en <http://faostat.fao.org/beta/es/#data/QC>.

Flores, I. 2012. valoración agronómica y de calidad de fruto en poblaciones nativas de jitomate mexicano. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Tesis.

Juárez-López, p., Castro-Brindis, T., Colina-león, P., Ramírez-vallejo, M., Sandoval-villa, M., Reed, I., Cisneros Zevallos, L., y King, S. 2009. Evaluación de calidad en fruto de siete genotipos nativos de jitomate (*lycopersicon esculentum* var. Cerasiforme. Revista Chapingo. Serie Horticultura. 15(2): 5-9 Universidad autónoma de Chapingo. México.

Labate, J., Grandillo, S., Fulton, T., Muñoz, S., Caceido, A., Peralta, I., Ji, Y., Chetelat, R., Scott, J., Gonzalo, D., Francis, W., Yang, E., van Der Knaab, A., Baldo, B., Smith-White L. Mueller J. Prince, N. Blanchard, D. Storey, M. Stevens M. Robbins, A. Wang, J. Liedl, B. O Connell, J. Stommel, K. Aoki, Y. Iijima, A. Slade, S. Hurst, S. Loeffler, M. Steine, D. Vafeados, C. Mcguire, C. Freeman, A. Amen, J. goodstal, D. Facciotti, J. eck, V and Causse, M. 2007. Tomato. In: Genome mapping and molecular breeding in plants. C. Kole (ed.) vegetables. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. 5:1-125.

Moreno, Y. Ramírez, P. (2009). Aprovechamiento de Poblaciones Nativas de Jitomate, como estrategia de Soberanía alimentaria. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad.
www.somas.org.mx/pdf/pdfs_libros/agriculturasostenible6/61/58.pdf

SIAP (2016). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera; Tomate rojo.

Recuperado el 6 de Septiembre de 2017 en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo>.

UPOV. (2011). DIRECTRICES PARA LA EJECUCIÓN DEL EXAMEN DE LA DISTINCIÓN, LA HOMOGENEIDAD Y LA ESTABILIDAD (*Solanum lycopersicum* L.). Recuperado el 15 de enero de 2017 en <http://www.upov.int/edocs/tgdocs/es/tg044.pdf>

CAPITULO I. EL JITOMATE ROSAPA'AK O RIÑÓN, UN ECOTIPO NATIVO DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

1.1 Introducción

El jitomate (*Solanum lycopersicum L.*) es una herbácea originaria de América del Sur, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Se cree que la domesticación fue en México y Centroamérica, sin embargo aún existen aspectos desconocidos en cuanto a su origen y domesticación (Gonzales, 2013; Rick, 1978). La palabra "Xitomatl" en lengua Nahuatl del México precolombino, es sin duda el origen del nombre moderno (Muller, 2007). Jitomate es el vocablo usado en el centro de México para este fruto, sin embargo en el sur y norte del país y en otros lugares del mundo hispano, se le denomina tomate (CONABIO, 2009). Es una de las hortalizas de mayor importancia económica en el mundo, representando una superficie cultivada de 4 762 457 Ha y una producción mayor a 164 millones de toneladas; el principal continente productor es Asia con más de 60% de la producción a nivel mundial, seguido por el continente americano con alrededor del 15% (FAOSTAT, 2016). En México se cultiva todo el año, especialmente en la zona norte del país, durante 2014 se sembraron 52 374.91 Ha con una producción de 2 875 164.08 toneladas según el Servicio de información agroalimentaria y pesquera, además, es uno de los principales productos agroalimentarios de exportación con valor promedio anual durante el periodo 2000-2009 de \$899 millones de USD (SIAP, 2014). A pesar de la importancia de este producto, el cultivo de jitomate en México, carece de variedades nativas ya que en su lugar

se utilizan cultivares comerciales híbridos. Si bien, desde Baja California hasta Yucatán se encuentra gran diversidad de jitomate silvestre conocido como tomatillo (Chávez, Cruz, Vera, Rodríguez y Lobato, 2011), también existen muchas poblaciones nativas domesticadas y semi-domesticadas con morfologías y tamaños diferentes en el fruto (alargados, tipo bola, arriñonado e intermedio). En las comunidades de origen maya del norte de Campeche y Yucatán, los campesinos cultivan un jitomate con forma arriñonada, conocido como jitomate rosado, riñón o rosapa'ak (lengua maya), el cual es muy apreciado por tener sabor ácido característico, pero sobre todo por poseer mayor tolerancia a plagas y sequías, según observaciones empíricas realizadas por los agricultores (Moo, M. comunicación personal. Junio del 2015).

1.2 Poblaciones de jitomate nativo de México y su caracterización

El jitomate pertenece a la familia de las solanáceas, la cual contiene a un gran número plantas que comúnmente se cultivan como por ejemplo el tabaco, los pimientos, la papa, el chile, entre otros (Muller, 2007). Fue por mucho tiempo clasificado como *Lycopersicon esculentum* (L.) Mill, pero actualmente mediante análisis de sitios de restricción del ADN del cloroplasto, se ha ubicado en el género *Solanum* y su especie *Solanum lycopersicum* (Spooner, Anderson y Jansen, 1993). A través de la comparación de secuencias de nucleótidos de las regiones intrónicas del gen que codifica el ADN ribosomal y la realización de análisis cladístico, se ratificó, incluir al jitomate cultivado y sus especies relacionadas dentro del género *Solanum*, sección *lycopersicum*

(Marshall, Knapp, Davey, Power, Cocking, Bennett y Cox, 2001), el cual también incluye 12 especies silvestres, la única especie domesticada es *Solanum lycopersicum* (Peralta, Knapp y Spooner, 2006). El jitomate es una herbácea dicotiledónea, diploide con 24 cromosomas, las hojas son alternas y las flores pentámeras. El sistema radicular alcanza hasta 2 metros de profundidad, con una raíz principal y muchas raíces secundarias las cuales se extienden ampliamente. El tallo es erecto, semitrepador, semileñoso, con tricomas simples y glandulares, ligeramente áspero al tacto. Las hojas tienen tamaños variables, alternas, pecioladas y con folíolos divididos, de ápice puntiagudo y con el margen aserrado o ligeramente hendido. Las flores están dispuestas en racimos, ubicados generalmente en las bifurcaciones de los tallos o los nudos, la corola es amarilla en forma de estrella de cinco a nueve puntas. El fruto de color rojo al madurar, es carnoso, jugoso y globoso o alargado. Las semillas son numerosas, circulares y de color amarillo (CONABIO, 2009; Rick, Laterrot y Philouze, 1990). En México, existe abundante variabilidad genética y morfológica en jitomates nativos distribuidos en todo el país, debido a factores como el clima, el suelo y la presencia de grupos humanos, lo cual ha favorecido la evolución y en muchos casos la domesticación de poblaciones nativas. Se han llevado a cabo extensos trabajos de caracterización de poblaciones nativas de jitomate con accesiones de varios estados del país, destacándose; Puebla, Jalisco, Nayarit, Estado de México, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Yucatán, entre otros. Estos trabajos se han realizado a partir de diferentes enfoques, como por ejemplo estudios ecológicos y geográficos, además, han determinado que las

poblaciones nativas de jitomate silvestre, semidomesticado y domesticado, se encuentran distribuidas en todo el país (Chávez *et al*, 2011; Pacheco, Chávez y Carrillo, 2014.). Por otro lado, se han elaborado caracterizaciones agromorfológicas empleando generalmente los descriptores propuestos por la Unión Internacional Para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), que miden una serie de variables durante el ciclo de vida de la planta. Estas investigaciones han permitido conocer la variabilidad existente entre poblaciones nativas de varios estados del país (Tabla 1). Completando el panorama, se han realizado algunos estudios a partir de marcadores moleculares, los empleados con mayor frecuencia son los SSR (Simple Sequence Repeat) los cuales son unidades cortas de nucleótidos que se repiten en tándem a lo largo del genoma de los organismos y que después de un proceso de amplificación por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) generan un patrón distintivo a manera de código de barra para cada especie (García, 2012).

| Título y autor del trabajo | Resultados | Conclusiones |
|---|--|---|
| Relación entre variación ecológica-orográfica y variabilidad morfológica de tomate (<i>solanum lycopersicum</i> L.) Pacheco, Chávez y Carrillo, 2014. | Las variables de mayor valor descriptivo fueron: tipo de ramificación, densidad de follaje, forma y tamaño del fruto, forma distal o terminal del fruto, color del epicarpio y forma de semilla. | Existe una amplia diversidad en plantas silvestres y cultivadas. Se encontraron patrones eco-geográficos de los sitios de colecta, determinados por la altitud, tipo de vegetación, suelo, temperatura y precipitación. |
| Diversidad agronómica y morfológica de tomates arriñonados y tipo pimiento de uso local en Puebla y | Los Jitomates cuadrados o tipo pimiento, resaltaron en tamaño del fruto, sólidos solubles y firmeza, sus | Se sugiere que los jitomates evaluados, tienen potencial para usarse como variedades o fuente de germoplasma para la |

| | | |
|---|---|--|
| <p>Oaxaca, México Bonilla, Lobato, García, Cruz, Reyes y Hernández, 2014.</p> | <p>características fueron similares al testigo comercial SUN7705.</p> | <p>mejora genética del tipo Saladet.</p> |
| <p>Variación en características de interés agronómico dentro de una población nativa de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) (Sanjuán, Ramírez, Sánchez, Livera, Sandoval, Carrillo y Perales, 2014).</p> | <p>Existe variación intrapoblacional en el número de racimos con fruto, reacción fitopatológica y uniformidad general longitud de la planta, fecha de floración, amarre de fruto y vigor.</p> | <p>Los componentes anteriores y el diámetro del tallo, explicaron el 59.7% de la variación fenotípica reportada.</p> |
| <p>Red jitomate (Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, SINAREFI, 2014)</p> | <p>Reporta 1,283 accesiones colectadas en México. 187 colectas han sido regeneradas, 117 accesiones fueron caracterizadas agromorfológicamente y 19 genotipos evaluados para resistencia a <i>P. Infestans</i>.</p> | <p>Realizaron un diagnóstico sobre el estatus del jitomate en México; la variabilidad fue muy amplia en todo el país.</p> |
| <p>Exploración, colecta y conservación de recursos genéticos de jitomate: avances en la Red de Jitomate (Lobato, Rodríguez, Carrillo, Chávez, Sánchez y Aguilar, 2012).</p> | <p>Se demostró polimorfismos en el color, forma del fruto, tamaño del fruto, peso del fruto, número de lóculos, número de frutos por racimo, longitud del racimo y color de la hoja.</p> | <p>Se muestra una amplia variabilidad entre poblaciones nativas del país.</p> |
| <p>Valoración agronómica y de calidad de fruto en poblaciones nativas de jitomate mexicano (Flores, 2012).</p> | <p>Algunas poblaciones nativas, muestran un comportamiento agronómico similar e inclusive superior al jitomate comercial (Sun-7705), en la mayoría de las variables agronómicas y de calidad del fruto.</p> | <p>Las poblaciones nativas Cam-3 y Cam-5, provenientes del estado de Campeche son candidatos potenciales para el aprovechamiento comercial. Existe alta variabilidad en calidad externa e interna del fruto.</p> |
| <p>Caracterización morfológica y molecular de 34 colectas nativas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) (García, 2012).</p> | <p>Por medio del análisis de los parámetros morfológicos, se obtuvieron 6 grupos mientras que los marcadores moleculares generaron 4 grupos, el polimorfismo fue de 71%.</p> | <p>Las agrupaciones, estuvieron muy relacionada con el lugar de origen de los materiales evaluados y el tipo de fruto, presentando un 65% de concordancia entre los agrupamientos realizados a partir de caracteres morfológicos y perfiles moleculares.</p> |
| <p>Utilización actual y</p> | <p>Se caracterizó 102</p> | <p>Se recomiendan</p> |

| | | |
|---|---|---|
| <p>potencial del jitomate silvestre mexicano (Chávez <i>et al</i>, 2011).</p> | <p>muestras poblacionales originarias de diferentes estados de México. Los cuales presentaron variación en los caracteres de planta, tallo, hoja, flor y fruto.</p> | <p>realizar más estudios para verificar esta variabilidad desde diferentes perspectivas.</p> |
| <p>Análisis de la Diversidad Genética de Tomate Silvestre (<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>) de México Mediante Microsatélites (Sánchez, Pineda, Vega, Sánchez, Chávez y López, 2011)</p> | <p>Se encontró un promedio de 5.3 alelos por locus y una diversidad genética total de 0.72 un valor alto de acuerdo al programa bioinformático Power marker.</p> | <p>Se demostró una amplia base genética en las accesiones, lo cual representa un reservorio genético con gran potencial para ser utilizado en el mejoramiento de características de interés agronómico.</p> |

Tabla 1. Trabajos de caracterización realizados en los últimos años en poblaciones nativas de jitomate.

