



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

REGENERACIÓN *in vitro* VÍA ORGANOGÉNESIS
DE *Solanum lycopersicum* Mill

TOLERANTE A BAJAS TEMPERATURAS

DOLORES MIJAIL JAVIER ESPINOSA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2016

La presente tesis titulada “REGENERACIÓN *in vitro* VÍA ORGANOGÉNESIS DE *Solanum lycopersicum* Mill TOLERANTES A BAJAS TEMPERATURAS”, realizada por el alumno: Dolores Mijail Javier Espinosa, 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
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

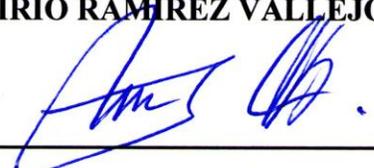


DRA. MA. CRISTINA GPE. LÓPEZ PERALTA

ASESOR

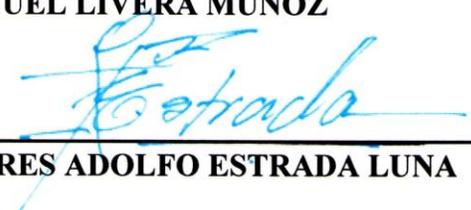
DR. PORFIRIO RAMÍREZ VALLEJO †

ASESOR



DR. MANUEL LIVERA MUÑOZ

ASESOR



DR. ANDRES ADOLFO ESTRADA LUNA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2016

DEDICATORIA

A mis padres: Amelia Espinosa Hernández y Federico Javier Jiménez. Por su paciencia, confianza y apoyo incondicional en esta etapa de formación y de mi vida.

A mis hermanos Mabel y Willie. Por las experiencias compartidas.

A mis sobrinos Federico Gabriel, William Alexis. Que son mi gran inspiración y gran motivación para seguir adelante a cada paso.

A mis amigos: Elizabeth, Laura, Laura I., Dr. Doro, Gerardo, Ileana, Cinthya, Alejandra, Edith, Sandra, Oralia.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México que, por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, me otorgó una beca económica para cursar mis estudios en el Colegio de Postgraduados y llevar a cabo la presente investigación.

Dra. Cristina López Peralta le agradezco el tiempo, paciencia y apoyo incondicional durante mi formación en el Colegio de Postgraduados. Cada experiencia compartida y transmitida le agradezco de corazón.

Al Dr. Porfirio Ramírez Vallejo† por proporcionarme el material vegetal de las colectas Tantoyuca Veracruz, Coyutla Veracruz y las Jícaras, Guerrero.

Al Dr. Eleodoro Hernández por la orientación y el gran apoyo dentro de la investigación para concluir con el grado de Maestría.

A la Ing. Laura Tovar, por su gran apoyo, orientación dentro del laboratorio y sobre todo por brindarme su amistad.

Un especial agradecimiento a mi familia “Javier Espinosa” por su apoyo incondicional y aliento para poder culminar con la obtención del grado de Maestría, los cuales me mantuvieron en pie cada vez que me veían decaer ante esta etapa de mi vida.

A mis amigos que me ayudaron a mantener la meta de continuar y salir adelante cada día de esta gran experiencia el Dr. Eleodoro Hernández y la Ing. Laura Tovar.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de esta investigación.

CONTENIDO

| | |
|--|----------|
| DEDICATORIA | iii |
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| CONTENIDO | v |
| ÍNDICE DE CUADROS | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE | x |
| RESUMEN | xiii |
| ABSTRACT | xv |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Objetivos generales | 4 |
| 1.2 Objetivos específicos | 4 |
| 1.3 Hipótesis | 4 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 6 |
| 2.1 Generalidades del jitomate | 6 |
| 2.1.1 Descripción botánica | 6 |
| 2.1.2 Morfología | 7 |
| 2.2 Importancia económica | 9 |
| 2.3 Diversidad de tomates en México | 10 |
| 2.4 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> | 10 |
| 2.4.1 Totipotencia celular | 11 |
| 2.4.2 Determinación y competencia | 11 |
| 2.4 Morfogénesis <i>in vitro</i> | 12 |
| 2.4.1 Embriogénesis somática | 13 |
| 2.4.2 Organogénesis <i>in vitro</i> | 13 |
| 2.5 Factores que afectan los procesos morfogénicos | 14 |
| 2.5.1 El genotipo | 15 |
| 2.5.2 El explante | 15 |
| 2.5.3 Medio de cultivo y sus componentes | 16 |
| 2.5.4 Regulación hormonal de la morfogénesis <i>in vitro</i> | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.5 Ambiente físico..... | 21 |
| 2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de jitomate | 22 |
| 2.7 Factores de estrés en plantas | 25 |
| 2.7.1 Bajas temperaturas..... | 25 |
| 2.7.2 Humedad relativa | 28 |
| 2.7.3 Luz | 28 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| 3.1 Material vegetal..... | 29 |
| 3.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación | 29 |
| 3.3 Regeneración de plantas vía organogénesis..... | 30 |
| 3.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico y germinación <i>in vitro</i> | 30 |
| 3.3.1.1 Variables cuantificadas..... | 31 |
| 3.3.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico | 31 |
| 3.3.2 Inducción de brotes | 32 |
| 3.3.2.1 Variables cuantificadas..... | 32 |
| 3.3.2.2 Diseño experimental y análisis estadístico | 32 |
| 3.3.3 Multiplicación de brotes..... | 33 |
| 3.3.3.1 Variables cuantificadas..... | 33 |
| 3.3.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico | 33 |
| 3.3.4 Enraizamiento <i>in vitro</i> de plantas | 34 |
| 3.3.4.1 Variables cuantificadas..... | 34 |
| 3.3.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico | 34 |
| 3.3.5 Aclimatación | 34 |
| 3.3.5.1 Variables cuantificadas..... | 35 |
| 3.3.5.2 Diseño experimental y análisis estadístico | 35 |
| 3.4 Determinación de la tolerancia de plántulas <i>in vitro</i> a bajas temperaturas..... | 35 |
| 3.4.1.1 Variables cuantificadas..... | 36 |
| 3.4.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico | 36 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 38 |
| 4.1 Establecimiento del cultivo aséptico | 38 |
| 4.2 Germinación <i>in vitro</i> | 40 |
| 4.3 Inducción de brotes vía organogénesis directa | 42 |
| 4.4 Multiplicación de brotes | 48 |
| 4.5 Enraizamiento..... | 52 |