1.3 El jitomate Rosapa'ak, Cultivo, Usos y costumbres en Campeche

Con el fin de efectuar un diagnóstico sobre la biodiversidad de plantas nativas cultivadas en la región de Campeche, se realizaron entrevistas a productores y se encontró que el cultivo del jitomate Rosapa'ak se realiza en septiembre, octubre y noviembre. Pérez (2004) menciona que el cultivo del jitomate de milpa (rosapa'ak) se efectúa en lugares poco pedregosos y separados del maíz. Los agricultores entrevistados, explicaron que en cada cosecha se eligen algunos frutos prominentes en tamaño y forma para obtener el semillero que usaran en la siguiente siembra. El cultivo se realiza simplemente depositando las semillas en el lugar que eligieron para sembrar y si las lluvias no son favorables, riegan manualmente algunas veces. De igual forma, mencionan que no realizan algún tipo de cuidado extra y que la planta se desarrolla incluso cuando la lluvia es escasa. La cosecha se realiza cuando el fruto está maduro, color rosa (de ahí el nombre rosa-pa'ak) o completamente rojo y de ser comercializado, debe ser

pronto en los mercados locales, debido a su corta vida de anaquel. Los campesinos han notado que el jitomate rosa-pa'ak, muestra mayor tolerancia a plagas como la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), uno de los vectores de virus fitopatógenos de mayor relevancia en los últimos años en las variedades comerciales cultivadas, como son el Ponny y Saladet, (Amador, Mederos y López, 2011). La cosecha concuerda con una de las mayores tradiciones de la península de Yucatán; el Hanal-Pixan (Lengua Maya) o comida de los fieles difuntos, el cual se celebra los primeros días de noviembre. Tradicionalmente en estas fechas, se acostumbra comer los pibipollos (Muk'bipollos o pib en lengua maya), tamales y otro tipo de comidas, en estos platillos se utiliza como uno de los ingredientes principales el jitomate Rosapa'ak, ya sea en forma de salsa o en el embutido de los tamales o pibipollos, también se utiliza en otros guisos propios de la región como es el pan de cazón. Algunos restauranteros entrevistados, indican que emplean este jitomate para preparar platillos regionales y que le confiere un sabor diferente a los guisos, señalan también que no se cultiva durante todo el año por lo que es difícil conseguirlo en algunas épocas, mencionan que han solicitado a productores e instituciones de investigación en ciencias agrícolas, el rescate del mencionado jitomate pues consideran que presenta un alto potencial comercial y gran valor cultural en la región.

1.4 Avances sobre el rescate del tomate Riñón (Rosapa'ak) en Campeche

El Colegio de Postgraduados Campus Campeche, tiene en uno de sus proyectos de investigación el rescate del jitomate Rosapa'ak, para lo cual

inicialmente se efectuaron colectas en el estado de Campeche, encontrándolo en las comunidades de Calkiní, Pomuch, Tenabo y Champotón. En el Municipio de Calkiní, se iniciaron los primeros trabajos para el cultivo intensivo de este ecotipo, se empleó un arreglo de 2 m entre surcos y 90 cm entre plantas, se utilizó como base de fertilización el paquete tecnológico para el cultivo de jitomate Saladette, la germinación de las semillas fue en promedio de 9 días, las plántulas se dejaron crecer por un mes en charolas de unicel de 200 cavidades y como sustrato se usó Peatmoss (Fotografía 1A). Se aplicó hongos entomopatógenos como preventivos para el control de plagas (Fotografía 1B). Posteriormente se trasplantaron a campo y se empleó un sistema de riego por goteo de 5/4 calibre 6000 con un gasto de 1.5 LPH, se utilizó un riego de auxilio de 2 horas cada 2 días en caso de no haber lluvia (Fotografía 1C). A los tres meses del trasplante, se inició la cosecha del fruto, se obtuvo una producción aproximada de 40 ton/ha (Fotografía 1D). Si bien no es comparable con una producción comercial, esta es la primera prueba de un cultivo tecnificado con este ecotipo en la región sureste. Se encontró que existen por lo menos 2 formas del fruto (Fotografía 1E), por lo que se decidió comenzar la purificación de los ecotipos utilizando herramientas Biotecnológicas. Asimismo, se observó tolerancia a mosquita blanca y virosis, la vida de anaquel fue superior a los 15 días si los frutos son cosechados en su etapa de madurez fisiológica, lo que provee indicios de su potencial como producto comercial.



Fotografía 1. A) Germinación de las semillas en charolas de 200 cavidades. B) Aplicación de *Beauveria bassiana* y *Metharidium anisopliae*, para prevenir plagas. C) Desarrollo del cultivo. D) Cosecha de los frutos. E) Diferentes morfologías del fruto.

1.5 Conclusiones

México es un país muy diverso en lo que se refiere a poblaciones nativas de jitomate silvestre, semidomesticado y domesticado. Describir y caracterizar estas poblaciones nativas, es conveniente para los programas de mejoramiento genético actuales, debido a que estas plantas, están adaptadas a condiciones adversas y probablemente poseen genes de tolerancia a estrés biótico y abiótico que no se encuentran en los jitomates cultivados, esto debido a la erosión genética como resultado del proceso de domesticación. Dentro de los primeros trabajos a realizar, se requiere la caracterización morfoagronómica de las poblaciones nativas de jitomate Riñón o Rosapa'ak en el estado de Campeche. El Colegio de postgraduados está iniciando el proceso de

micropropagación para generar “líneas puras” con las características morfoagronómicas propias de este jitomate nativo. Otro estudio que se realizará, es la caracterización a través de marcadores moleculares microsátélites (ISSR). La plantación realizada en Calkiní (Campeche), estableció las bases para el cultivo comercial de este ecotipo de jitomate, obteniéndose rendimientos de aproximadamente 40 Ton/ha y que deberán corroborarse, lo que permitirá obtener un paquete tecnológico adecuado a la región. Otro hallazgo importante fue que se evidenció que la vida de anaquel aumenta si la cosecha se realiza en la madurez fisiológica (hasta 15 días), lo que da indicios de que es un candidato potencial para el aprovechamiento comercial.

1.6 Literatura citada

Amador, R., Mederos, D. & López, M. (2011). Mosquita blanca en tomate, control actual y perspectivas. *Rev. 2000AGRO*. Vol. 66: 12 – 17.

Bonilla, O., Lobato, R., García, J., Cruz, S., Reyes, D., Hernández, E. & Hernández, A. (2014). Diversidad agronómica y morfológica de tomates arriñonados y tipo pimiento de uso local en Puebla y Oaxaca, México. *Rev. Fitotec. Mex.*, Vol. 37 (2), 129 - 139.

Chávez, J., Cruz, J., Vera, A., Rodríguez, E. & Lobato, R. (2011). Utilización actual y potencial del jitomate silvestre mexicano. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional e Instituto Tecnológico del

Valle de Oaxaca. 72 p.

CONABIO. (2009). *Lycopersicon esculentum* P. Mill. Consultado el 6 de Septiembre del 2016.

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/lycopersicon-esculentum/fichas/ficha.htm>

FAOSTAT. (2016). Agriculture data. Consultado el 5 de noviembre del 2016.

<http://faostat.fao.org/beta/es/#data/QC>

Flores, I. (2012). Valoración agronómica y de calidad de fruto en poblaciones nativas de jitomate mexicano (Tesis de Maestría). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México.

García, L. (2012). Caracterización morfológica y molecular de 34 colectas nativas de jitomate *Solanum lycopersicum* L. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Chapingo.

Gonzales, P. (2013). Geographical distribution of wild tomatos (*Solanum* L. sect. *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. Solanaceae). *Arnaldoa* 20 (2): 301 - 314

Lobato, R., Rodríguez, E., Carrillo, J., Chávez, J., Sánchez, P. & Aguilar, A. (2012). Exploración, colecta y conservación de recursos genéticos de jitomate: avances en la Red de Jitomate. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. 54 p.

Marshall, J., Knapp, S., Davey, M., Power, J., Cocking, E., Bennett, M. & Cox, A. (2001). Molecular systemic of *solanum* section *lycopersicum* (*lycopersicon*) using the nuclear ITS r DNA región. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1216-1222.

- Muller, K. (2007). The tomato and it's relatives. (online). Consultado el 6 de septiembre del 2016. Disponible en: <http://www.kdcomm.net/~tomato/tax.html>.
- Pacheco, I., Chávez, J. & Carrillo, J. (2014). Relación entre variación ecológica-orográfica y variabilidad morfológica de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Oaxaca. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 1(1), 28-39.
- Peralta I., Knapp, S. & Spooner, D. (2006). Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *TGC REPORT* 56:7-12.
- Pérez, L. (2004). La agricultura milpera de los mayas de Yucatán. Consultado el 6 septiembre del 2016, de UADY Sitio web: <http://www.mayas.uady.mx/articulos/agricultura.html#datos>.
- Rick, C., Laterrot, H. & Philouze, J. (1990). A revised key for the *Lycopersicon* species. *Tomato genetics cooperative Report* 40:31.
- Rick, C. & Yoder, J. (1978). Classical and molecular genetics of the tomato: highlights and prospects. *Annual Review Genetics* 22: 281-300.
- Sánchez, A., Pineda, K., Vega, M., Sánchez, P., Chávez, J. & López J. (2011). Análisis de la Diversidad Genética de Tomate Silvestre (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) de México Mediante Microsatélites (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Sanjuán, F., Ramírez, P., Sánchez, P., Livera, M., Sandoval, M., José C. Carrillo J. & Perales, C. (2014). Variación en características de interés agronómico dentro de una población nativa de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Rev. Fitotec. Mex.*, Vol. 37 (2): 159 – 164.

- SIAP (2014). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera; Tomate rojo. Consultado el 6 de Septiembre del 2016.
<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo>.
- SINAREFI. (2014). Red jitomate. Consultado el 6 de Septiembre del 2016.
http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_jitomate.html.
- Spooner, D., Anderson G. & Jansen R. (1993) Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes and pepinos (solanaceae).
American Journal of Botany 80 (6): 676-688.
- Vargas, D. (2016). Caracterización ecogeografía y etnobotánica, y distribución geográfica de *solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (solanaceae) en el occidente de México (Tesis de Doctorado). Universidad de Guadalajara.

CAPÍTULO II. POTENCIAL DE MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE JITOMATE ARRIÑONADO E HÍBRIDOS COMERCIALES

Resumen

El jitomate es una de las hortalizas de mayor importancia económica en el mundo, algunas variedades nativas presentan mayor tolerancia al estrés biótico y abiótico, sin embargo no son cultivadas para su comercialización formal. En la micropropagación masiva de plantas con fines comerciales o bien, para generar cultivares mejorados por medio de herramientas biotecnológicas modernas, se requiere de un sistema eficiente de micropropagación y regeneración *in vitro*, en el cual se realice la elección adecuada de los explantes y el empleo eficiente de hormonas vegetales. En la presente investigación se probaron diferentes combinaciones y concentraciones de fitohormonas (benzilaminopurina (1 y 2 mg/L), ácido indol acético (0.5 y 1 mg/L) y Kinetina a 5 mg/l), en 4 colectas de jitomate Riñón y 5 híbridos comerciales. La tasa de multiplicación máxima fue alcanzada bajo el tratamiento T5 (2 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de AIA) obteniendo un promedio de 5 brotes por explante en las colectas nativas. Las variedades comerciales evaluadas, se comportaron de forma variable, sin embargo con los tratamientos 1, 3 y 5 se obtiene un porcentaje de brotes similar al de las colectas tipo riñón. Así mismo se evaluó la variabilidad genética mediante la amplificación por PCR del polimorfismo de inter secuencias simples repetidas o ISSR de las plantas regeneradas, demostrando no haber variación somaclonal.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum* L.; hormonas vegetales; Cultivo *in vitro*;

inter secuencias simples repetidas.