4.6 Aclimatación 55

4.7 Respuesta de plántulas *in vitro* a bajas temperaturas..... 56

V. CONCLUSIONES..... 68

VI. RECOMENDACIONES..... 70

VII. LITERATURA CITADA 71

VIII. APÉNDICE 80

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Factores de estrés en las plantas..... | 25 |
| Cuadro 2. Concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de desinfección superficial de semillas de tres colectas de jitomate tipo Cherry. | 31 |
| Cuadro 3. Concentraciones de bencilaminopurina (BAP) evaluadas en la inducción de brotes de tres colectas de jitomate tipo Cherry en tres tipos de explantes..... | 32 |
| Cuadro 4. Concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina evaluadas en la multiplicación de brotes de tres genotipos silvestres de jitomate tipo Cherry. | 33 |
| Cuadro 5. Porcentaje de germinación de semillas de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry durante el establecimiento del cultivo aséptico..... | 40 |
| Cuadro 6. Efecto del tipo de explante y bencilaminopurina (BAP) sobre el número de brotes por explante en la etapa de inducción en colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las 4 semanas de cultivo. | 43 |
| Cuadro 7. Efecto del tipo de explante y BAP sobre el número de brotes en la etapa de inducción en tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las 4 semanas de cultivo. | 44 |
| Cuadro 8. Efecto del BAP y tipo de explante sobre la longitud de brotes (cm) en la etapa de inducción en colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las 4 semanas de cultivo. | 45 |
| Cuadro 9. Efecto del BAP en explantes de jitomate silvestre tipo Cherry sobre la longitud de brotes (cm) en la etapa de inducción Cherry a las 4 semanas de cultivo..... | 46 |
| Cuadro 10. Efecto del BAP y tipo de explante sobre la formación de callo (%) en colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las cuatro semanas de cultivo. | 47 |
| Cuadro 11. Efecto del BAP en explantes de jitomate silvestre tipo Cherry sobre la formación de callo (%) Cherry a las cuatro semanas de cultivo. | 47 |
| Cuadro 12. Efecto del BAP sobre la brotación (B, %), número de brotes por explante (BE) y la longitud de brotes (LB, cm) en la etapa de multiplicación de brotes en colectas de jitomate a las 4 semanas de cultivo. | 49 |
| Cuadro 13. Efecto del genotipo y citocininas sobre la brotación (B, %) y el número de brotes por explante (BE) en la etapa de multiplicación en colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las 4 semanas de cultivo..... | 51 |
| Cuadro 18. Efecto del genotipo y tiempo de exposición a -8 °C sobre la supervivencia (%) de plántulas <i>in vitro</i> de jitomate silvestre. | 59 |
| Cuadro 19. Supervivencia (%) de plántulas <i>in vitro</i> de jitomate después de dos semanas de haber sido expuestas a -8 °C por diferentes tiempos..... | 61 |
| Cuadro 20. Efecto del genotipo y tiempo de exposición a -8 °C sobre la altura (cm) y número de hojas de plantas <i>in vitro</i> de jitomate silvestre. | 62 |
| Cuadro 21. Altura de planta (cm) y número de hojas de plántulas <i>in vitro</i> de jitomate después de dos semanas de exposición a -8 °C por diferentes tiempos..... | 63 |
| Cuadro 22. Efecto del genotipo y tiempo de exposición a -8 °C sobre el número de raíces y longitud de raíces (cm) de plantas <i>in vitro</i> de jitomate silvestre. | 64 |
| Cuadro 23. Número de raíces y longitud de raíz (cm) de plántulas <i>in vitro</i> de jitomate después de dos semanas de haber sido expuestas a -8 °C por diferentes tiempos. | 65 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Colectas de jitomate silvestre tipo Cherry evaluadas por su tolerancia a bajas temperaturas. a) Colecta Núm. 300, b) Colecta Núm. 367, c) Colecta Núm. 457. | 29 |
| Figura 2. Semillas de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry usadas para la regeneración <i>in vitro</i> vía organogénesis. a) Colecta Núm. 300, b) Colecta Núm. 367, c) Colecta Núm. 457..... | 30 |
| Figura 3. Proceso metodológico de la regeneración <i>in vitro</i> de colectas de jitomate y la tolerancia a bajas temperaturas. | 37 |
| Figura 4. Germinación de semillas de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry. a) Emergencia de la radícula a los cinco días; b) seis días, c) siete días, y d) ocho días después de la siembra..... | 41 |
| Figura 5. Inducción de brotes en tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry con 2.5 mg L ⁻¹ de BAP (usando como explante la yema apical) a las cuatro semanas de cultivo. a) Colecta Núm. 300; b) Colecta Núm. 367; c) Colecta Núm. 457. | 44 |
| Figura 6. Multiplicación de brotes de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry cultivados con 0.5 mg L ⁻¹ de cinetina a las cuatro semanas. a) Colecta Núm. 300; b) Colecta Núm. 367; c) Colecta Núm. 457..... | 52 |
| Figura 7. Enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 367 después de una semana. | 54 |
| Figura 8. Comportamiento de la temperatura a la que estuvieron expuestas las plántulas de las colectas de tomate silvestre tipo Cherry 300, 367 y 457 en condiciones de invernadero en marzo del año 2013. En el círculo se indica la temperatura mínima de -8 °C alcanzada. Datos obtenidos de las estaciones meteorológicas de la Universidad Autónoma de Chapingo y el Colegio de Posgraduados Campus Montecillo. | 57 |
| Figura 9. Comportamiento de las plántulas de la colecta No. 457 sometidas a punto de congelación por 50 min, resultado después de dos semanas de haber sido expuestas a - 8°C donde los incisos muestran las diferencias en el tamaño de plántula respecto al porcentaje de supervivencia, a) plántulas de 2 cm y b) plántulas de 4 cm de altura. | 60 |

ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

| | |
|--|----|
| 1A. Componentes del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) empleados para la inducción, multiplicación y enraizamiento de brotes de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry <i>in vitro</i> | 80 |
| 2A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de supervivencia y germinación <i>in vitro</i> de semillas de tres colectas jitomate silvestre tipo Cherry. | 80 |
| 3A. Cuadrados medios y su significancia de análisis de varianza de cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la inducción de brotes <i>in vitro</i> en tres explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 300. | 80 |
| 4A. Cuadrados medios y su significancia de análisis de varianza de cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la inducción de brotes <i>in vitro</i> en tres explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 367. | 81 |
| 5A. Cuadrados medios y su significancia de análisis de varianza de cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la inducción de brotes <i>in vitro</i> en tres explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 457. | 81 |
| 6A. Respuesta de diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 300 en la inducción de brotes a las cuatro semanas de cultivo. | 81 |
| 7A. Respuesta de diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 367 en la inducción de brotes a las cuatro semanas de cultivo. | 82 |
| 8A. Respuesta de diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 457 en la inducción de brotes a las cuatro semanas de cultivo. | 82 |
| 9A. Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colectas No. 300 a las cuatro semanas de cultivo. | 82 |
| 10A. Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colectas No. 367 a las cuatro semanas de cultivo. | 83 |
| 11A. Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colectas No. 457 a las cuatro semanas de cultivo. | 83 |
| 12A. Efecto de la interacción de la colecta No. 300 con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (kin) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en tres diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry a las cuatro semanas de cultivo. | 84 |
| 13A. Efecto de la interacción de la colecta No. 367 con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (kin) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en tres diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry a las cuatro semanas de cultivo. | 84 |
| 14A. Efecto de la interacción de la colecta No. 457 con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (kin) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción | |

de brotes en tres diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry a las cuatro semanas de cultivo..... 85

15A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de cinco concentraciones de citocininas; bencilaminopurina (BAP) y cinetina (Kin) adicionadas con ácido naftalenacético (0.1 mg L-1 ANA) en la multiplicación de brotes *in vitro* en explantes de yema apical de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry. 85

16A. Efecto de la interacción del genotipo con diferentes con centraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (kin) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formacion de callo (FC) en la etapa de multiplicación de brotes en explantes de yema apical de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las cuatro semanas de cultivo..... 86

17A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza en el comportamiento de las colecta de jitomate silvestre tipo Cherry en el enraizamiento *in vitro* de plántulas de las colectas Núm. 300, 367 y 457..... 86

18A. Efecto de la colecta en la respuesta organogénica medida en porcentaje de enraizamiento (%), número de raíces (R), longitud de raíces (LR) y altura de planta (AP) en tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry durante la etapa de enraizamiento de plántulas. n=12 repeticiones..... 87

19A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza en el comportamiento de las colecta de jitomate silvestre tipo Cherry en la aclimatación *in vivo* de plántulas de las colectas Núm. 300, 367 y 457, medida en porcentaje de supervivencia (%). 87

20A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de seis tiempos de exposición a -8 °C de plántulas *in vitro* de 2 y 4 cm de altura de colectas de jitomate tipo Cherry..... 88

21A. Efecto de las colecta en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia (S), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) en tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry durante la etapa de inducción de heladas en plantas de dos centímetros. n=12 repeticiones..... 88

22A. Efecto de la interacción entre el tiempo de exposición a -8 °C y las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia (S), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) durante la etapa de inducción de heladas en plantas enraizadas *in vitro* de dos centímetros, obtenidas de la etapa de enraizamiento. n=12 repeticiones..... 89

23A. Efecto de la interacción entre las colecta Núm. 300, 367 y 457 y tiempos de exposición a -8 °C en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia (R), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) durante la etapa de inducción de heladas en plantas enraizadas *in vitro* de dos centímetros, obtenidas de la etapa de enraizamiento. n=12 repeticiones. 89

24A. Efecto de las colecta en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia (S), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) en tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry durante la etapa de inducción de heladas en plantas de cuatro centímetros. n=12 repeticiones. 90

25A. Efecto de la interacción entre el tiempo de exposición a -8 °C y las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia(S), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) durante la etapa de inducción de heladas en plantas enraizadas *in vitro* de cuatro centímetros, obtenidas de la etapa de enraizamiento. n=12 repeticiones. 90

26A. Efecto de la interacción entre las colecta Núm. 300, 367 y 457 y tiempos de exposición a -8 °C en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia (S), altura de planta

(AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) durante la etapa de inducción de heladas en plantas enraizadas *in vitro* de cuatro centímetros, obtenidas de la etapa de enraizamiento. n=12 repeticiones..... 91

RESUMEN

REGENERACIÓN *in vitro* VÍA ORGANOGÉNESIS DE *Solanum lycopersicum* Mill TOLERANTE A BAJAS TEMPERATURAS

Dolores Mijail Javier Espinosa, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2016.