2.1 Introducción

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) Es una solanácea que se cultiva en casi todos los países del trópico, es una herbácea originaria de América del Sur, posiblemente domesticado en México y Centroamérica (Gonzales, 2013; Rick, 1990). También es una de las hortalizas de mayor relevancia económica en el mundo y muy valorado por su alto valor alimenticio como fuente de vitaminas A, B₁, B₂, B₃, B₆, C, K, E y numerosas sales minerales (Karunakar, 2014). En México, se produce durante todo el año, especialmente en el norte del país, durante el 2016 se sembraron 51 861.10 ha con una producción de 3 349 154.20 ton (SIAP, 2017). Es también el principal producto agroalimentario de exportación con valor promedio anual durante el periodo 2016 de \$1 549.5 millones de USD; siendo el principal mercado, Estados Unidos y Canadá con el 95% del producto exportado (SAGARPA, 2010; Atlas Agroalimentario, 2017). Existen variedades de jitomate silvestres o nativas que presentan mayor tolerancia al estrés abiótico, así como a plagas y enfermedades, sin embargo, a nivel comercial se emplean cultivares híbridos tipo Saladet, Bola, Cherry, entre otros, para obtener alta capacidad de producción y mejor estética. Sin embargo pueden ser susceptibles a plagas y enfermedades (Florido, 2014; Chávez *et al.*, 2011; Cortéz, 2010; Rick, 1990). En la micropropagación masiva de plantas con fines comerciales o bien, para generar cultivares tolerantes al estrés biótico y abiótico por medio de herramientas biotecnológicas modernas, se requiere de un sistema eficiente

de micropropagación y regeneración *in vitro*, en el cual se realice la elección adecuada de los explantes y el empleo eficiente de hormonas vegetales (Cruz *et al.*, 2011). En jitomate se ha reportado el uso del hipocótilo, pedicelo, pedúnculo, hoja, secciones del tallo, inflorescencia y órganos reproductores como explantes para la generación de callo, brotes y plantas completas (Bhatia *et al.*, 2004). En cuanto a las hormonas vegetales, se reporta el empleo de Auxinas, Citocininas y Giberelinas de los cuales el ácido indolacético, zeatina, kinetina, bencilamilopurina, benciladenina y el ácido indolbutírico son empleados recurrentemente, en concentraciones de 0.5 a 5 mg/l. Con el fin de obtener el mayor número de brotes, se probaron diferentes combinaciones y concentraciones de fitohormonas, debido que cada variedad responde de forma distinta (Chandra, 2013; Cruz *et al.*, 2011 y Bhatia *et al.*, 2004). Así mismo se evaluó la variabilidad genética mediante la amplificación por PCR del polimorfismo de inter secuencias simples repetidas o ISSR de las plantas regeneradas. Materiales y métodos

2.2 Materiales y métodos.

Material biológico. Colectas de tomate silvestre tipo arriñonado provenientes del estado de Campeche, México, denominadas "C-S1", Tenabo (20°03'32.7"N 90°13'44.5"W), Calkiní (20°22'15.3"N 90°03'05.7"W) y Champotón (19°20'24.1"N 90°43'18.6"W). Se utilizaron también semillas de tomate tipo Saladet 'Eterno', Cherry, Bola Saladet y Micro-Tom provenientes de la colección del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.

Desinfección. Las semillas se lavaron en una solución acuosa de Tritón X-100

(Sigma, Cat. al 5% durante 5 minutos. y se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril. Posteriormente se sumergieron en etano al 70% durante 2 minutos, inmediatamente se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril por 3 minutos y se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% durante 15 min. Las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril y colocadas en papel estéril para eliminar la humedad.

Germinación de semillas e inducción de brotes *in vitro*. Las semillas asépticas, fueron germinadas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), pH 5.7, y se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ con un fotoperiodo de 16/8 h Luz/oscuridad y una intensidad lumínica de $25\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ seg}^{-1}$, durante 10 días. Para evaluar la inducción de brotes de tomate *in vitro* se seccionaron hojas cotiledonareas de las variedades en estudio. Se depositaron 6 explantes por frasco y tres repeticiones en los diferentes medios con benzilaminopurina (1 y 2 mg/L), ácido indol acético (0.5 y 1 mg/L) y Kinetina a 5 mg/l, se realizó el cambio de medio cada 20 días. A los 45 días, se separaron los brotes diferenciados y se transfirieron a medio MS a la mitad de la fuerza, para enraizar los brotes y transferirlos a etapa de aclimatación. Con el fin de determinar las características de las colectas del tomate arriñonado se realizó la cuantificación de clorofilas totales de los brotes generados utilizando el método reportado por Wellburn (1994). También se determinó el porcentaje de materia seca y se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas.

Aclimatación de brotes. Las plantas de jitomate enraizadas se establecieron en macetas con sustrato Peatmoss-agrolita (5:1) estéril, se mantuvieron a humedad relativa del 90%, y se redujo paulatinamente a condiciones

ambientales en un lapso de 15 días.

Análisis de variabilidad clonal. El ADN genómico total se aisló a partir del protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones, para lo cual se pesaron 0.3 g de tejido vegetal de hoja, cada muestra se depositó en morteros estériles, se agregó 5 mg por muestra de PVP (Polyvinylpyrrolidone) y 1 ml del buffer de extracción (Tris HCL pH 8.0, 100mM; NaCl 100mM; EDTA pH 8.0, 20mM; CTAB 2% y β -mercaptoetanol 2%), las muestras fueron maceradas y se recuperó 750 μ l del líquido en tubos para microcentrifuga estériles de 1.5 ml, se incubó a 60°C por 1 hora. Se agregó un volumen de cloroformo y se mezcló hasta formar una emulsión, posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos, enseguida se recuperó la fase acuosa en tubos estériles y se agregó 10 μ l de RNAsa A (10mg/ml). Las muestras se incubaron por 30 minutos a 37°C. A continuación, se agregó un volumen de cloroformo a cada muestra y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos y se agregó un volumen de Isopropanol frío, las muestras se incubaron a -20°C durante 20 minutos. Enseguida se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó dos veces en etanol frío al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Por último, se resuspendió la pastilla en agua libre de nucleasas y se guardó a -20°C. Se visualizó el ADN extraído en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó por espectrofotometría a 230, 260 y 280 nm (espectrofotómetro PerkinElmer, modelo Lambda XLS+).

Para realizar el análisis molecular se requirió un volumen final de 25 μ l para

cada reacción de PCR el cual estuvo compuesto por 80 ng de ADN genómico, buffer de PCR 1X (KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y MgCl_2 20mM), 200 μM de dNTP's, 1.25 unidades de *Taq* polimerasa (Thermo scientific) y 10 pmol del oligo ISSR (GA_8) RT. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Corbett modelo CG1-96 e incluyó una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, anillamiento a 46.8°C, alineamiento a 72°C por 1 minuto y extensión por 2 minutos y un alineamiento final a 72°C por 7 minutos. Los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 1 % en buffer de borato de sodio 10 mM y teñido con bromuro de etidio (10 mg/L), los geles fueron fotografiados sobre un transiluminador UV.

Análisis estadístico. Se realizó un diseño bifactorial con un arreglo completamente al azar, que consta de 5 tratamientos y dos repeticiones. Como unidad experimental se consideró un frasco con seis explantes. Los datos obtenidos de número de brotes, clorofilas totales y porcentaje de materia seca, fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey al 0.05 de probabilidad, utilizando el programa InfoStat (Versión 2016, Di Riezo et al., 2016).

2.3 Resultados y discusión

El jitomate Riñón, tomate de milpa o Rosapa'ak es una variedad nativa que se siembra en la península de Yucatán como un cultivo de traspatio o en las milpas cerca de plantaciones de maíz, este jitomate presumiblemente y bajo el conocimiento empírico de los productores, es más tolerante a plagas y

enfermedades en comparación con algunas variedades comerciales, de tal forma que en este trabajo se estableció un protocolo para la propagación *in vitro* de esta variedad de jitomate y se comparó con variedades comerciales para sentar las bases de un posible aprovechamiento comercial y como reservorio de genes para el mejoramiento genético de híbridos susceptibles.

Fase de germinación e inducción de brotes. Las semillas del tomate arriñonado fueron colectadas en el transcurso del año 2015 en los municipios de Calkiní, Tenabo y Champotón, la colecta de Calkiní fue sembrada en una parcela de 20 m² (Fotografía 2A y 2B), la primera observación fue una mezcla en la morfología de los tomates provenientes de las colectas (Fotografía 2C), por lo que se realizó una selección de semillas de jitomates arriñonados al que se le denominó colecta C-S1. Lo anterior, con el propósito de obtener plantas que produzcan jitomates con la forma y tamaño características de esta variedad nativa. De inicio se validó el porcentaje de germinación *in vitro* (Tabla 2), todas variedades y colectas presentaron más del 70% de germinación lo que las hizo viables para evaluar la tasa de micropropagación. Posteriormente, se tomaron secciones medias de hojas cotiledonareas de plántulas de 5 días, los explantes se depositaron en frascos con medio MS semisólido adicionado con diferentes concentraciones de hormonas vegetales (Tabla 3), a los 8 días se observó la formación de tejido calloso el cual aumentó de tamaño un 100% doce días después (Fotografía 3A). Esto concuerda con lo reportado por Cruz-Mendivil (2011) quien utilizando diferentes concentraciones de ácido Indolacético y Kinetina, observó; crecimiento de callos compactos y verdes en jitomate Micro-Tom, después de cuatro semana, y los primeros brotes en la

sexta semana. Se ha reportado que el uso de BAP (Benziladenina) de 1-3 mg/l, disminuye el tiempo y aumenta la frecuencia de regeneración en 3 variedades de jitomate, utilizando secciones de hoja como explante (Shah *et al.*, 2015). A los 20 días, la fase callosa se transfirió a medio MS nuevo con los mismos tratamientos de fitohormonas. Treinta días después de la siembra de explantes, se observó diferenciación celular en forma de brotes (Fotografía 3B) en los tratamientos T5 y T3. Cuatro días después, se comenzaron a observar brotes en los tratamientos T2 y T4, en el tratamiento control no hubo formación de brotes. Los brotes se dejaron crecer hasta el día 45 (Fotografía 3C), posteriormente fueron separados (Fotografía 3D) y sembrados en medio de cultivo de enraizamiento; MS a la mitad de la fuerza (Fotografía 3E). Después de 18 días en medio de enraizamiento, las plantas se sembraron en macetas con sustrato Peatmoss-agrolita (5:1) estéril, durante este proceso la tasa de supervivencia fue del 80% (Fotografía 3F). Se efectuó un análisis de la respuesta en las colectas de jitomate arriñonado ante diferentes concentraciones y combinaciones de hormonas vegetales, para tal fin se utilizaron variedades comerciales como testigos de la multiplicación (Tabla 3); entre las colectas se presentó el mejor promedio de generación de brotes con el tratamiento T5 obteniendo en promedio 5 brotes por explante, este resultado es congruente con los resultado observados en la variedades Cherry, Micro-Tom, sin embargo en reportes de otras variedades como el tomate de cascara (*Physalis ixocarpa Brot.*) se describe hasta 21 brotes por explante utilizando 1.5 mg/L de BAP y 1.5 mg/L AIA (Andrade-Rodríguez *et al.*, (2005). Manzo-González *et al.*, (1998) reporta 10 brotes por explante utilizando 3mg/L de

BAP; de la misma manera García-Osuna *et al.*, (2015) reporta que utilizando 3 mg/L de BAP se obtienen en promedio 9.5 brotes por explante en de tomate de cáscara. Por otro lado en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav. Sendt) se reporta un promedio máximo de 11.6 brotes por explante utilizando 0.5 mg/L de AIA y 3 mg/L de BAP (Criollo E, *et al.*, 2016). Por su parte, Jamous y Abu-Qaoud (2015) reportan obtener un promedio de 8.4 brotes por explante en tomate de árbol, utilizando 2.7 μ M de NAA y 9.2 μ M de KIN. En jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), Plana *et al.*, (2005) reporta obtener hasta 2.57 brotes por explante utilizando MS modificado sin reguladores de crecimiento. Asimismo, Sheeja *et al.*, (2004) obtuvo hasta 6 brotes al adicionar 2 mg/L BAP + 1 mg/L AIA en tres variedades diferentes de jitomate. Por su parte Khan *et al.*, (2006) con 1 mg/L Zeatina + 1 mg/L AIA, obtuvo en promedio 9 brotes por explante en las variedades Moneymaker, Packet, Nagina y Aroma. En secciones de hipocótilo y cotiledón, se ha reportado en promedio 8 brotes al añadir 2mg/l BAP (Chandra *et al.*, 2013). Por otro lado, Karunakar (2014) obtuvo un promedio de 8.2 brotes por explante con la combinación de 5 mg/l BAP + 0.5 mg/l AIA en embriones de jitomate var. Pusa Ruby. La respuesta de propagación vía organogénesis indirecta, es diferencial respecto a la especie y género, por lo que este trabajo reporta el primer intento de micropropagar jitomates arriñonados, nativos de Campeche. Comparando las colectas nativas con variedades comerciales, se observó un número máximo de brotes similar en todos los casos, sin embargo cada variedad respondió diferente a los tratamientos. Para la variedad Saladet y Eterno el mejor tratamiento fue T3, la variedad Cherry y Bola respondió mejor al tratamiento T1, en la variedad

Micro-Tom fue mejor el T5 al igual que en las colectas nativas (cuadro 2). Por otra parte, se realizó una caracterización somera en el que se evaluó el porcentaje de materia seca el cual nos indicó el crecimiento en masa de las colectas (Tabla 2). A nivel del aparato fotosintético reflejado en los valores de clorofilas totales, no se encontraron mediciones diferentes al comparar las colectas (Tabla 2). Estos parámetro no demuestran diferencias estadísticas significativas indicando inicialmente que las colectas presentan nula variabilidad y posiblemente se trate de una sola variedad, sin embargo esto debe ser corroborado bajo una caracterización morfológica y molecular que permita determinar si existe o no una mezcla varietal.