El jitomate es una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial debido a que su fruto es una fuente rica en vitaminas, minerales y antioxidantes. Su cultivo puede ser afectado por diversos factores como plagas y enfermedades, pero las bajas temperaturas también pueden causar efectos negativos. Esta investigación tuvo como objetivos establecer la regeneración *in vitro* de plantas de tres colectas de tomate silvestre tipo Cherry vía organogénesis y evaluar su tolerancia a bajas temperaturas. A partir de semillas se logró el establecimiento del cultivo aséptico sumergiéndolas en una solución de NaOCl (30%) por 15 min. La germinación fue de 60 % y ocurrió después de una semana en las tres colectas en medio MS a la mitad de concentración de sales. Los mejores resultados durante la inducción de brotes se logró a partir de yemas apicales cultivadas en medio MS suplementado con 2.5 mg L⁻¹ de BAP. Sin embargo, el número de brotes varía entre colectas. En la colecta Núm. 300 se obtuvieron 2.8 brotes por explante, 2.6 brotes en la colecta Núm. 457 y 1.8 brotes en la colecta Núm. 367. La multiplicación de brotes en las tres colectas de jitomate (3.5 brotes por explante promedio) se logró con 0.5 mg L⁻¹ de cinetina y 0.1 mg L⁻¹ de ANA. El enraizamiento *in vitro* se indujo rápidamente después de ocho días de cultivo en el medio MS a la mitad de concentración de sales sin reguladores de crecimiento. Durante la aclimatación la supervivencia de plantas fue de 85% cuando se transfirieron en macetas con una mezcla de sustrato de turba y vermiculita (1:1) después de dos semanas. En la evaluación a bajas temperaturas (-8 °C) se confirmó que la tolerancia de las plántulas *in vitro* de las tres colectas de jitomate está asociada con un origen genético. En general, las tres colectas resultaron tolerantes y la supervivencia se comportó inversamente proporcional con el tiempo de exposición.

Palabras clave: Cherry, micropropagación, estrés, tolerancia, frío.

ABSTRACT

***In vitro* REGENERATION VIA ORGANOGENESIS OF *Solanum lycopersicum* Mill TOLERANT TO COLD TEMPERATURES**

Dolores Mijail Javier Espinosa, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2016.

The tomato is one of the most consumed vegetables worldwide, because its fruit is a rich source of vitamins, minerals and antioxidants. Its cultivation and production can be affected by various factors such as pests and diseases, but low temperatures can also cause negative effects. This research aimed to establish the *in vitro* plant regeneration of three collections of wild Mexican tomato Cherry via organogenesis and determinate their tolerance to low temperatures. Aseptic culture was achieved when seeds were cleaned in a solution of NaOCl (30%) for 15 min. Germination (60%) occurred after one week on MS medium at half salt concentration in the three collects. The best results during shoot induction were obtained when apical buds were used as explants and cultured on MS medium supplemented with 2.5 mg L⁻¹ BAP. However, the number of shoots produced varied according the collect. In collection No. 300 2.8 buds per explant were obtained, 2.6 shoots in collection No. 457 and 1.8 shoots in collection 367. Shoots multiplication in the three collections of tomato (3.5 shoots per explant average) was achieved with 0.5 mg L⁻¹ kinetin and 0.1 mg L⁻¹ NAA. *In vitro* rooting was rapidly induced after 8 days of culture on MS medium with half salt concentration without growth regulators. Acclimatization of plants was successful (85%) in peat-moss and vermiculite substrate (1:1) after two weeks. Evaluation of tolerance to low temperatures (-8 ° C) to evaluate their performance we confirmed that the tolerance of the three accessions is associated with a genetic origin. In general, plant tolerance and survival showed inversely proportional to the exposure time.

Keywords: Cherry, micropropagation, stress, tolerance, cold.

I. INTRODUCCIÓN

El fruto del tomate (*Solanum lycopersicum*) es una fuente importante de vitaminas, minerales y antioxidantes los cuales son importantes para la nutrición y la salud humana, además de una gran importancia económica. Es la segunda hortaliza más consumida a nivel mundial después de la papa (*Solanum tuberosum*) y seguida por la cebolla (*Allium cepa*). El tomate es uno de los vegetales que no solo se consumen como fruto fresco sino también procesado, ya sea en pasta, sopas, jugos, etc., la producción mundial de este vegetal para el 2011 fue de 160 millones de toneladas (Lobato *et al.*, 2012; FAO 2014).

El tomate es el séptimo cultivo más importante a nivel mundial; no obstante, Asia es el principal productor dominando el mercado de tomate, ya que China que se encuentra en el primer lugar de los productores, seguido de India, USA, Turquía, Egipto, Irán, Italia, Brasil, España y Uzbekistán (Beregounoux, 2013). En México su producción se estima alrededor de 85,000 hectáreas distribuidas en los estados de Sinaloa, Morelos, San Luis Potosí, Baja California, Tamaulipas, Michoacán y Nayarit, como principales productores de tomate (ASERCA, 2015). En cuanto a la producción nacional, este cultivo ocupa el segundo lugar de la producción hortícola con un 22.2%, sin embargo el volumen de exportación es tan grande que representa el 19.7% de las exportaciones nacionales, las cuales generaron 1,292.4 millones de dólares en 2014 (SAGARPA, 2015). Además, este cultivo es una fuente de empleo sumamente significativa para el país (Naika *et al.*, 2005; ASERCA, 2015).

En México existe un gran número de genotipos silvestres y domesticados de tomate, ya que es considerado centro de diversidad y domesticación. La amplia gama de material genético disponible es de gran importancia y utilidad, principalmente de variedades silvestres, ya que ese reservorio genético se puede aprovechar para realizar diversos estudios sobre el manejo, conservación y mejoramiento del cultivo (Lobato *et al.*, 2012).

En los Valles Altos de México y regiones serranas donde es cultivado el jitomate se pueden presentar bajas temperaturas durante las diferentes etapas de desarrollo de la planta. Estos eventos aleatorios pueden causar daños a los cultivos en proporción directa a la etapa de

ocurrencia e intensidad del fenómeno. Estos fenómenos se han acentuado e incrementado con el cambio climático y en las principales regiones productoras del país los daños son más frecuentes (Comunicación Personal Dr. Porfirio Ramírez Vallejo†, 2013).

Con estos antecedentes, el Dr. Porfirio Ramírez Vallejo† (Comunicación Personal, 2013) sembró en el invernadero en el mes de marzo (ciclo invierno-primavera de 2012-2013) colectas de tomate silvestre tipo Cherry (*Solanum lycopersicum*). Estas colectas se derivaron de selección individual y procedían de dos municipios del Estado de Veracruz: Tantoyuca y Coyutla (Colectas identificadas con números 367 y 457) y del Municipio de Jícaras del Estado de Guerrero (Colecta número 300). Se observó que durante la germinación ocurrió un marcado descenso de temperatura (-8 °C) que congeló las charolas de siembra. Las plántulas emergidas mostraron una respuesta diferencial a la baja temperatura, ya que unas sobrevivieron y otras murieron. Esta observación era un claro indicio de una tolerancia de dichas colectas a las bajas temperaturas que podría relacionarse con bases genéticas en las diferentes etapas de desarrollo. El comportamiento de las colectas antes mencionadas requiere ser evaluado en condiciones controladas para determinar si efectivamente la respuesta es genética o es solo una variación epigenética.

En general, la exposición de las plantas a bajas temperaturas afecta principalmente procesos fisiológicos como el régimen hídrico, la nutrición mineral, la fotosíntesis, la respiración y el metabolismo (Jouyban *et al.*, 2013). La tolerancia *in vivo* observada en las colectas de jitomate silvestre tipo Cherry supera los valores máximos reportados como limitantes para el crecimiento del cultivo de tomate, el cual se encuentra en un rango que va de -1 a 0 °C, en el que los cultivos presentan daños adversos o pérdida total del cultivo (LeBoeuf, 2004). Por esta razón, es de suma importancia evaluar para re-confirmar la respuesta fisiológica de estas colectas bajo condiciones controladas y las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* representan una opción de gran utilidad.

Las técnicas de cultivo *in vitro* en el cultivo de jitomate han resultado eficientes herramientas científicas, con aplicación en el mejoramiento genético, la transformación genética, la producción de plantas libres de virus y/o patógenos, la producción de metabolitos secundarios y la micropropagación. Las principales ventajas del empleo del

cultivo de tejidos vegetales incluyen la reducción en los tiempos de producción de nuevas plantas, la reducción de los tiempos de evaluación y el control total de las condiciones experimentales (Bauchet y Causse, 2012). En adición a lo anterior, estas técnicas han permitido efectuar estudios más precisos sobre la medición y el impacto y los efectos negativos de la variación en las condiciones ambientales en el crecimiento, desarrollo, producción y supervivencia de las plantas. Estas variaciones ambientales se pueden presentar en las diferentes etapas o durante todo el ciclo de vida de las plantas y pueden desarrollarse como condiciones de estrés hídrico (déficit o inundación), exposición a bajas y altas temperaturas, salinidad, toxicidad y deficiencia de nutrientes, ataque de plagas y enfermedades, condiciones de anoxia e hipoxia, etc.

1.1 Objetivos generales

- Regenerar bajo condiciones *in vitro* y a través de la vía de organogénesis plantas de tres colectas de tomate silvestre tipo Cherry (*Solanum lycopersicum*) que han mostrado tolerancia a bajas temperaturas.
- Evaluar la tolerancia a bajas temperaturas de plántulas regeneradas *in vitro* de las tres colectas experimentales de tomate silvestre tipo Cherry (*Solanum lycopersicum*).

1.2 Objetivos específicos

- Estudiar el proceso de organogénesis *in vitro* en las tres colectas experimentales de tomate silvestre tipo Cherry identificadas con los números 367, 457 y 300 tolerantes a bajas temperaturas.
- Evaluar el crecimiento *in vitro* de plántulas de tomate silvestre tipo Cherry (*Solanum lycopersicum*) de las colectas identificadas con los números 367, 457 y 300 sometidas a bajas temperaturas.

1.3 Hipótesis

- La variabilidad genética en la capacidad de regeneración *in vitro* se manifiesta por diferencias en la respuesta organogénica entre las colectas de tomate silvestre tipo Cherry (*Solanum lycopersicum*) tolerantes a bajas temperaturas durante la inducción de organogénesis *in vitro*.

- La capacidad organogénica *in vitro* de los explantes de las tres colectas experimentales incluidas en este estudio está en función de la naturaleza de los tejidos disecados, la presencia de tejidos meristemáticos y la edad fisiológica de las semillas.
- La supervivencia y el desarrollo (crecimiento y diferenciación) de las plántulas regeneradas a través de la micropropagación después de su exposición a condiciones controladas de bajas temperaturas es un indicador y podría confirmar la tolerancia genética de las colectas de tomate silvestre tipo Cherry (*Solanum lycopersicum*) identificadas con los números 367, 457 y 300.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del jitomate

El jitomate es una herbácea perenne, originalmente de hábito indeterminado. Generalmente la planta puede producir tres hojas entre cada inflorescencia. Ciertas variedades se desarrollaron como arbustivas o de hábito determinado en las cuales la planta produce brotes, terminando con racimos de frutos. Actualmente se emplea como un cultivo anual en regiones templadas; sin embargo, en regiones donde las temperaturas pueden bajar a menos de 10°C la planta no prospera (Jones, 2007).

2.1.1 Descripción botánica

El jitomate pertenece a la familia de las Solanáceas. El nombre científico es *Solanum lycopersicum*, es una planta diploide con $2n = 24$ cromosomas. La planta del jitomate es perene, pero comercialmente se cultiva como un cultivo anual. Las variedades de jitomate que se cultivan en invernaderos generalmente son de crecimiento indeterminado y requieren de una guía o tutor. Las cultivadas en campo, y comercialmente destinados a la cadena de producción de supermercados, son de hábito determinado y son de porte más pequeño que los de tipo indeterminado. Los de tipo determinado tienen las ventajas de ser más manejables y se facilita la cosecha, además de madurar más rápido (Rhodes, 2002).

Reino: Vegetal

Sub reino: Tracheobionta (Planta Vascular)

Superdivisión: Spermatophyta (Planta de Semilla)

División: Magnoliophyta (Planta con floración)

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledóneas)

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solaneceae (Familia Papas)

Género: *Solanum*

Especie: *lycopersicum*

2.1.2 Morfología

El cultivo de tomate es perenne y la planta presenta porte arbustivo, aunque también puede crecer de forma rastrera, semierecta o erecta. En la actualidad es posible encontrar variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas) (Peralta y Spooner, 2000; Bauchet y Causse, 2012).

El sistema radicular comprende una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. En corte transversal de la raíz principal, y del exterior hacia el interior, se encuentra la epidermis, donde se ubican pelos absorbentes especializados en tomar agua y nutrientes, córtex y cilindro central, donde se sitúa el xilema (conjunto de vasos especializados en el transporte de nutrientes) (Peralta y Spooner, 2000; Bauchet y Causse, 2012).

El tallo principal puede alcanzar un diámetro de 2 a 4 cm en su base, en función de la especie, variedad y genotipo. Aquí se ubican las hojas, tallos secundarios (ramificaciones simpodial) e inflorescencias. Su estructura, de fuera hacia adentro, consta de epidermis, de la que parten hacia el exterior los pelos radicales, corteza o córtex, cuyas células más externas son fotosintéticas y las más internas son colenquimáticas, cilindro vascular y tejido medular. En la parte distal se encuentra el meristemo apical, donde se inician los nuevos primordios foliares y florales (Peralta y Spooner, 2000; Bauchet y Causse, 2012).

Las hojas son compuestas e imparipinnadas, con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado, en número de 7 a 9 y recubierto de pelos glandulares. Las hojas se disponen de forma alternada sobre el tallo. El mesófilo o tejido parenquimático está recubierto de epidermis superior e inferior, ambas sin cloroplastos. La epidermis inferior presenta un alto número de estomas. Dentro del parénquima, la zona superior o zona empalizada, es rica en cloroplastos. Los haces vasculares son prominentes, sobre todo los del envés, y constan de un nervio principal (Peralta y Spooner, 2000; Bauchet y Causse, 2012).

La flor es regular e hipógina y consta de 5 o más sépalos, de igual número de pétalos de color amarillo y dispuestos de forma helicoidal e intervalos de 135°, de igual número de estambres unidos que se alternan con los pétalos y forman un cono estaminal que envuelve al gineceo, y de un ovario bi o plurilocular (Peralta y Spooner, 2000; Bauchet y Causse, 2012).

Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso (dicasio), generalmente en número de 4 a 12 flores; es frecuente que el eje principal de la inflorescencia se ramifique por debajo de la primera flor formada dando lugar a una inflorescencia compuesta, de forma que se han descrito algunas con más de 300 flores. La primera flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente por debajo de la primera, alrededor del eje principal.

La flor se une al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión, que se distingue por un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del córtex. Las inflorescencias se desarrollan cada 2-3 hojas axilares (Peralta y Spooner, 2000; Bauchet y Causse, 2012).

El fruto es una baya bi o plurilocular que puede alcanzar un peso que oscila entre unos pocos miligramos y 600 gramos. Está constituido por el pericarpo, el tejido placentario y las semillas. El fruto puede recolectarse separándolo por la zona de abscisión del pedicelo, como ocurre en las variedades industriales, en las que es indeseable la presencia de parte del pecíolo, o bien puede separarse por la zona peduncular de unión al fruto (Peralta y Spooner, 2000; Bauchet y Causse, 2012).

2.2 Importancia económica

El jitomate es una de las principales hortalizas que se producen en México, a nivel mundial se ubica dentro del noveno lugar en cuanto a producción (SIAP, 2015). Durante el año 2014 en México se cultivaron 53,375 ha, con un rendimiento por ha de 56.5 toneladas. La producción alcanzó dos millones 875,164.08 toneladas que representaron un valor de doscientos veintiocho mil millones 228, 164,842 MDP. Dentro de los principales estados productores de jitomate se encuentran Sinaloa con un 30% de valor total, San Luis Potosí con el 6.8%, Michoacán con 5.9%, Jalisco 5.5%, Zacatecas con 5.3%, Baja California Sur con 4.9%, Baja California 4.7%, el resto del país con un 36.1% (SIAP, 2015).

En México el tomate tiene una trascendencia social muy importante, puesto que gran parte de la población económicamente activa se encuentra relacionada directa o indirectamente con su cultivo.

Es una importante fuente de empleo para un considerable número de familias. Se estima que para la producción por hectárea de tomate se emplean 2,300 personas. El cultivo del tomate se relaciona paralelamente con una fuerte migración interna de personas originarias de estados como Oaxaca, Zacatecas, Guanajuato, Guerrero y Veracruz que aportan una proporción considerable de trabajadores agrícolas a las principales regiones de cultivo del tomate (ASERCA, 2015).

Por ello, el jitomate es la hortaliza más importante en numerosos países y su popularidad aumenta constantemente. Pocos productos hortícolas permiten tal diversidad de usos como el tomate. Su consumo puede ser crudo, cocido, estofado, frito, encurtido, salsa o en combinación con otros alimentos. Se puede usar como ingrediente en la cocina y puede ser procesado industrialmente entero o como pasta, jugo, polvo, entre otros (Nuez, 1995).

La exportación de tomate representa para México una importante fuente de divisas, al ser ubicado como el primer país exportador en el mundo. Para México, el jitomate tiene una participación nacional dentro de las hortalizas con un 22.2%, lo cual representa el 19.7% de las exportaciones nacionales. La exportación del jitomate produjo a México divisas por

un monto de 975.6 millones de dólares en 2010, 1,015.1 millones en 2011, 1,000.5 millones en 2012, 1,158.5 millones en 2013 y 1,292.4 millones de dólares en 2014 (Sagarpa, 2015).

2.3 Diversidad de tomates en México

En México existe un gran número de variedades silvestres y domesticadas de tomate, ya que es considerado centro de diversidad y domesticación, razón por la cual se cuenta con una amplia gama de material genético, que aportan una gran utilidad y diversificación, principalmente las variedades silvestres. Cabe mencionar que, tanto las variedades cultivadas como silvestres presentan amplia variabilidad en un gran número de características; el tamaño de fruto, color de fruto, la forma de fruto, altura de planta, número de frutos por racimo, número de racimos, etc. Estas cualidades hacen que las variedades sean evidentemente diferentes y así mismo funcionen como fuentes de genes para el mejoramiento genético del cultivo (Lobato *et al.*, 2012).