1

Tabla 2. Análisis de germinación, clorofilas totales y porcentaje de materia seca en colectas del jitomate arriñonado

| COLECTA | % GERMINACION DE SEMILLAS | CLOROFILAS TOTALES (µg/gPF) | % MATERIA SECA |
|-----------|---------------------------|-----------------------------|----------------|
| CALKINI | 75 | 26.82 ± 5.16 a | 9.49 ± 0.92 a |
| TENABO | 80 | 28.08 ± 5.16 a | 8.66 ± 0.92 a |
| CHAMPOTÓN | 85 | 26.49 ± 5.16 a | 9.18 ± 0.92 a |
| C-S1 | 100 | 37.85 ± 5.16 a | 9.69 ± 0.92 a |

Los datos de clorofilas totales y Porcentaje de materia seca se presentan como promedios ± EE; Valores seguidos de una letra diferente representa diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

2

Tabla 3. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la formación de brotes de tomate comercial y colectas nativas de tomate arriñonado.

| Regulador de crecimiento (mg/L) | Número de brotes/Explante | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------------------|--------------------|--|--|
| | Cultivar o Colecta | | | | | | | | | | | | |
| | Saladette | Eterno | Cherry | Bola | Micro-Tom | C-Tenabo | C-Champotón | C-Calkiní | C-S1 | | | | |
| TRAT. B A I KI | | | | | | | | | | | | | |
| CONT. A A N | | | | | | | | | | | | | |
| ROL. P | | | | | | | | | | | | | |
| T1 | 1. 0. -- | 0.0 ± 0.12 a | 0.0 ± 0.22 a | 0.0 ± 0.22 a | 0.0 ± 0.17 a | 0.0 ± 0.13 a | 0.0 ± 0.41 a | 0.0 ± 0.37 a | 0.0 ± 0.47 a | 0.0 ± 0.44 a | 0.0 ± 0.83 ± 0.5 a | | |
| T2 | 1. 1. -- | 0.0 ± 0.12 b | 0.0 ± 0.22 c | 0.0 ± 0.22 c | 0.0 ± 0.17 d | 0.0 ± 0.13 d | 0.0 ± 0.41 a | 0.0 ± 0.37 a | 0.0 ± 0.47 a | 0.0 ± 0.78 ± 1.28 ± 0.5 ab | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|----|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| T3 | 2. | 0. | -- | 4.17 ± | 5.67 ± | 3.17 ± | 0.0 ± | 3.17 ± | 0.67 ± | 1.0 ± | 1.67 ± | 2.33 ± |
| | 0 | 5 | | 0.12 d | 0.22 d | 0.22 b | 0.17 a | 0.13 b | 0.41 a | 0.37 a | 0.47 a | 0.5 b |
| T4 | 2. | 1. | -- | 0.0 ± | 1.17 ± | 5.33 ± | 0.0 ± | 4.3 ± | 1.00 ± | 0.72 ± | 1.56 ± | 1.39 ± |
| | 0 | 0 | | 0.12 a | 0.22 b | 0.22 c | 0.17 a | 0.13 c | 0.41 a | 0.37 a | 0.47 a | 0.5 ab |
| T5 | 2.0 | -- | 0. | 3.17 ± | 3.17 ± | 5.17 ± | 3.17 ± | 5.67 ± | 3.83 ± | 3.78 ± | 5.33 ± | 2.33 ± |
| | | | 5 | 0.12 c | 0.22 c | 0.22 c | 0.17 c | 0.13 d | 0.41 b | 0.37 b | 0.47 b | 0.5 c |

Los datos se presentan como promedios ± EE; Valores seguidos de una letra diferente representa diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

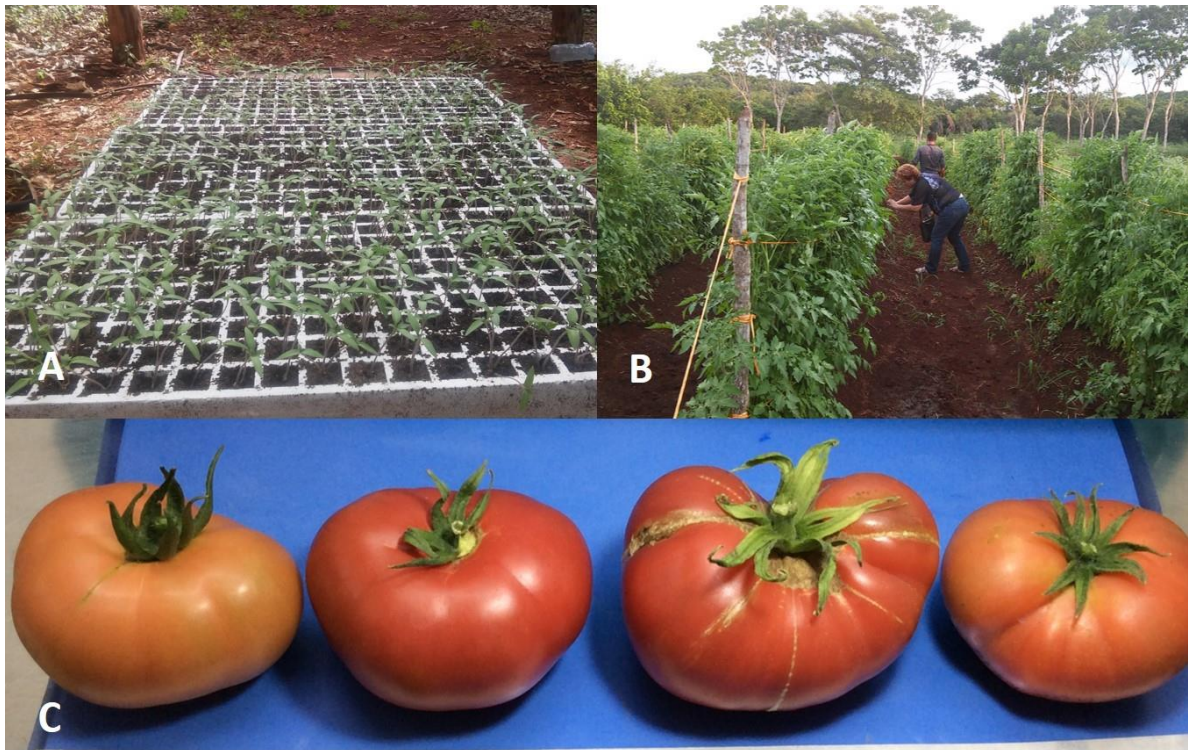


Figura 2. A) Germinación de semillas para siembra en campo. B) Siembra de colecta de tomates con forma arriñonada para la obtención de semillas y caracterización de la planta. C) Frutos de tomate arriñonado para la obtención de semillas.

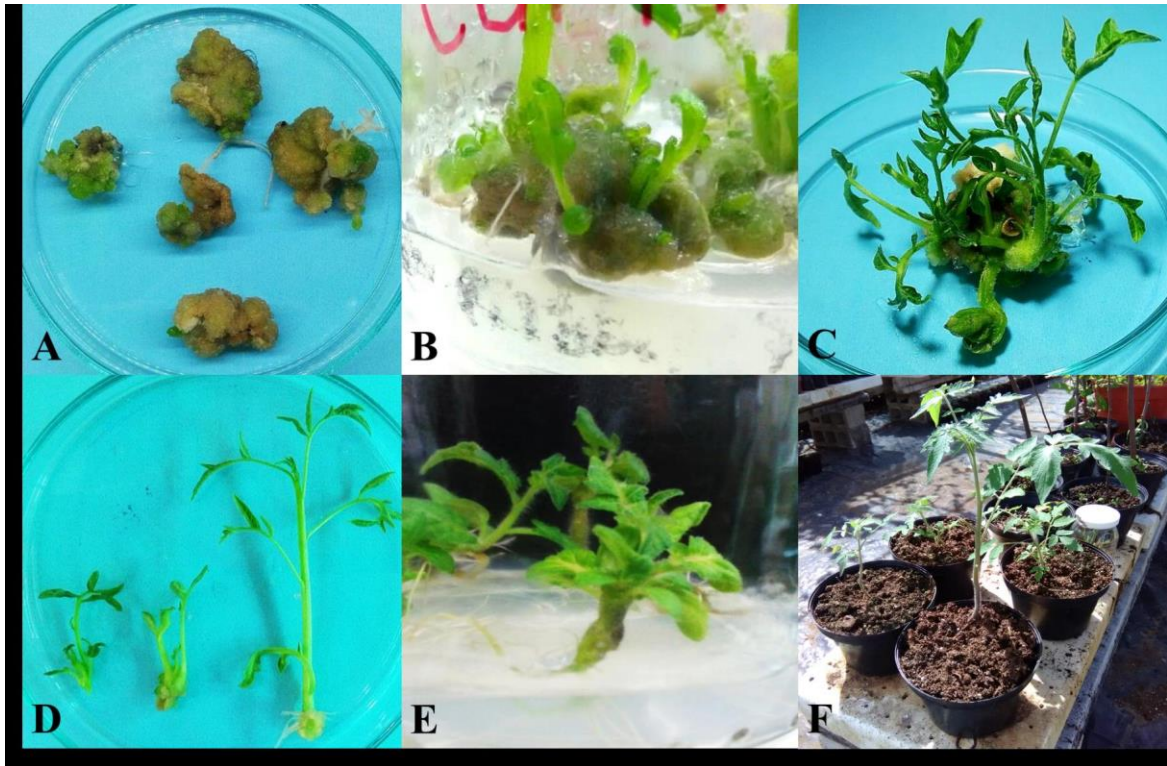


Figura 3. A) Formación de tejido calloso 25 días después de la siembra de los explantes. B) Regeneración de brotes a los 35 días después de la siembra de los explantes. C) Aumento de tamaño y diferenciación de los brotes regenerados a partir de tejido calloso a los 45 días. D) Separación de los brotes para su siembra en medio MS1/2 para enraizamiento. E) Enraizamiento de los brotes separados. F) aclimatación de las plantas previamente enraizadas

Análisis de variabilidad clonal. Para la propagación masiva comercial en biofábricas debe corroborarse la fidelidad genética o producción verdadera de clones, con los avances biotecnológicos se ha demostrado que después de determinado número de subcultivos surge variabilidad genética como consecuencia de las desdiferenciación celular que ocurre durante la micropropagación de plantas, este fenómeno llamado “variación somaclonal”,

expresa variación fenotípica y genética entre plantas propagadas clonalmente; se reporta que se debe a factores de estrés como heridas en los explantes, desequilibrios en los componentes del medio (nutrientes, reguladores y sacarosa), condiciones de iluminación, humedad o transpiración (Smulders & Klerk, 2011; Medina *et al.*, 2007). Los marcadores moleculares son usados para caracterizar variación somaclonal con gran precisión; en la presente investigación, se recurrió al uso de los marcadores moleculares ISSR, (Inter Secuencias Simples Repetidas); los cuales son unidades cortas de nucleótidos que se repiten en tándem a lo largo del genoma de los organismos y que generan un patrón distintivo a manera de código de barra para cada especie, esta técnica, ha sido utilizada en variedades de tomate (Martínez-Estrada *et al.*, 2017; Krishna *et al.*, 2016; Perera *et al.*, 2010; Rzepka, 2007). En la tabla 4 se presenta los cebadores utilizados en la detección de variación somaclonal en las colectas de tomates silvestres arriñonados. En la Fotografía 4 se muestra el perfil de bandeo de las diferentes colectas de tomate arriñonado; basados en los fragmentos amplificados ISSR; en el patrón de bandeo, se puede apreciar completa similitud en la presencia o ausencia de bandas entre los distintos subcultivos de las colectas procedentes de Calkiní y Champotón, lo cual sugiere que no existen diferencias genéticas entre ellas hasta el subcultivo 5. Por otro lado en la colecta CS-1, se observó la misma presencia y ausencia de bandeo, sin embargo en el subcultivo 5 y en el ADN *ex vitro*, se puede notar algunas bandas tenues lo cual sugiere una disminución en la integridad del ADN. El Oligo DYD(CT)7C, produjo un patrón de bandeo en el que se puede observar que las colectas procedentes de Calkiní y Champotón

son muy similares, sin embargo la colecta CS-1 es notoriamente diferente, lo cual sugiere la existencia de diferencias genéticas entre colectas. Lal *et al.* (2015) menciona que el objetivo de la micropropagación es producir clones exactamente iguales a la planta donadora, así como íntegra genéticamente; sin embargo en *Musa spp.* (Lakshmanan *et al.* 2007), *Capsicum chinense* (Bello-Bello *et al.* 2014), *Olea europaea* (Bradaï *et al.* 2016), y *Jatropha curcas* (Soares *et al.* 2016), los sistemas de regeneración presentan variación somaclonal. Recientemente, Hsie *et al.* (2015), utilizando marcadores ISSR, reporta no tener variación somaclonal en la micropropagación de dos cultivares de caña de azúcar, durante 15 subcultivos; se sugiere que la variación somaclonal depende del genotipo, así como de otros factores, incluso en la misma especie.