Los tomates silvestres crecen en diferentes altitudes, son geográficamente aislados, se adaptan a microclimas singulares y condiciones adversas de suelo debido a ello se infiere que tienen caracteres de resistencia o adaptabilidad a estas condiciones. Es por ello que las variedades silvestres son de gran importancia y funcionan como fuentes de caracteres (genes) que ayudan a la manipulación y el manejo del cultivo, ya que ofrecen resistencia a factores bióticos y abióticos, pueden servir para mejoramiento del cultivo, a corto, mediano o largo plazo (Lobato *et al.*, 2012).

2.4 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

El cultivo de tejido vegetales *in vitro* es el conjunto de técnicas empleadas para cultivar células, tejidos u órganos aislados de una planta madre en un medio de cultivo artificial en un ambiente controlado (George *et al.* 2008). Las diversas técnicas se han convertido en herramientas de gran importancia por su aplicación en varios campos de investigación y el mejoramiento genético de plantas (Thorpe, 2007).

Factores como el genotipo, el explante, medio de cultivo, reguladores de crecimiento, ambiente, entre otros, influyen en gran medida en el proceso de morfogénesis *in vitro* (Thorpe, 2007).

2.4.1 Totipotencia celular

Este término fue propuesto por Haberlandt en 1902 para describir la capacidad que tiene cualquier célula vegetal (somática), que contiene una copia íntegra de material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene la capacidad para regenerar una nueva planta completa (Calva y Pérez, 2005; Vasil, 2008).

Cada célula vegetal posee en su material genético toda la información necesaria para especificar cualquier rasgo morfológico, químico y/o funcional de la célula, para cada tejido en la planta, durante su ciclo vital. Estas células expuestas a ciertas condiciones, desarrollan ciertos tipos de organogénesis que excluyen a otros, donde depende de la variación de las células cultivadas en su competencia para la morfogénesis y la sensibilidad a inductores (Perl y Paul, 2000; Vasil, 2008).

2.4.2 Determinación y competencia

Las células y los tejidos están “determinados” para formar rutas morfogenéticas y/o metabólicas específicas, de modo que, es un proceso ordenado y predecible, forman órganos y regeneran plantas. La determinación depende de la propia naturaleza del tejido, de su estado vegetativo y del tratamiento al cual fue sometido, produciéndose en ocasiones, nuevos fenotipos que perduran en ausencia de los factores causantes del cambio. Existen especies que en estado silvestre son capaces de regenerarse a partir de pequeños fragmentos de tejidos cortados. Esto demuestra la gran capacidad de plasticidad del desarrollo vegetal (Yeoman, 1986; Soh y Bhojwani, 1999; 2010; 2013).

La determinación en plantas es progresiva y jerárquica. En especies cuyos tejidos utilizados para iniciar los cultivos, se encuentran en un estado temprano de determinación, los cultivos mostrarán mayor flexibilidad en su desarrollo que en otras especies en estados de determinación más avanzados. Por ello hay que tener en cuenta los diferentes estados de

desarrollo de los tejidos y las partes de la planta utilizados para el cultivo y los fines morfogénicos (Yeoman, 1986; Soh y Bhojwani, 1999; 2010; 2013).

El potencial de desarrollo del tejido cambia y se reduce a medida que procede el estado de determinación. Sin embargo, estos cambios no siempre son irreversibles, hay varios tipos de células y órganos, altamente determinados que son totipotentes si reciben un estímulo adecuado (Yeoman, 1986; Soh y Bhojwani, 1999; 2010; 2013).

Por otro lado, muchas células vegetales no tienen la capacidad de regenerar nuevas plantas; las que sí tienen esa posibilidad y sufren procesos de morfogénesis cuando tienen el estímulo adecuado, se dice que tienen competencia (Yeoman, 1986; Soh y Bhojwani, 1999; 2010; 2013).

La competencia celular se expresa como la habilidad para la regeneración de ciertas partes de la planta. Sin embargo, solo las células competentes pueden ser inducidas con la habilidad de responder a uno o a diferentes factores y pueden ser capaces de expresar la morfogénesis (Yeoman, 1986; Soh y Bhojwani, 1999; 2010; 2013).

2.4 Morfogénesis *in vitro*

La comprensión de la morfogénesis es esencial para entender los procesos de organogénesis y embriogénesis somática, ya que son las rutas que puede adquirir un tejido u órgano para la regeneración parcial o total de una planta (Almeida *et al.*, 2015). La morfogénesis *in vitro* se conoce como el proceso por el cual las células o tejidos adquieren la capacidad para la formación de un órgano o una planta completa (Phillips, 2004).

La morfogénesis *in vitro* en plantas se determina por los cambios genéticos, las respuestas epigenéticas a las condiciones de cultivo, el control del desarrollo molecular, cambios en la expresión de los genes dirigidos hacia la síntesis de hormonas, la señalización y la regulación de la transcripción para determinar la magnitud de la morfogénesis y la variación somaclonal (Isah, 2015).

La morfogénesis *in vitro* comprende la integración del crecimiento y diferenciación, mediada por la división y especialización celular que son el resultado de un complejo control hormonal espacial y temporal. Este control se produce mediante la regulación y expresión de múltiples genes, sistemas de acción correlativa de meristemas y sus derivados y por variaciones ambientales (Almeida *et al.*, 2015).

2.4.1 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática se refiere al proceso por el cual las células somáticas, bajo condiciones de inducción, generan células embriogénicas, que a través de una serie de cambios morfológicos y bioquímicos dan como resultado la formación de embriones somáticos (Zimmerman, 1993; Schmidt *et al.*, 1997; Komamine *et al.*, 2005).

La embriogénesis somática se fundamenta en la totipotencia celular, que es exclusiva de plantas superiores. A diferencia de la embriogénesis cigótica, los embriones somáticos son de fácil manejo debido a que las condiciones de cultivo *in vitro* se pueden controlar. Sin embargo, la falta de material puede ser un factor limitante en la experimentación (Kawahara y Komamine, 1995).

Estas características han hecho de la embriogénesis somática un modelo biológico para el estudio de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que se producen desde el inicio y durante la embriogénesis en plantas superiores. También tiene potencialmente grandes aplicaciones biotecnológicas como la producción de semillas artificiales, micropropagación y la generación de plantas transgénicas (Quirzo-Figueroa *et al.*, 2006).

2.4.2 Organogénesis *in vitro*

La organogénesis es el proceso por el cual las células y/o tejido se ven obligados a someterse a cambios que conducen a la producción de estructuras unipolares como; brotes, raíces o primordios, cuyo sistema vascular a menudo está conectado con el tejido origen. En contraste, la embriogénesis somática produce estructuras bipolares con sistemas vasculares cerrados e independientes (Vasil y Thorpe, 1998; Calva y Pérez, 2005).

Ambos procesos pueden ser directamente desde el explante o indirectamente a través de callo, el cual es una respuesta del tejido del parénquima. La organogénesis y la embriogénesis de manera natural puede ocurrir en varias especies; el cultivo de tejidos aumenta drásticamente el número de especies y/o partes de la planta, la cual puede surgir de una organización nueva y desarrollada de células (Vasil y Thorpe, 1998; Calva y Pérez, 2005).

Sin embargo, este proceso abarca diferentes aspectos desde la identificación y la interpretación de la información sensorial de los reguladores de crecimiento, la dediferenciación de células diferenciadas para adquirir la competencia, así como reintroducir células inactivas dentro del ciclo celular y la organización de la división celular para formar órganos específicos, principalmente meristemas. Algunos de los procesos elementales y genes esencialmente involucrados en la composición de este fenómeno han sido identificados a lo largo de análisis genéticos con varios tipos de plantas mutantes incluyendo los sensibles a la temperatura (Sugiyama, 1999).

La organogénesis *in vitro* depende de la aplicación de reguladores de crecimiento, en particular auxinas y citocininas, pero también depende de la habilidad del tejido para responder a los reguladores de crecimiento (Sugiyama, 1999).

2.5 Factores que afectan los procesos morfogénicos

Existen factores internos y externos los cuales pueden afectar los procesos morfogénicos en el cultivo *in vitro*. Los primeros tienen que ver con el genotipo, el tipo de explante y edad de la planta. En los externos sobresalen los niveles nutrimentales (pH, el potencial osmótico entre otros), y factores ambientales (la temperatura, la humedad relativa, intensidad luminosa) (Steward y Israel, 1970).

En el cultivo de tejidos, la fotosíntesis no es una actividad necesaria, excepto tal vez, durante la última parte de la tercera fase, ya que los hidratos de carbono se dispersan adecuadamente. Sin embargo, se necesita luz para regular ciertos procesos morfogénicos: como en la formación de brotes (Gautheret, 1969; Nebel, 1968), el inicio de las raíces

(Gautheret, 1969; Alleweld y Radler, 1961; Letouze y Beauchesne, 1969; Ueda y Torikata, 1968), la diferenciación de las clorofilas (depende de la calidad y tipo de luz que se esté percibiendo) (Hasegawa, 1973; Jones, 2007), y en la embriogénesis asexual (Haccius, 1965). Los casos de fracaso en el cultivo de tejidos son a veces causados por el uso de cámaras de crecimiento en instalaciones similares donde las disposiciones de luz han sido destinadas al desarrollo de las plantas autótrofas.

2.5.1 El genotipo

La adquisición del potencial de regeneración está determinada principalmente por el genotipo. Esto es fácil de demostrar debido a la variación en la respuesta frecuentemente observada con diferentes genotipos dentro de las mismas especies, e incluso, entre variedades. Este comportamiento se ha comprobado con herramientas moleculares (Delporte *et al.*, 2014).

La mayoría de los genotipos de Jitomate (*Solanum lycopersicum*) responden únicamente a un cierto tipo de reguladores de crecimiento durante su regeneración (Kurtz y Lineberger, 1983). El tipo y concentración del regulador del crecimiento influyen en la respuesta morfogénica (Plastira y Perdikaris, 1997). Estas diferencias son heredables o están reguladas por genes nucleares o citoplasmáticos (Bathía *et al.*, 2005).

2.5.2 El explante

Los procesos morfogénicos dependen del genotipo como respuesta principal aunados al efecto del explante, donde influye el tratamiento de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas en las que estas se encuentre y el tipo de explante, ya que determinará la respuesta morfogénica en condiciones *in vitro*. Además de estos factores, en la elección del explante se debe considerar el objetivo del cultivo (estudios básicos, obtención de plantas sanas, micropropagación, obtención de híbridos, etc.), la posibilidad de contaminación con microorganismos, la edad fisiológica, el tamaño, la época del año, entre otros (Mroginski *et al.*, 2014; Radice, 2014).

2.5.3 Medio de cultivo y sus componentes

El medio de cultivo generalmente debe contener macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos o suplementos de nitrógeno, una fuente de carbono, reguladores de crecimiento y agente gelificante. Se considera la concentración óptima de cada nutriente para alcanzar un máximo crecimiento dependiendo de la especie (George *et al.*, 2008; Saad y Elshahed, 2012).

Macronutrientes. Los elementos esenciales en el cultivo de células y/o en el medio de cultivo incluye además de carbono (C), hidrógeno (H), y oxígeno (O), macroelementos como nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S) para un crecimiento y morfogénesis óptima.

El medio de cultivo debe contener al menos de 25 – 60 mM de nitrógeno orgánico, para un desarrollo adecuado del crecimiento de las células. El potasio (K) también se adiciona a la mayoría de los medios de cultivo en forma de nitrato en una concentración de 20 – 30 mM. La concentración óptima de P, Mg, S y Ca varía entre 1 – 3 mM (George *et al.*, 2008).

Micronutrientes. El hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo), cobalto (Co), yodo (I), sodio (Na), cloro (Cl), níquel (Ni), son esenciales para las células de la planta, ya que ayudan a inducir la síntesis de algunas enzimas. El hierro es uno de los microelementos más críticos de todos los micronutrientes debido a que se utiliza como sulfato ferroso en medios de cultivo, es necesario para los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas para efectuar la oxidación / reducción (redox). Se requiere que el elemento para la formación del aminoácido denominado ácido levulónico y protoporfirinógeno (que son respectivamente precursores tempranos y tardíos de la clorofila); la deficiencia conduce a clorosis foliar. El hierro es también un componente de proteínas, como la ferredoxina que funciona como transportadores de electrones en la fotosíntesis (Ramage y Williams, 2002; Saad y Elshahed, 2012).

Suplementos orgánicos (vitaminas y aminoácidos). Una vitamina esencial e importante que no debe faltar es la tiamina que es la única vitamina requerida para el crecimiento de los cultivos. Algunas plantas sintetizan sus propias vitaminas esenciales para su crecimiento y

desarrollo normal, las cuales son utilizadas en la catálisis de ciertos procesos metabólicos. Sin embargo, también pueden actuar como factores limitantes del crecimiento y la diferenciación celular *in vitro* (Torres, 1989; Saad y Elshahed, 2012).

Las vitaminas comúnmente usadas en el cultivo de tejidos son tiamina (B1), ácido nicotínico y piridoxina (B6). La tiamina es esencial para el crecimiento de todas las células y se usa de 0.1 – 10 mg L⁻¹. El ácido nicotínico y la piridoxina no son esenciales para el crecimiento de las células en muchas especies; sin embargo, son adicionados al medio de cultivo, ya que tienen funciones catalíticas en reacciones enzimáticas y pueden mejorar la respuesta celular (Saad y Elshahed, 2012; Smith, 2013).

El ácido nicotínico se adiciona en concentraciones de 0.1 – 5 mg L⁻¹ y la piridoxina de 0.1 - 10 mg L⁻¹. Otras vitaminas como biotina, ácido ascórbico, ácido fólico, ácido pantoténico, tocoferol (Vitamina E), rivo flavina, ácido p-animo-benzoico también se pueden usar en algunos cultivos de células (George *et al.*, 2008).

Por lo tanto, es recomendable que se adicionen vitaminas en el medio de cultivo solo cuando la concentración de tiamina es menor al nivel requerido o cuando las células lo requieran para el crecimiento en poblaciones de baja densidad (Murashige, 1974).

El mio-inositol, aunque no es una vitamina, es un azúcar – alcohol utilizado en el proceso de la morfogénesis donde participa en la vía biosintética del ácido galacturónico, también es adicionado en pequeñas cantidades para estimular el crecimiento celular en la mayoría de las especies (Vasil y Thorpe, 1998). El mio-inositol influye en la división celular debido a que liberan ácido ascórbico y pectinas en la incorporación de fosfolípidos como fosfatidil-inositol y fosfoinositos en concentraciones de 50-500 mg L⁻¹.

Además, adicionar aminoácidos al medio de cultivo compensa la necesidad de los cultivos por reducir el nitrógeno, debido a que son relativamente caros, solamente se usan en medios para propagación donde se necesitan incrementar o mejorar los resultados. Sin embargo, para otros propósitos dentro del cultivo de tejidos, el uso de aminoácidos puede resultar innecesario, los componentes del medio de cultivo proveen cantidades necesarias y en proporciones adecuadas de nitratos y de iones de amonio. Los aminoácidos no serían

necesarios si los nutrientes inorgánicos fueran adecuados, para tener un mejor aprovechamiento se debe adicionar de 0.05 – 0.1% de caseína hidrolizada (Enzima de digestión) o aminoácidos cas para el establecimiento de cultivo de células (George *et al.*, 2008).

Fuente de carbono. Los carbohidratos son de suma importancia dentro del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, ya que tienen la función de suministrar una fuente de energía, una fuente de carbono y ser un agente osmótico. En general, se considera que los carbohidratos modulan la expresión de genes en las plantas (Borges y Campos, 2003; Saad y Elshahed, 2012).

La respuesta de los genes en plantas puede cambiar dependiendo de la cantidad de azúcar en el medio de cultivo. Algunos genes son inducidos, otros son reprimidos, y otros más son afectados mínimamente. Al igual que en los microorganismos, los genes de plantas que responden al azúcar son parte de un sistema de ajuste celular a la disponibilidad de nutrientes críticos. Sin embargo, no existe evidencia que el trabajo que desempeñan los carbohidratos es importante para el crecimiento ideal y un desarrollo organizado en el cultivo de células (Cuenca y Vieitez, 2000; Saad y Elshahed, 2012).

Agentes gelificantes. Las necesidades nutricionales de los cultivos de tejidos en plantas pueden ser suministradas por medios líquidos, pero el crecimiento en el medio líquido puede afectar el desarrollo por la falta de oxígeno y la hiperhidratación. La concentración de oxígeno de medios líquidos es a menudo insuficiente para satisfacer la demanda de este elemento en las células y en tejidos sumergidos (George *et al.*, 2008; Saad y Elshahed, 2012).

Hay un gran número de agentes gelificantes tales como agar, agarosa y goma. El agar es un polisacárido obtenido a partir de algas marinas, es de uso universal como agente gelificante para la preparación de medios semi-sólidos y sólidos en cultivo de tejidos vegetales. El Agar tiene varias ventajas sobre otros agentes gelificantes; mezclado con agua, se disuelve fácilmente con temperaturas de 60 a 100 °C y se solidifica a aproximadamente a 45 °C; se forma un gel estable a todas las temperaturas de incubación factibles. Los geles de agar no

reaccionan como constituyentes de los medios y no son digeridos por enzimas de la planta. Se utiliza comúnmente en los medios de cultivo en concentraciones que oscilan entre 0.8 a 1.0% (George *et al.*, 2008; Saad y Elshahed, 2012).