3

Tabla 4. Cebadores ISSR usados para detectar la variación somaclonal en las colectas de tomate arriñonado

| Oligo | Secuencia (5' – 3') | °Tm | N° de bandas | Rango (Pb) |
|--------------|----------------------------|------------|---------------------|-------------------|
| DYD (CT)7C | DYDCTCTCTCTCTCTC | 44 | 14 | 300-2000 |
| (GA)8YG | GAGAGAGAGAGAGAGAY G | 48.8 | 13 | 250-1900 |
| (GA)8C | GAGAGAGAGAGAGAGAC | 52 | 11 | 200-1500 |
| (GA)8T | GAGAGAGAGAGAGAGAT | 45.4 | 11 | 400-2000 |
| (GA)8YT | GAGAGAGAGAGAGAGAYT | 47.4 | 8 | 400-2500 |
| A(CA)7CC | ACACACACACACACACC | 52.8 | 9 | 300-1750 |
| DDB(CCA)5 | DDBCCACCACCACCA | 59 | 9 | 300-2000 |
| DBD(AC)7A | DBDACACACACACACA | 45 | 10 | 300-1400 |
| DDB(CCA)5 | DDBCCACCACCACCA | 59 | 7 | 350-1500 |
| (CA)7RT | CACACACACACACART | 54 | 8 | 300-1400 |

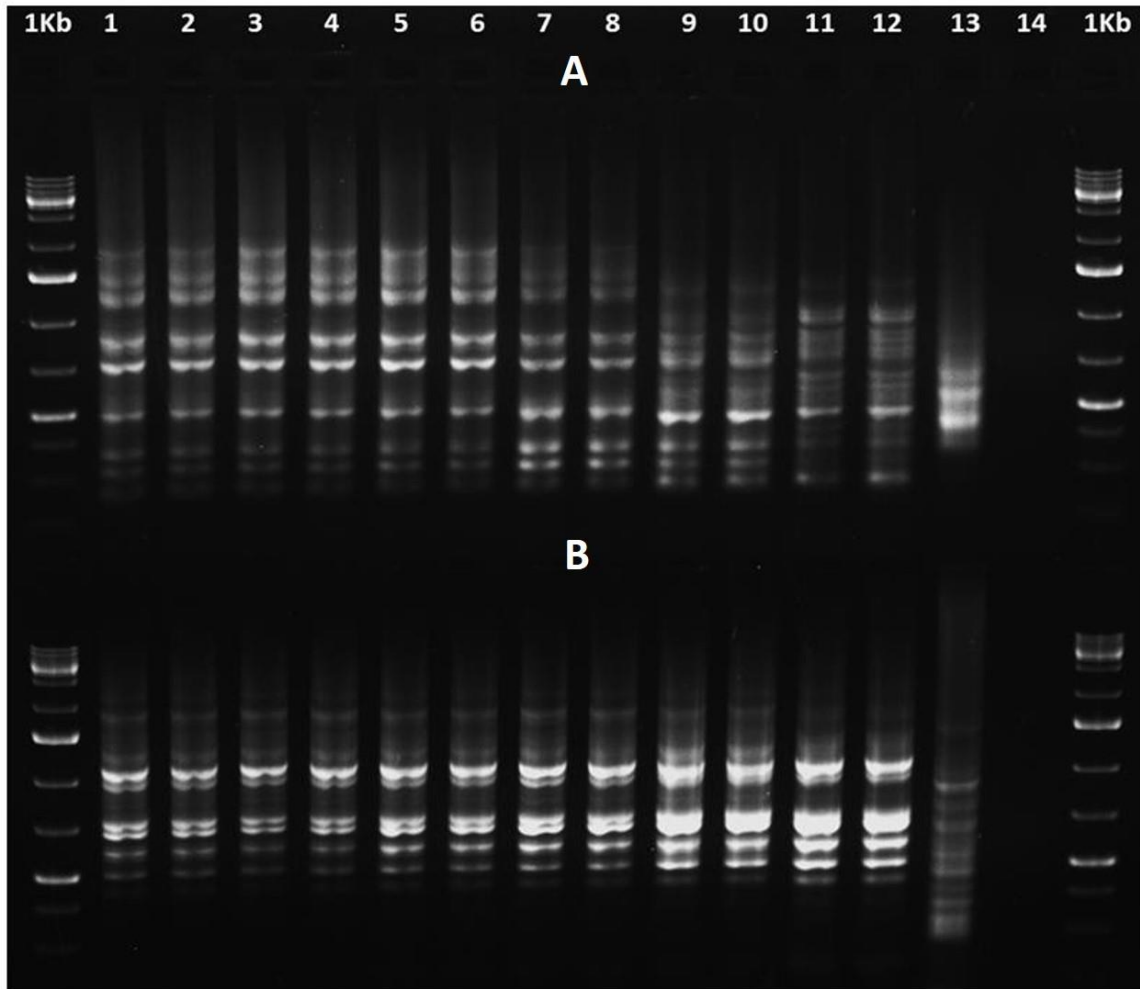


Figura 4. Perfil de bandeo de Marcadores ISSR en gel de agarosa al 1% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio, 1Kb: marcador de peso molecular. Carril 1,2 y 3: Subcultivos 1, 3 y 5 respectivamente de la colecta Calkiní; Carril 4: planta *ex vitro* colecta Calkiní. Carril 5, 6 y 7: Subcultivos 1, 3 y 5 respectivamente de la colecta Champotón. Carril 8: planta *ex vitro* Colecta Champotón. Carril 9, 10 y 11: subcultivos colecta seleccionada (CS-1). Carril 12: planta *ex vitro* colecta CS-1. Carril 13: *Rubus ideaus*. Carril 14: control negativo. A) cebador DYD (CT)7C y B) cebador (GA)8YG.

Conclusión. Las diferentes colectas de los jitomates arriñonados se comportan como una sola variedad, la tasa de multiplicación máxima fue alcanzada bajo el tratamiento T5 (2 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de AIA) obteniendo un promedio de 5 brotes por explante. Las variedades comerciales evaluadas, se comportan de forma variable, sin embargo con los tratamientos 1, 3 y 5 se obtiene un porcentaje de brotes parecido al de las colectas tipo riñón. Se demostró que después de 5 subcultivos no existe variación somaclonal lo cual nos da certeza de que las plantas obtenidas son clones fieles de los donadores. Bajo las condiciones propuestas en esta investigación, se obtuvo un protocolo de regeneración y micropropagación eficiente que puede ser utilizado para propagar masivamente jitomates tipo arriñonados de Campeche y las variedades comerciales estudiadas, el siguiente paso es el escalamiento de propagación utilizando Birreactores de inmersión temporal.

Agradecimientos. Se agradece al Colegio de postgraduados Campus Campeche, especialmente a la LGAC-CP "InnoTATS" por el recurso asignado a este proyecto y al Instituto Tecnológico de Tlajomulco por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

2.4 Literatura citada

Andrade-Rodríguez, M., López-Peralta, M., González-Hernández, V., García-Velázquez, A. & Peña-Lomelí, A. (2005). Efecto del genotipo en la micropropagación de tomate de cáscara. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11 (1), 31-37. Recuperado el 25 de noviembre de 2017 en

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912502005>.

Bello-Bello JJ, Iglesias-Andreu LG, Avilés-Viñas SA, Gómez-Uc E, Canto-Flick A, Santana-Buzzy N (2014) Somaclonal variation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as assessed ISSR molecular markers. *Hortscience* 49:481–485. Recuperado el 25 de noviembre de 2017 en <http://hortsci.ashspublications.org/content/49/4/481.full>.

Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T. & Midmore D. (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 78: 1-21, 2004. Recuperado el 24 de noviembre de 2017 en <https://link.springer.com/article/10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e>.

Chandra, I., Singh, P., Bhattacharya, A., Singh, P., Javed, S. & Singhamahapatra, A. (2013). *In vitro* callus induction, regeneration and micropropagation of *Solanum lycopersicum*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2 (12):192-197. Recuperado el 24 de noviembre de 2017 en <https://www.ijcmas.com/vol-2-12/Indrani%20Chandra,%20et%20al.pdf>.

Chávez, J., Cruz, J., Vera, A., Rodríguez, E. & Lobato, R. (2011). Utilización actual y potencial del jitomate silvestre mexicano. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. 72 p. Recuperado el 25 de noviembre de 2017 en <https://www.researchgate.net/publication/23204161>

1_Utilizacion_actual_y_potencial_del_jitomate_silvestre_mexicano.

- Cortez, H. (2010). Resistencia a insectos de tomate injertado en parientes silvestres con énfasis en *Bactericera cockerelli* Sulc. (Hemiptera: Psyllidae). *Bioagro* 22(1): 11-16.
- Criollo, H., Insuasti, K. & Delgado, W. (2016) Regeneración in vitro de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.). *Revista colombiana de ciencias hortícolas*. Vol. 10 Núm. 2. Doi: <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5750>.
- Cruz-Mendívil, A., Rivera-López, J., Germán-Báez, L. & López-Meyer, M. (2011). A Simple and Efficient Protocol for Plant Regeneration and Genetic Transformation of Tomato cv. Micro-Tom from Leaf Explants. *Hortscience*. 46 (12):1655–1660. Recuperado el 25 de noviembre de 2017 en <http://hortsci.ashspublications.org/content/46/12/1655>. Full.
- Doyle, J.J.; Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15. Recuperado el 10 de noviembre de 2016 en https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-83962-7_18.
- Di Rienzo J.A, Casanoves F, Baltazani M.G, González L, Tablada M, Robledo C.W, (2016) Infostat versión 2016. Grupo Infostat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Recuperado el 10 de noviembre de 2017 en www.infostat.com.ar.
- FAOSTAT. (2016). Agriculture data. Recuperado el 5 de noviembre de 2016 en <http://faostat.fao.org/beta/es/#data/QC>.
- Florido, M. y Bao, L. (2014). Water stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*. 35 no.3 La Habana jul.-sept. Recuperado el 20 de noviembre del 2017 en

<http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v35n3/ctr08314.pdf>.

García-Osuna, H., & Escobedo Bocardo, L., & Robledo-Torres, V., & Benavides Mendoza, A., & Ramírez Godina, F. (2015). Germinación y micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) tetraploide. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (12), 2301-2311. Recuperado el 5 de octubre de 2017 en en: <http://www.redalyc.org/pdf/2631/263143809005.pdf>.

Gonzales, P. (2013). Geographical distribution of wild tomatos (*Solanum* L. sect. *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. Solanaceae). *Arnaldoa* 20 (2): 301 – 314. Recuperado el 11 de noviembre d 2017 en <http://journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/download/125/121>.

Hsie, B., Brito, J., Vila, M., Borges-Paluch, L., Silva, M., Donato VMST. (2015). Determining the genetic stability of micropropagated sugarcane using inter-simple sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*. 14:17651–17659. DOI: 10.4238/2015.December.21.38.

Jamous Fedaa & Abu-Qaoud Hassan (2015) *In vitro* regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 16(3&4), pp.181-190. Recuperado el 11 de noviembre de 2017 en: https://www.researchgate.net/publication/282942971_In_vitro_regeneration_of_tomato_Lycopersicon_esculentum_Mill.

Khan, M., Gautam, C., Mohammad, F., Manzer H. Siddiqui, M. Naeem, M., Khan, N. (2006). Effect of Gibberellic Acid Spray on Performance of Tomato. *Turkish Journal Of Biology*. 30. 11-16. Recuperado el 18 de octubre de 2017 en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download>

?doi=10.1.1.485.4046&rep=rep1&type=pdf.

Karunakar, R. (2014). Direct regeneration from embryo cultures of *Lycopersicon esculentum* Mill cv Pusa Ruby. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 5(2): 929-933. Recuperado el 28 de octubre de 2017 en: http://www.ijpbs.net/download.php?download_file=cms/php/upload/3320_pdf.pdf&did=3320.

Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., Kishan, R. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *Biotech*. DOI: 10.1007/s13205-016-0389-7

Lakshmanan V, Reddampalli Venkataramareddy S, Neelwarne B (2007) Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 10:106–113. DOI: 10.2225/vol10-issue5-fulltext-12

Lal M, Tiwari AK, Gupta GN (2015) Commercial scale micropropagation of sugarcane: constraints and remedies. *Sugar Tech* 17:339–347. DOI 10.1007/s12355-014-0345-y

Manzo-González A.; Ledesma-Hernández A.; Villatoro-López J.C.; Alvarez-Escareño I.; Rodríguez-De la O J.L.; Peña-Lomelí A. (1998) Regeneración *in vitro* de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 4(1):45-49. Recuperado el 13 de septiembre de 2017 en <https://chapingo.mx/revistas/phpscript/download.php?file=complet o&id=MTM3Nw==>.

- Martínez-Estrada Eduardo, Caamal-Velázquez José Humberto, Salinas-Ruíz Josafhat y Bello-Bello Jericó Jabín (2017) Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9852-3>
- Medina, C., García L., Caro M., & Aristizába, F. (2007) Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. Vol. 36 (1), pp. 70-80. Recuperado el 14 de octubre de 2017 en <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/1563>.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Plana, D., & Álvarez, M., & Lara, R., & Florido, M., & Álvarez, F., & Moya, C. (2005). A NEW In Vitro REGENERATION PROTOCOL IN TOMATO (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Cultivos Tropicales*, 26 (2), 17-20. Recuperado en 25 de noviembre de 2017: <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215934003.pdf>.
- Perera, María F., García, María G., Noguera, Aldo S., Sepúlveda Tusek, Milena, Filippone, María P., & Castagnaro, Atilio P. (2010). Evaluación de la variación somaclonal en vitroplantas de caña de azúcar mediante marcadores moleculares. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 87(2), 13-21. Recuperado en 29 de noviembre de 2017, de

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30182010000200002&lng=es&tling=es.