2.5.4 Regulación hormonal de la morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis *in vitro* es un proceso complejo afectado por varios factores endógenos y exógenos con efectos acumulativos. La expresión del potencial embriogénico u organogénico sólo se produce si las células dentro del explante son competentes o si responden a señales específicas de cultivo que les permitan diferenciarse en embriones u órganos (Elhiti y Stasolla, 2011). Los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo son uno de los factores que mayor efecto tienen sobre las respuestas morfológicas (George *et al.*, 2008).

Auxinas. Son ampliamente usadas en el cultivo de tejidos. Las auxinas promueven principalmente, en combinación con las citocininas, el crecimiento de callo, el cultivo de células en suspensión y de órganos, así como dirigir la morfogénesis. Las auxinas controlan procesos básicos como la división celular, y la elongación celular. También están involucrados en la formación de meristemas que dan lugar a tejidos desorganizados, u órganos definidos. En tejidos organizados, las auxinas están involucradas en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad de las plantas y uno de los efectos más notables es el mantenimiento de la dormancia apical y la mediación del tropismo (Friml, 2003; George *et al.*, 2008).

Las auxinas más empleadas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son Ácido indolacético (IAA), Ácido indo-3-lbutirico (IBA), Ácido 2,4 diclorofenoxilacético (2,4-D), Ácido α -naftalenacético (NAA), Ácido 3,6-dicloroanisico (dicamba) (George *et al.*, 2008).

Citocininas. En el cultivo de tejidos como en plantas completas y órganos, las citocininas son necesarias para la división celular, específicamente en la síntesis de proteínas involucradas en la formación y función del uso mitótico. En cultivos donde las citocininas son limitadas, la división de los núcleos celulares omite una etapa en el ciclo celular. Los

subcultivos de tejidos donde el medio contiene citocininas puede causar que las células se dividan sincronizadamente después de la fase lag (George *et al.*, 2008).

Las citocininas son efectivas en la inducción de brotes, ya sea en forma directa o indirecta. Un perfecto balance entre auxinas y citocininas favorece la organogénesis. Sin embargo, También pueden promover la embriogénesis somática en concentraciones bajas (0.5 – 2.5 μM); concentraciones mayores funcionan como un inhibidor de la embriogénesis, que es más común en las monocotiledóneas. Las más usadas en son 6-furfurilaminopurina (Kin), 4-hidroxi-3-metil-trans-2-butelinaminopurina (Zeatina), N6-(2isopentil) adenina (iP, 2-iP, iPA), 6-belcilaminopurina (BA), Tidiazurón, Adenina entre otras (George *et al.*, 2008).

Giberelinas. Las giberelinas pueden promover la floración (particularmente en especies que requieren días largos y fríos), iniciación o inducción del cono en coníferas, la germinación y el alargamiento del tallo (mediante el incremento de la división celular y elongación) (Gaspar *et al.*, 1996).

Cuando se adicionan al medio de cultivo a menudo disminuyen o previenen la formación de raíces, brotes o embriones somáticos. Algunas GAs endógenas son necesarias para el desarrollo normal de callos, sin embargo, en cultivos líquidos su ausencia puede influir en el desarrollo celular. Algunas diferencias en la inhibición y en la promoción de raíces adventicias o en la formación de brotes mediante las GAs puede ser debido a que inhiben la iniciación y/o inducción del meristemoide, pero son requeridas para el crecimiento y el desarrollo en la formación de nuevos órganos (Gaspar *et al.*, 1996; George *et al.*, 2008).

Las GAs también pueden alterar la habilidad de las auxinas endógenas. El crecimiento de brotes en meristemas y el cultivo de brotes se pueden incrementar con la adición de las GAs (Gaspar *et al.*, 1996; George *et al.*, 2008).

Ácido Abscísico. El ácido abscísico juega un papel importante en el cierre y apertura de estomas (ayuda a reducir la transpiración en la planta) y en conjugación con otros reguladores de crecimiento promueven la abscisión de hojas y la senescencia. El ABA es importante en la maduración de las semillas, el cual induce la síntesis de las proteínas de reserva en el desarrollo de las semillas (Gaspar *et al.*, 1996; George *et al.*, 2008).

En el cultivo de tejidos el ABA influye en el crecimiento de callos y la organogénesis (yemas, raíces y embriones). Es esencial para la maduración y el crecimiento normal de embriones somáticos; los embriones cigóticos pueden reorganizar su desarrollo morfológico y bioquímico. También ayudan a incrementar la tolerancia a bajas temperaturas en plantas y en cultivo de tejidos (Gaspar *et al.*, 1996; George *et al.*, 2008).

Etileno. Esta hormona es la única en estado gaseoso que se puede encontrar en la atmósfera y tiene efectos en el desarrollo de la planta. Es producido en todos los tejidos vivos y está involucrado en la madurez de los frutos, en la senescencia, en la abscisión de las hojas, sin embargo tiene otras funciones, dependiendo de la especie o del tejido en cuestión (George *et al.*, 2008).

La acumulación del etileno en el cultivo de tejidos puede tener efectos benéficos que depende de las condiciones ambientales a las cuales el medio de cultivo ha sido expuesto, al aumentar o disminuir la acumulación de este gas (hormona) con la adición de químicos que reducen (aminoetoxivinilglicerina, AVG) o promueven la biosíntesis del etileno (1-ácido carboxílico 1-aminociclopropano ACC) o inhibir la acción fisiológica del etileno (trisulfato de plata STS). Por ejemplo, se reporta que cuando se usa el AVG en arroz incrementa el crecimiento en el cultivo de callos, y con el uso del ACC disminuye, también se ha reportado que incrementa la producción e inducción de brotes en (*Brassica campestris*) con la adición de AVG, sin embargo, con el uso del STS promueve la producción de brotes en papa (*Solanum tuberosum*) (Magdalita *et al.*, 1997; George *et al.*, 2008).

2.5.5 Ambiente físico

Los principales factores del entorno de cultivo de tejidos son la luz y la temperatura. Generalmente los cultivos se mantienen a una temperatura constante de 25 ± 2 °C para el desarrollo de los cultivos *in vitro*. Esto depende la finalidad de los estudios, ya que las temperaturas superiores a 30 °C y menores de 12 °C influyen directamente en el crecimiento de los cultivos, con un ciclo de luz oscuridad 16/8h, la luz generalmente es provista por lámparas de luz blanca fluorescentes con una irradiancia entre 50 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La humedad relativa se debe mantener entre 80 – 90 (Mroginski *et al.*, 2014).

2.6 Cultivo *in vitro* de jitomate

El tomate ha sido objeto de investigación por el valor comercial que representa y su docilidad para su mejora a través de la manipulación genética (Evans, 1989). En consecuencia, se han realizado numerosos estudios sobre la regeneración de plantas a partir de una amplia gama de tejidos y órganos de tomates silvestres y de germoplasma de especies y variedades cultivadas (Padmanabhan, 1974; Cassells, 1979; Novak y Mašková, 1979; Ancora y Sree-Ramulu, 1981; Zapata *et al.*, 1981).

Con los estudios *in vitro* se ha llevado a cabo la selección de líneas celulares al estrés biótico y abiótico (Stavarek y Rains, 1984; Toyoda *et al.*, 1984, 1985, 1989; Rahman y Kaul, 1989); el desarrollo de plantas haploides (Gresshoff y Doy, 1972; Zagorska *et al.*, 1982, 1998; Chlyah y Taarji, 1984; Shtereva *et al.*, 1998); la producción de híbridos somáticos (Sink *et al.*, 1986; Wijbrandi *et al.*, 1988); y la propagación masiva (Fari *et al.*, 1992; Izadpanah y Khosh Khui, 1992).

Los tomates son afectados por muchas enfermedades que son causadas por bacterias, hongos, virus y nemátodos. Estas enfermedades también contribuyen a la reducción de la recuperación de semillas híbridas en campo. El uso de cultivos tolerantes a enfermedades podría ser una manera eficaz de controlar las enfermedades anteriores. Las técnicas de ingeniería genética pueden jugar un papel importante en el desarrollo de cultivos resistentes a enfermedades (Bathía, 2004).

Varias especies silvestres del género *Lycopersicum*, especialmente *L. peruvianum*, *L. hirsutum* y *L. glandulosum*, representan una importante fuente de genes que confieren resistencia a diversas enfermedades y plagas en tomates (Lukyanenko, 1991). Sin embargo, la introducción de los genes a los cultivos comerciales de *Solanum lycopersicum* Mill mediante técnicas convencionales de mejoramiento a menudo se enfrentan a serias dificultades debido a las altas barreras de incompatibilidad en la hibridación (Kaul, 1991). Para superar estos problemas pueden ser necesarios ciertos enfoques modernos de la manipulación genética. Las técnicas de ingeniería genética están siendo utilizadas en programas de mejora en variedades de tomate para solventar estos desafíos (Bathía, 2004).