Rzepka, D., Kulpa, D., Smolik, M., Glówka, M. (2007). Somaclonal variation in tomato *L. pennelli* and *L. peruvianum* f. *glandulosum* characterized in respect to salt tolerance. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5 (2): 194-201. Recuperado en 25 de noviembre de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/262186613_Somaclonal_variation_in_tomato_L_pennelli_and_L_peruvianum_f_glandulosum_characterized_in_respect_to_salt_tolerance.

Rick, C., Laterrot, H. & Philouze, J. (1990). A revised key for the *Lycopersicon* species. *Tomato Genetics Cooperative Report*. 40:31. Recuperado el 15 de octubre de 2015 en <http://tgc.ifas.ufl.edu/vol40/v40p31.html>.

SAGARPA (2010). Jitomate. Monografía de cultivos. Secretaria de fomento a los agronegocios. Recuperado el 5 de agosto de 2017 en <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf>.

Shah, H., Ali, S., Jan, S., Din, J. & Ali, G. (2015). Callus induction, in vitro shoot regeneration and hairy root Formation by the assessment of various plant growth regulators In tomato (*solanum lycopersicum* mill.). *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 25(2): 2015, Page: 528-538. Recuperado el 5 de noviembre de 2017 en <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-25-02/28.pdf>

Sheeja, E., Mandal, A., Rathore, R. (2004). Efficient Plantlet Regeneration in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Tissue Culture*. 14(1):45 -

53. DOI: 10.1.1.614.6372

SIAP (2014). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera; Tomate rojo. Recuperado el 6 de Septiembre de 2016 en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo>.

Smulders M. J.M. & de Klerk G.J. (2011) Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 63 (2), pp.137–146. DOI: 10.1007/s10725-010-9531-4.

Soares, D., Sattler M., da Silva, M., Praça-Fontes, M. (2016). Assessment of genetic stability in three generations of *in vitro* propagated *Jatropha curcas* L. plantlets using ISSR markers. *Tropical Plant Biology*. 9:229-238. Recuperado el 25 de noviembre de 2017 en <https://link.springer.com/article/10.1007/s12042-016-91716>.

Wellburn, A. (1994) The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Plant Physiology*, Vol. 144 (3), Pp. 307-313. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL JITOMATE RIÑÓN UN ECOTIPO NATIVO DE CAMPECHE

Resumen

Se realizó la caracterización morfológica a partir de los marcadores moleculares propuestos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), se observó que las colectas de jitomate Riñón se comportan de forma similar en más del 85% de los descriptores morfológicos, sin embargo Mediante el uso de marcadores moleculares ISSR se identificaron dos poblaciones genéticamente diferentes, una de ellas formada por las colectas de Calkiní y Champotón y un segundo grupo integrado por la colecta característica (C-S1) y Tenabo. Las variedades comerciales formaron grupos aparte, pero es notorio que los jitomates Cherry, Micro-Tom y Saladet, son más cercanos a las colectas de Calkiní y Champotón.

PALABRAS CLAVE: *Solanum lycopersicum* L., ISSR, UPOV, Caracterización,

3.1 Introducción

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es originario de América del Sur, de la región andina, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Se cree que la domesticación tuvo lugar en México y Centroamérica, sin embargo, aún existen aspectos desconocidos en cuanto a origen y domesticación (Gonzales, 2013; Rick *et al.*, 1990). Pertenece a la familia de las solanáceas, esta familia contiene a muchas de las plantas que comúnmente se cultivan; el Tabaco, los pimientos, la papa, el chile, entre otros (Muller, 2007). Fue por mucho tiempo clasificada como *Lycopersicon esculentum* (L.) Mill, pero actualmente mediante el análisis de sitios de restricción del ADN del cloroplasto, se ha ubicado como perteneciente al

género *solanum* y su especie *Solanum lycopersicum* (Spooner *et al.*, 1993). A través de la comparación de secuencias de nucleótidos de las regiones intrónicas del gen que codifica el ADN ribosomal y la realización del análisis cladístico, se ratificó, incluir al jitomate cultivado y sus especies relacionadas dentro del género *Solanum*, sección *Lycopersicum* (Marshall *et al.*, 2001), el cual también incluye a 12 especies silvestres. La única especie domesticada es *Solanum lycopersicum* (Peralta *et al.*, 2006). Es una herbácea dicotiledónea, diploide con 24 cromosomas, las hojas son alternas y las flores pentámeras. El sistema radicular puede alcanzar una profundidad de hasta 2 metros, con raíz principal y muchas raíces secundarias las cuales se extienden ampliamente. El tallo es erecto, algo trepador, semileñoso, con tricomas simples y glandulares, un poco áspero al tacto. Las hojas muestran tamaños variables, alternas, pecioladas y con foliolos divididos, de ápice puntiagudo y con el margen aserrado o ligeramente hendido. Las flores están dispuestas en racimos, ubicados generalmente en las bifurcaciones de los tallos o los nudos, la corola es amarilla en forma de estrella de cinco a nueve puntas. El fruto de color rojo al madurar es carnoso, jugoso y globoso o alargado. Las semillas son numerosas, circulares y de color amarillo (CONABIO, 2009; Rick, *et al.*, 1990). En México, existe gran variabilidad genética y morfológica en jitomates nativos distribuidos prácticamente en todo el país por factores como el clima, suelo y la presencia de grupos humanos, lo cual ha favorecido la evolución y en muchos casos la domesticación de poblaciones silvestres (Chávez *et al.*, 2011). El tomate arriñonado representa para las comunidades mayas del sureste del país identidad en platillos tradicionales pero también es un excelente acervo de genes para los programas de mejoramiento

actuales. En la presente investigación se caracterizó morfológicamente a partir de los descriptores propuestos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), cuatro colectas de jitomate tipo Riñón nativo de Campeche México y tres variedades comerciales (Saladet, Cherry amarillo y Micro-Tom). Simultáneamente se efectuó la caracterización molecular a partir de marcadores moleculares ISSR (Inter Secuencias Simples Repetidas).

3.2 Materiales y Métodos

Material Vegetal: Colectas de tomate silvestre tipo arriñonado provenientes del estado de Campeche, México, denominadas "C-S1", Tenabo (20°03'32.7"N 90°13'44.5"W), Calkiní (20°22'15.3"N 90°03'05.7"W) y Champotón (19°20'24.1"N 90°43'18.6"W). Se utilizaron también semillas de tomate tipo Saladet, Cherry amarillo y Micro-Tom provenientes de la colección del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.

Desarrollo del cultivo: Para la caracterización morfológica se cultivaron plantas de jitomate en una casa sombra con malla anti-áfidos, de una superficie 30 m² de mayo a septiembre de 2017, el ensayo fue establecido en el Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. Las semillas de cada accesión se germinaron en una charola de 200 cavidades, se utilizó Peatmoss como sustrato, a los veinte días, se realizó el trasplante a bolsas negras con aproximadamente 12 kg de una mezcla 50% tierra-50% Jal. Dos días después del trasplante, se añadió al sustrato 1.5 g por planta de urea en forma de grajeas de liberación lenta (Nitrofoska) y 3 g de "Mezcla física 18-12-18" (FYNGSA) estos fertilizantes se agregaron cada dos semanas durante todo el ciclo de cultivo. Las plantas fueron

fertilizadas también vía foliar (Biogreen) cada tres días durante todo el ciclo del cultivo. Se efectuó riego manual por la mañana y tarde, se aplicó 2 L de agua por riego en cada planta hasta los 2 meses, posteriormente se aplicó aproximadamente 5 L por riego en cada planta. Para prevenir enfermedades fúngicas, se aplicó Ridomil Gold (Syngenta) cada cinco días. Se colocaron trampas amarillas en cada esquina del cultivo para evitar la proliferación de mosquita blanca, también se aplicó cada cuatro días el insecticida Trilogy. Las plantas fueron tutoradas a los A 45 días.

Evaluación de caracteres morfológicos: La caracterización morfológica se efectuó a partir de los descriptores detallados en el documento TG/44/11 (*Solanum lycopersicum* L.) de la Unión internacional para la protección de las obtenciones vegetales (UPOV). Estas directrices tienen como finalidad medir los niveles de expresión de caracteres cualitativos, cuantitativos y pseudocualitativos, mediante mediciones u observaciones visuales en la planta, hoja, flores y frutos. Los descriptores, sirven de orientación práctica y detallada para el examen armonizado de la distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE) y producen descripciones armonizadas de variedades. En la presente investigación, se evaluaron 44 descriptores morfológicos, con los niveles de expresión predefinidos (del 1 al 9) en el documento TG/44/11.

Extracción de ADN y PCR: El ADN genómico total se aisló a partir del protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones, para lo cual se pesaron 0.3 g de tejido vegetal de hoja, cada muestra se depositó en morteros estériles, se agregó 5 mg por muestra de PVP (Polyvinylpyrrolidone) y 1 ml del buffer de extracción (Tris HCL pH 8.0, 100mM; NaCl 100mM; EDTA pH 8.0,

20mM; CTAB 2% y β -mercaptoetanol 2%), las muestras fueron maceradas y se recuperó 750 μ l del líquido en tubos para microcentrífuga estériles de 1.5 ml, se incubó a 60°C por 1 hora. Se agregó un volumen de cloroformo y se mezcló hasta formar una emulsión, posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos, enseguida se recuperó la fase acuosa en tubos estériles y se agregó 10 μ l de RNAsa A (10mg/ml). Las muestras se incubaron por 30 minutos a 37°C. A continuación, se agregó un volumen de cloroformo a cada muestra y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos y se agregó un volumen de Isopropanol frío, las muestras se incubaron a -20°C durante 20 minutos. Enseguida se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó dos veces en etanol frío al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Por último, se resuspendió la pastilla en agua libre de nucleasas y se guardó a -20°C. Se visualizó el ADN extraído en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó por espectrofotometría a 230, 260 y 280 nm (espectrofotómetro PerkinElmer, modelo Lambda XLS+).

Para realizar el análisis molecular se requirió un volumen final de 25 μ l para cada reacción de PCR el cual estuvo compuesto por 80 ng de ADN genómico, buffer de PCR 1X (KCl, (NH₄)₂SO₄ y MgCl₂ 20mM), 200 μ M de dNTP's, 1.25 unidades de Taq polimerasa (Thermo scientific) y 10 pmol del oligo ISSR (GA8) RT. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Corbett modelo CG1-96 e incluyó una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, anillamiento a 46.8°C, alineamiento a 72°C por 1 minuto y extensión por 2 minutos y un alineamiento final a 72°C por 7

minutos. Los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 1 % en buffer de borato de sodio 10 mM y teñido con bromuro de etidio (10 mg/L), los geles fueron fotografiados sobre un transiluminador UV.

Análisis: Se realizó una descripción de las colectas y las variedades comerciales caracterizadas. Para el análisis molecular, se efectuó una matriz binaria a partir del patrón de bandeo de los productos PCR-ISSR y un dendograma con el programa NTSYSpc versión 2.2, la distancia genética se calculó a partir del método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

3.3 Resultados y discusión

Caracterización morfológica: A partir de los descriptores propuestos por la UPOV, se efectuó la caracterización morfológica, se utilizaron 9 niveles de expresión (Tabla 5), según corresponde.

4

| Tabla 5. Niveles de expresión de los Caracteres para descripción armonizada. | |
|---|------|
| Nivel | Nota |
| Muy pequeño | 1 |
| Muy pequeño a pequeño | 2 |
| Pequeño | 3 |
| Pequeño a mediano | 4 |
| Mediano | 5 |
| Mediano a grande | 6 |
| grande | 7 |
| Grande a muy grande | 8 |
| Muy grande | 9 |

Descriptores en la planta: En etapa de plántula, cuatro días después de la germinación, se observó ausencia de pigmentación antociánica en todas las accesiones. Cuando las plantas tuvieron 6 semanas se pudo notar que las colectas de jitomate Riñón y Cherry amarillo, son de crecimiento indeterminado, mientras

que las variedades Micro-Tom y Saladet son de crecimiento determinado. A las 6 semanas también se observó que el jitomate Cherry amarillo presentaba una ligera pigmentación antociánica, mientras que en las demás accesiones estaba ausente. Cuando las plantas tuvieron 10 semanas, se midió la longitud de entrenudo y la altura de las plantas en las accesiones de crecimiento indeterminado, las medidas fueron muy parecidas en las colectas de jitomate Riñón, sin embargo las plantas de la Variedad Cherry amarillo fueron más altas que las colectas nativas (Tabla 6).

5

| Tabla 6. Descriptores en la planta. | | | | | |
|--|--|------------------------------|--|---|--|
| Colecta | Pigmentación antociánica del hipocótilo | Hábito de Crecimiento | Tallo: Pigmentación Antociánica | Solo variedades indeterminadas: Longitud del entrenudo en cm | Solo variedades con crecimiento indeterminado: Planta: altura en cm |
| C-S1 | Ausente | Indeterminado | Ausente | 8.85 | 106.4 |
| Tenabo | Ausente | Indeterminado | Ausente | 6.5 | 105.83 |
| Calkiní | Ausente | Indeterminado | Ausente | 7.45 | 104 |
| Champlotón | Ausente | Indeterminado | Ausente | 7.6 | 109.7 |
| Micro-Tom | Ausente | Determinado | Ausente | No aplica | No aplica |
| Cherry amarillo | Ausente | Indeterminado | Débil | 9.1 | 123.2 |
| Saladet | Ausente | Determinado | Ausente | No aplica | No aplica |

Descriptores en la hoja: Ocho semanas después de la plantación, se observó que las colectas de jitomate Riñón, la variedad Cherry amarillo y Saladet, tienen las hojas Semicolgante y solo en la variedad Micro-Tom se notaron hojas semierectas, el porte del peciolo en las colectas C-S1 y Tenabo es horizontal, sin embargo, en las colectas Calkiní y Champlotón el peciolo fue semicolgante, se observó una clara diferencia. Micro-Tom y Saladet presentaron peciolos semierectos y en Cherry amarillo fue horizontal. Durante esta época, se midió la longitud, anchura de las hojas y tamaño de los foliolos; las colectas arriñonadas y el jitomate Cherry amarillo se comportaron de forma similar, las hojas de jitomate Saladet fueron más

grandes que las dos anteriores, Micro-Tom tuvo las hojas más pequeñas. La forma de las hojas en las colectas es Bipinnada mientras que en las variedades comerciales son pinnadas. Las hojas de las colectas son de un color verde claro, las hojas de la variedad Micro-Tom y Saladet presentaron un color oscuro, mientras que la variedad Cherry amarillo fue intermedio. El brillo de las hojas de Micro-Tom y Cherry amarillo fue débil, mientras que las hojas de Saladet brillaban más, en las colectas arriñonadas el brillo fue intermedio con respecto a las dos anteriores (observaciones realizadas a las 14:00 horas, para aprovechar la luz del sol). Se notó una diferencia muy marcada en cuanto al abullonado de las colectas C-S1-Tenabo y Calkiní-Champotón, en Micro-Tom y Saladet el abullonado fue muy fuerte, en Cherry amarillo era casi imperceptible (tabla 7).

| Colecta | Porte | Longitud en Cm | Anchura en Cm | División del limbo | Tamaño de los folíolos | Hoja: intensidad del color verde | Brillo | Abullonado | Porte del peciolo de los folíolos en relación con el eje principal |
|------------------------|---------------|-----------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------------|---|---------------|-------------------|---|
| C-S1 | Semicolgan te | 24.45 | 22.7 | Bipinnada | 11 | Clara | Medio | Medio | Horizontal |
| Tenabo | Semicolgan te | 26.05 | 21.45 | Bipinnada | 10.3 | Clara | Medio | Medio | Horizontal |
| Calkiní | Semicolgan te | 23.65 | 22.1 | Bipinnada | 10.85 | Clara | Medio | Fuerte | Semicolgan te |
| Champotón | Semicolgan te | 29.3 | 23.9 | Bipinnada | 11.75 | Clara | Medio | Fuerte | Semicolgan te |
| Micro-Tom | Semierecto | 10.3 | 5.9 | Pinnada | 4.9 | Oscura | Débil | Fuerte | Semierecto |
| Cherry amarillo | Semicolgan te | 25.85 | 24.8 | Pinnada | 13,25 | Media | Débil | Débil | Horizontal |
| Saladet | Semicolgan te | 37.7 | 29.9 | Pinnada | 15.5 | Oscura | Fuerte | Fuerte | Semierecto |

Descriptores en flor: En las variedades de crecimiento determinado, se observó el número de inflorescencias en el tallo principal, en el jitomate Micro-Tom se contaron 3.1 inflorescencias en promedio a las 6 semanas, en el Saladet se pudieron observar en promedio 2.8 inflorescencias a las 8 semanas. La variedad

Micro-Tom, presento inflorescencias principalmente múltiparas, mientras que en Saladet Fue principalmente Unípara, las colectas fueron intermedias con respecto a las anteriores. En todas las accesiones el color de la flor fue amarillo, sin embargo, en el jitomate Cherry amarillo se observó una tonalidad pálida. En ninguna accesión se notó pubescencia del estilo. La variedad Saladet, no presento capa de abscisión. La longitud del pedicelo fue similar en las colectas de jitomate Riñón, la variedad Cherry amarillo tuvo pedicelos más largos y Micro-Tom muy pequeños. En jitomate Micro-Tom, la época de floración fue a los 41 días (precoz), la variedad Saladet a los 47 días (medio) y en la variedad Cherry y colectas arriñonadas fluctuó entre los 51 y 55 días, tardío con respecto a las anteriores (Tabla 8).

| Tabla 8. Descriptores en flor | | | | | | | |
|-------------------------------|--|----------------------|-------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------|
| Colecta | Número de Inflorescencias en tallo principal | Inflorescencia: tipo | Flor: Color | Flor: pubescencia del estilo | Pedúnculo: Capa de abscisión | Pedicelo: longitud en Cm | Época de floración |
| C-S1 | No aplica | Intermedia | Amarillo | Ausente | Presente | 0.55 | Tardía |
| Tenabo | No aplica | Intermedia | Amarillo | Ausente | Presente | 0.65 | Tardía |
| Calkiní | No aplica | Intermedia | Amarillo | Ausente | Presente | 0.57 | Tardía |
| Champton | No aplica | Intermedia | Amarillo | Ausente | Presente | 0.62 | Tardía |
| Micro-Tom | 3.1 | Princip. Múltipara | Amarillo | Ausente | Presente | 0.42 | Precoz |
| Cherry amarillo | No aplica | Princip. Unípara | Amarillo | Ausente | Presente | 0.87 | Tardía |
| Saladet | 2.8 | Princip. Unípara | Amarillo | Ausente | Ausente | Ausente | Media |

Descriptores en fruto: Antes de la madurez del fruto, se observó que las colectas de jitomate Riñón y la variedad Cherry amarillo, presentaron hombro verde, el tamaño del hombro verde en la accesión Cherry fue grande, mientras que en las colectas fue intermedio, también se observó la intensidad del color verde del hombro y exceptuando el hombro. Solo la variedad Cherry amarillo presentó rayas

verdes antes de la madurez. Estas anotaciones se realizaron tomando como referencia, la figura presente en la descripción del descriptor. Los frutos de Micro-Tom son muy pequeños, por otra parte, los frutos más grandes fueron los de la variedad Saladet, mientras que las colectas arriñonadas fueron de tamaño intermedio con respecto a las anteriores. Por otro lado, las colectas arriñonadas tienen forma aplanada en sección longitudinal, mientras que Micro-Tom es más bien achatada, Cherry es circular y Saladet elíptica. La relación longitud- diámetro, hizo notar que las colectas arriñonadas están comprimidas, la variedad Micro-Tom esta moderadamente comprimida y Saladet es alargado. En las colectas, el acostillado es muy fuerte, y Micro-Tom presentó un ligero acostillado, las variedades Cherry y Saladet no presentaron este carácter. El tamaño de la cicatriz pistilar, vario en las colectas de jitomate Riñón; Calkiní y Champotón tuvieron una cicatriz muy grande, en C-S1 y Tenabo esta cicatriz no fue tan grande, las variedades comerciales tuvieron una cicatriz muy pequeña (Tabla 9). El diámetro del corazón del fruto en corte transversal fue muy grande en las colectas, con respecto a las variedades comerciales. En la accesión Saladet, se notó el pericarpio grueso, el espesor del pericarpio en Cherry y Saladet fue muy delgado y en las colectas se observó intermedio con respecto a las variedades de referencia. El numero lóculos fue variado en las colectas (6 a 13), Micro-Tom y Saladet presentaron 2 o 3 lóculos y Cherry amarillo 2. Con respecto al color del fruto en la madurez, las colectas y Saladet son de color rojo, sin embargo, los ecotipos nativos presentan un color más oscuro, Micro-Tom es anaranjado y Cherry es de color amarillo. La Variedad Cherry amarillo es muy firme al tacto, Micro-Tom y Saladet son firmes y las colectas arriñonadas son un poco más suaves. Las

colectas de Calkiní y Champotón tuvieron una vida de anaquel de 12 días, las C-S1 y Tenabo fueron viables por 14 días, las variedades comerciales fueron viables entre 21 y 25 días. La época de madurez fue tardía en las colectas de jitomate Riñón, Cherry amarillo y Saladet, mientras que en Micro-Tom fue precoz (Tabla 10).

Tabla 9. Descriptores en fruto

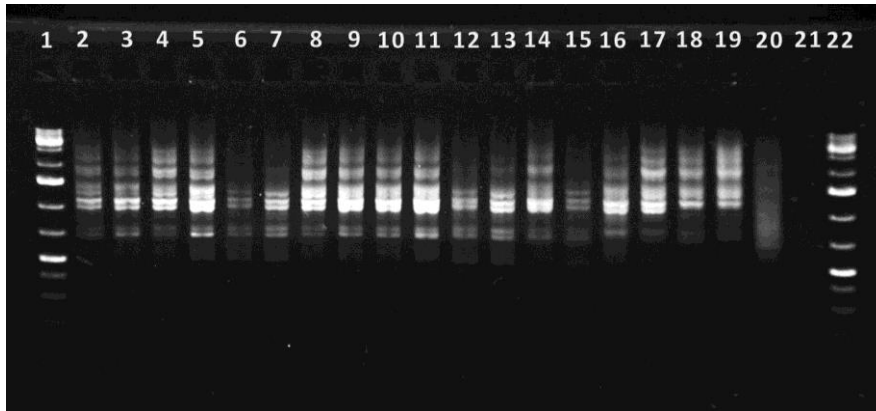
| Colecta | Hombro verde | Tamaño del hombro verde | Intensidad del color verde del hombro | Intensidad del color verde Excepto del hombro | Rayas verdes | Tamaño | Relación longitud/diámetro | Forma en sección longitudinal | Acostillado en la zona peduncular | Depresión en la zona peduncular | Tamaño de la cicatriz peduncular | Tamaño de la cicatriz pistilar |
|-----------------|--------------|-------------------------|---------------------------------------|---|--------------|-------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| C-S1 | Presente | Medio | Media | Clara | Ausente | Medio | Muy comprimido | Aplanada | Fuerte | Fuerte | Grande | Grande |
| Tenabo | Presente | Medio | Media | Clara | Ausente | Medio | Muy comprimido | Aplanada | Fuerte | Fuerte | Grande | Grande |
| Calkiní | Presente | Medio | Media | Clara | Ausente | Medio | Muy comprimido | Aplanada | Fuerte | Fuerte | Grande | Muy Grande |
| Champton | Presente | Medio | Media | Clara | Ausente | Medio | Muy comprimido | Aplanada | Fuerte | Fuerte | Grande | Muy Grande |
| Micro-Tom | Ausente | Ausente | Ausente | Muy clara | Ausente | Muy pequeño | Moderadamente comprimido | Achatada | Débil | Débil | Muy pequeña | Muy pequeña |
| Cherry amarillo | Presente | Grande | Oscura | Media | Presente | Pequeño | Media | Circular | Ausente | Ausente | Muy pequeña | Muy pequeña |
| Saladet | Ausente | Ausente | Ausente | Muy clara | Ausente | Grande | Moderadamente alargado | Elíptica | Ausente | Débil | Grande | Muy pequeña |

Tabla 10. Continuación de descriptores en fruto

| Colecta | Fruto: forma del extremo distal | Diámetro del corazón en corte transversal en relación con el diámetro total | Fruto: Espesor del pericarpio | Fruto: número de lóculos | Fruto: color (en la madurez) | Fruto: Color de la pulpa (en la madurez) | Fruto: Brillo de la epidermis | Fruto: color de la epidermis | Fruto: firmeza | Fruto: vida de anaquel | Época de madurez |
|-----------------|---------------------------------|---|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|-------------------------------|------------------------------|----------------|------------------------|------------------|
| C-S1 | Hundida plana | Muy grande | Medio | Más de seis | Rojo | Rojo | Fuerte | Incoloro | Medio | Media | Tardía |
| Tenabo | Hundida plana | Muy grande | Medio | Más de seis | Rojo | Rojo | Fuerte | Incoloro | Medio | Media | Tardía |
| Calkiní | Hundida plana | Muy grande | Medio | Más de seis | Rojo | Rojo | Fuerte | Incoloro | Medio | Corta | Tardía |
| Champton | Hundida plana | Muy grande | Medio | Más de seis | Rojo | Rojo | Fuerte | Incoloro | Medio | Corta | Tardía |
| Micro-Tom | Plana | Muy pequeño | Muy delgado | Dos y tres | Anaranjado | Anaranjado | Débil | Incoloro | Firme | Muy larga | Muy precoz |
| Cherry amarillo | Plana | Pequeño | Muy delgado | Solo dos | Amarillo | Amarillo | Fuerte | Amarillo | Muy firme | Larga | Tardía |
| Saladet | Plana puntiaguda | Medio | Grueso | Dos y tres | Rojo | Rojo | Medio | Incoloro | Firme | Larga | Tardía |

Caracterización molecular: La caracterización molecular se realizó a partir de marcadores ISSR (Inter Secuencias Simples Repetidas). Los cuales son unidades cortas de nucleótidos que se repiten en tándem a lo largo del genoma de los organismos, esta técnica, ha sido utilizada en variedades de tomate (Martínez-Estrada *et al*, 2017; Krishna *et al.*, 2016; Perera *et al.*, 2010; Rzepka, 2007). Se ensayaron 28 cebadores diferentes, sin embargo, 10 Ofrecieron un número de bandas (7 a 14 bandas) que permitió establecer diferencias entre las colectas y los híbridos comerciales (Tabla 12). Estas diferencias se pueden notar en el patrón de bandeo de las imágenes del gel PCR-ISSR (Tabla 11 y Fotografía 5), sin embargo, se realizó un dendograma para corroborar estas diferencias (Fotografía 6).

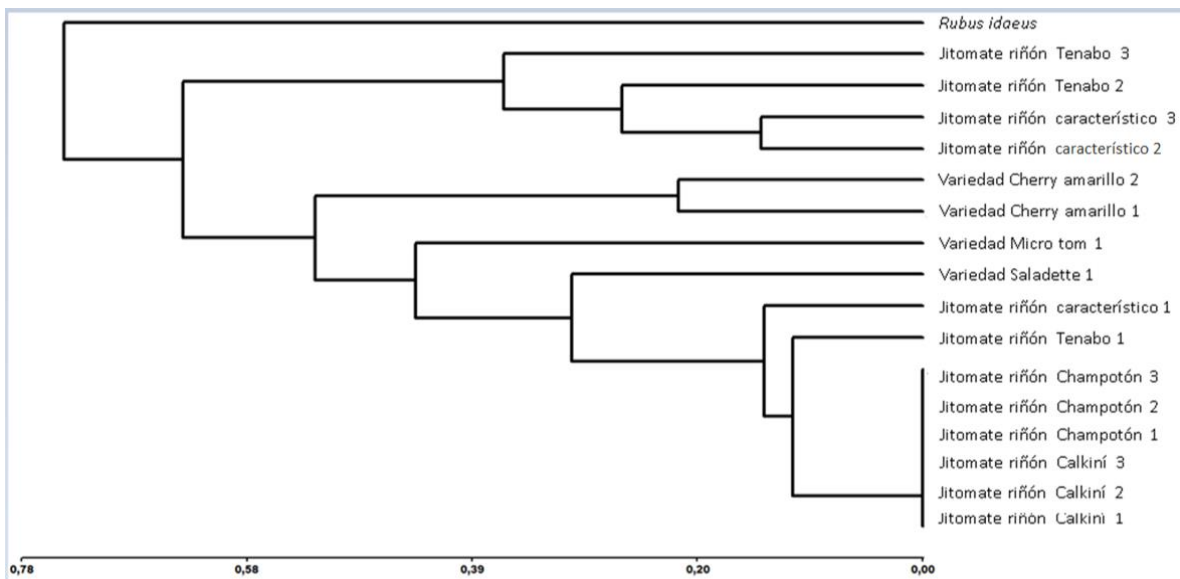
| Carril | Muestra | Carril | Muestra |
|---------------|---------------------------------|---------------|----------------------------|
| 1 | Marcador 1kb | 12 | Jitomate riñón Tenabo 2 |
| 2 | Jitomate riñón Calkiní 1 | 13 | Jitomate riñón Tenabo 3 |
| 3 | Jitomate riñón Calkiní 2 | 14 | Variedad Saladet 1 |
| 4 | Jitomate riñón Calkiní 3 | 15 | variedad Saladet 2 |
| 5 | Jitomate riñón característico 1 | 16 | Variedad Micro-Tom 1 |
| 6 | Jitomate riñón característico 2 | 17 | Variedad Micro-Tom 2 |
| 7 | Jitomate riñón característico 3 | 18 | Variedad Cherry amarillo 1 |
| 8 | Jitomate riñón Champotón 1 | 19 | Variedad Cherry amarillo 2 |
| 9 | Jitomate riñón Champotón 2 | 20 | <i>Rubus idaeus</i> |
| 10 | Jitomate riñón Champotón 3 | 21 | Control negativo |
| 11 | Jitomate riñón Tenabo 1 | 22 | Marcador 1kb |



Fotografía 5. Imagen en gel de agarosa 1.2% y teñido con bromuro de etidio.

Tabla 12. Cebadores ISSR usados para detectar diferencias genéticas en las colectas de tomate arriñonado e híbridos comerciales

| Oligo | Secuencia (5' – 3') | °Tm | Nº de bandas | Rango (Pb) |
|------------|---------------------|------|--------------|------------|
| DYD (CT)7C | DYDCTCTCTCTCTCTCTC | 44 | 14 | 300-2000 |
| (GA)8YG | GAGAGAGAGAGAGAGAYG | 48.8 | 13 | 250-1900 |
| (GA)8C | GAGAGAGAGAGAGAGAC | 52 | 11 | 200-1500 |
| (GA)8T | GAGAGAGAGAGAGAGAT | 45.4 | 11 | 400-2000 |
| (GA)8YT | GAGAGAGAGAGAGAGAYT | 47.4 | 8 | 400-2500 |
| A(CA)7CC | ACACACACACACACACC | 52.8 | 9 | 300-1750 |
| DDB(CCA)5 | DDBCCACCACCACCACCA | 59 | 9 | 300-2000 |
| DBD(AC)7A | DBDACACACACACACACA | 45 | 10 | 300-1400 |
| DDB(CCA)5 | DDBCCACCACCACCACCA | 59 | 7 | 350-1500 |
| (CA)7RT | CACACACACACACACART | 54 | 8 | 300-1400 |



Fotografía 6. Dendrograma realizado a partir del patrón de bandeo PCR-ISSR con el programa NTSYSpc versión 2.2.

Mediante el uso de marcadores moleculares ISSR se han identificado dos poblaciones genéticamente diferentes, una de ellas formada por las colectas de Calkiní y Champotón. El segundo grupo se integró por la colecta característica (C-S1) y Tenabo. Las variedades comerciales formaron grupos apartes, es notorio que el jitomate Cherry, Micro-Tom y Saladet, son más cercanos a las colectas de Calkiní y Champotón; esto es un indicativo que por lo menos existen dos variedades de jitomate arriñonado y que debido al comercio local y al intercambio de semillas que existe entre los pobladores mayas del sureste del país hay una mezcla varietal. Esta mezcla debe ser reconocida por separado para la preservación de los parentales nativos y no perder la variabilidad genética que las caracteriza.

Conclusión

Las prácticas Mayas de intercambio de semillas entre los pobladores de la región, ha mantenido el cultivo de jitomates arriñonados, sin embargo, debido al cultivo de unas cuantas variedades comerciales, los parentales nativos van perdido variabilidad, poniendo en peligro la capacidad de adaptación a las condiciones climáticas, edáficas plagas y enfermedades de la región. Los resultados aquí presentados muestran la importancia de la caracterización de variedades nativas y silvestres.

3.4 Literatura citada

- Chávez, J., Cruz, J., Vera, A., Rodríguez, E. & Lobato, R. (2011). Utilización actual y potencial del jitomate silvestre mexicano. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. 72 p.
- CONABIO. (2009). *Lycopersicon esculentum* P. Mill. Consultado el 6 de Septiembre del 2016. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/lycopersicon-esculentum/fichas/ficha.htm>.
- Doyle, J.J.; Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15. Recuperado el 10 de noviembre de 2016 en https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-83962-7_18.
- Gonzales, P. (2013). Geographical distribution of wild tomatos (*Solanum* L. sect. *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. Solanaceae). *Arnaldoa* 20 (2): 301 – 314.
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., Kishan, R. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *Biotech*. DOI: 10.1007/s13205-016-0389-7.
- Marshall, J., Knapp, S., Davey, M., Power, J., Cocking, E., Bennet, M. & Cox, A. (2001). Molecular systematics of *Solanum* section *Lycopersicon* (*Lycopersicon*) using the nuclear ITS r DNA region. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1216-1222.
- Martínez-Estrada Eduardo, Caamal-Velázquez José Humberto, Salinas-Ruíz Josafhat y Bello-Bello Jericó Jabín (2017) Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9852-3>
- Muller, K. (2007). The tomato and its relatives. (online). Consultado el 6 de septiembre del 2016. Disponible en: <http://www.kdcomm.net/~tomato/tax.html>.
- Peralta I., Knapp, S. & Spooner, D. (2006). Nomenclature for wild and cultivated

- tomatoes. TGC REPORT 56:7-12.
- Perera, María F., García, María G., Noguera, Aldo S., Sepúlveda Tusek, Milena, Filippone, María P., & Castagnaro, Atilio P. (2010). Evaluación de la variación somaclonal en vitroplantas de caña de azúcar mediante marcadores moleculares. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 87(2), 13-21. Recuperado en 29 de noviembre de 2017, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S18513018201000200002&lng=es&tlng=es.
- Rzepka, D., Kulpa, D., Smolik, M., Glówka, M. (2007). Somaclonal variation in tomato *L. pennelli* and *L. peruvianum* f. *glandulosum* characterized in respect to salt tolerance. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5 (2): 194-201. Recuperado en 25 de noviembre de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/262186613_Somaclonal_variation_in_tomato_L_pennelli_and_L_peruvianum_f_glandulosum_characterized_in_respect_to_salt_tolerance.
- Rick, C., Laterrot, H. & Philouze, J. (1990). A revised key for the *Lycopersicon* species. *Tomato genetics cooperative Report* 40:31.
- Spooner, D., Anderson G. & Jansen R. (1993) Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes and pepinos (solanaceae). *American Journal of Botany* 80 (6): 676-688.
- UPOV. (2011). DIRECTRICES PARA LA EJECUCIÓN DEL EXAMEN DE LA DISTINCIÓN, LA HOMOGENEIDAD Y LA ESTABILIDAD (*Solanum lycopersicum* L.). Recuperado el 15 de enero de 2017 en <http://www.upov.int/edocs/tgdocs/es/tg044.pdf>

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

Conclusiones. En la península de Yucatán, se encuentra gran diversidad de jitomates silvestres y nativos que deben ser caracterizados y conservados. En el norte del estado de Campeche, aun se cultivan algunas variedades nativas, en especial el conocido como jitomate Riñón o Rosapa'ak. En la presente investigación, se caracterizó morfológica y molecularmente esta posible variedad, así mismo se desarrolló un protocolo de cultivo *in vitro*. Lo anterior, con el objetivo de rescatar, conservar y propagar este genotipo para futuras investigaciones las cuales pueden efectuarse desde diferentes perspectivas. En el terreno biotecnológico, es un excelente acervo de genes para el mejoramiento genético de otras variedades menos tolerantes a plagas y enfermedades. En el ámbito económico, este jitomate es muy aceptado en la cocina tradicional yucateca, lo cual hace notar el potencial comercial que representa y que es poco explotado. Sin embargo, desde un punto de vista agronómico, es necesario el desarrollo de un paquete tecnológico adecuado para el jitomate Riñón que permita mejorar la producción y el cultivo durante todo el año lo cual tendría un impacto positivo para los agricultores locales. El jitomate Rosapa'ak es también un cultivo de traspatio que contribuye en la alimentación y economía familiar de las comunidades de origen maya, por lo que desde un punto de vista social, es importante conocer el impacto de esta hortaliza a nivel social y cultural. La integración de estos conocimientos, ayudará a mejorar los programas de rescate y conservación de variedades de jitomates silvestres y nativos de la península de Yucatán, también puede servir de referencia para proteger otras especies de plantas parientes de híbridos comerciales que de otro modo, están condenados a desaparecer.

Recomendaciones. Se recomienda continuar con la caracterización morfológica un ciclo más de cultivo, para reforzar los datos obtenidos en esta investigación. Es importante continuar con las colectas en los estados de Yucatán y Quintana Roo, con el propósito de observar mayor variabilidad. Para verificar si estos genotipos son más tolerantes a plagas y enfermedades, se recomienda evaluar con los descriptores de resistencia a diferentes patógenos incluidos en el documento TG/44/11 de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales.

Para obtener un mayor número de brotes, se puede probar concentraciones más altas de BAP y AIA en el medio de cultivo, es posible también aumentar el número de brotes con tecnologías como los biorreactores de inmersión temporal, que mejoran la vitalidad de las plantas y optimizan el proceso de aclimatación.