Además de ser una herramienta de ingeniería genética, el cultivo de tejidos vegetales se puede utilizar para la micropropagación de variedades comerciales de alto valor. Los tomates se propagan convencionalmente a través de semillas. Por naturaleza, el tomate es un cultivo autógamo, por lo tanto, el proceso de producción de semillas híbridas implica emasculación y polinización manual. Todo este proceso de producción de semillas híbridas se realiza manualmente en condiciones de campo no controlados (Bathía, 2004).

Las condiciones climáticas impredecibles e indeseables en el campo hacen que todo el proceso de producción de semillas híbridas sea aún más caro. Por lo tanto, todos estos factores adversos, contribuyen al aumento del costo de las semillas híbridas, que puede ser demasiado alto (Bathía, 2004).

Por otro lado la influencia del explante en el cultivo de jitomate en la morfogénesis *in vitro*, depende de factores importantes como el genotipo, la edad del explante, el tamaño del explante y el método de inoculación. El-Farash *et al.* (1993), encontraron que existe una interacción entre el genotipo, el tipo de explante, y la edad del explante de la planta para tener un porcentaje de regeneración y el número de brotes por explante.

La respuesta de regeneración también se encuentra influenciada por el periodo en el año y el ambiente donde en donde la planta se desarrolló. Las respuestas de los explantes de tomate crecidos en cultivo *in vitro* son diferentes a los utilizados del invernadero (Frankenberger *et al.*, 1981a, b).

Se han utilizado varios tipos de explantes de jitomate, por ejemplo; cotiledones, hipocotilos, pedicelos, pedúnculos, hojas, tallos y secciones de inflorescencias para organogénesis. En tomate, los órganos reproductivos pueden ser regenerados de órganos vegetativos. Compton y Veilleux (1991) regeneraron brotes y raíces a partir de inflorescencias mientras que Applewhite *et al.* (1994) usaron explantes de pedicelos y pedúnculos de plantas de tomate en floración para regenerar raíces y brotes.

En el cultivo de jitomate el tipo de explante no solo determina el tamaño, con el cual se realiza la organogénesis, sino también el número de brotes por explante. Duzyaman *et al.* (1994) descubrieron que el grado de regeneración va en el orden de hojas \geq cotiledones \geq

hipocotilos, la mayoría de los cultivos tienen una respuesta similar. Plastira y Perdikaris (1997) reportaron una diferencia en la frecuencia de regeneración de varios explantes en el orden de hipocotilos \geq cotiledones \geq hojas.

Gunay y Rao (1980) demostraron que existe una regeneración preferencial en los explantes de hipocotilos que en los de explantes de cotiledones. En contraste, Schutze y Wieczorrek (1987), reportaron que la regeneración de brotes es mejor con los explantes de cotiledones en comparación con los explantes de hipocotilos. La mayoría de los tejidos de tomate muestran una totipotencia alta, sin embargo, al seleccionar un explante ideal puede variar debido al genotipo.

La edad del explante influye directamente en las respuestas morfogénicas. Los tejidos blandos y jóvenes son más manejables que los tejidos viejos. Sin embargo, Dai *et al.* (1988) indicaron que la capacidad de regeneración del tomate incrementa con la edad del explante. El tamaño óptimo del explante en tomate es vital para alcanzar una buena regeneración. Pequeñas estructuras como las células, grupos de células, y meristemas son considerados en general difíciles para la inducción en el desarrollo comparado con estructuras como hojas, tallos y explantes de tubérculos.

Schutze y Wieczorrek (1987) mencionan que existe mayor formación de brotes con explantes pequeños que con explantes grandes. El tamaño ideal para de explantes en tomate fue reportado de 0.5 cm² para explantes de hojas y 1 cm de largo para explantes de tallo (Chandel y Katiyar, 2000).

Los explantes pueden ser cultivados con en una orientación polar (rectos o forma horizontal con la base fisiológica en el medio) o apolar (la parte superior hacia el medio, la base fisiológica fuera del medio). La orientación polar generalmente regenera raíz y brotes más fácilmente que la de orientación apolar.

2.7 Factores de estrés en plantas

El estrés ambiental en plantas se refiere a los factores que limitan la productividad dentro de la agricultura, así mismo es definido como la alteración de la condición fisiológica, causada por factores que tienden a alterar el equilibrio (Cherry *et al.*, 2000; Duncan, 2000).

Las respuestas metabólicas, anabólicas y morfológicas a estrés son procesos primarios de la microevolución debido a la selección natural (Cuadro 1).

Cuadro 1. Factores de estrés en las plantas.

| Físicos | Químicos | Bióticos |
|-----------------|---------------------------|------------------|
| Sequía | Contaminación atmosférica | Competencia |
| Temperatura | Metales pesados | Alelopatía |
| Radiación | Pesticidas | Insectos |
| Inundación | Toxinas | Enfermedades |
| Viento | pH del suelo | Hongos patógenos |
| Campo Magnético | Salinidad | Virus |

Fuente: Gaspar *et al.* (2002).

2.7.1 Bajas temperaturas

Existen plantas en etapa vegetativa que tienen la habilidad de sobrevivir a temperaturas bajas sin mostrar algún daño en el crecimiento o desarrollo futuro y a esto se lo conoce como resistencia al frío. Los daños que ocurren durante la exposición a bajas temperaturas usualmente no se observan inmediatamente, pero puede ser visibles a los 2 ó 3 días. Sachs (1864) observó que la transferencia protoplasmática disminuye cuando la temperatura comienza a descender entre 12 - 10°C en los pelos de la raíz de pepino y en plantas de tomate. Lewis (1956) encontró que la transferencia de agua disminuye, o apenas es perceptible, después de 1 ó 2 minutos a 0°C en los tricomas del peciolo en plantas sensibles a bajas temperaturas, e invariablemente disminuye a los 5°C ó 0°C. Si la exposición a 0°C excede las 24 horas la permeabilidad de las membranas falla (Jouyban *et al.*, 2013).

Existe una clasificación para el tipo de plantas resistentes o que tienen una habilidad para responder de manera favorable a bajas temperaturas, las cuales se dividen en tres categorías;

1. Susceptibles a frío: los daños de la planta comienzan por debajo de los 12 °C.
2. Tolerantes a frío pero susceptibles a heladas: Aquellas que son viables para aclimatarse a temperaturas por debajo de los 12 °C, pero no viables a sobrevivir a heladas.
3. Tolerantes a heladas: Son viables para ser aclimatadas y sobrevivir a temperaturas significativamente menores al congelamiento. Algunas plantas herbáceas pueden sobrevivir a heladas moderadas que van desde -7 °C hasta los -30 °C.

Sin embargo, la respuesta de las plantas a la exposición de temperaturas bajas afecta principalmente procesos fisiológicos como el régimen hídrico, la nutrición mineral, la fotosíntesis, la respiración y el metabolismo (Jouyban *et al.*, 2013).

El régimen de agua: Afecta a todos los componentes que contengan agua y causa la pérdida de este solvente universal, la cual resulta en una severa marchitez. El daño se basa en la rápida disminución en la habilidad de absorción de agua y su transporte al tallo y la insuficiencia de agua que provoca la disminución del potencial hídrico de las hojas durante la primera hora de enfriamiento. El grado de daño al enfriamiento en la planta se podría regular o manipular si se previene la distribución del régimen de agua (Jouyban *et al.*, 2013).

La nutrición mineral: La absorción de los iones por la raíz se ve afectada debido a que el agua es el medio por el cual son transportados; por lo tanto, se ve interrumpida la distribución en toda la planta, así como en los órganos de la misma. La actividad de la enzima nitrato reductasa disminuye debido a la reducción del nitrógeno incorporado en aminoácidos y proteínas, en la disminución del fósforo orgánico y el incremento en el contenido de fósforo inorgánico. El mecanismo que reduce la absorción de los nutrientes

bajo temperaturas bajas incluye la depresión de la respiración y/o la fosforilación. El sistema de transporte enzimático asociado con los cambios conformacionales de las membranas cambia el potencial en la membrana, reduciendo el suministro de ATP a H⁺ transportando ATPasa, así como también baja la permeabilidad de los coeficientes para los iones (Jouyban *et al.*, 2013).

La fotosíntesis: Durante y después del tratamiento a bajas temperaturas la tasa de fotosíntesis en las hojas de las plantas sensibles a bajas temperaturas disminuye; también depende del tiempo que se encuentren sometidas a estas condiciones y la temperatura a la cual se encuentre dicha planta (Jouyban *et al.*, 2013).

La razón de la inhibición de la fotosíntesis es por bloqueo del transporte del floema de carbohidratos de las hojas, la limitación estomática, la destrucción del aparato fotosintético, el daño en la distribución de agua en el complejo fotosistema I, la inhibición del transporte de electrones, el desacoplamiento de la transferencia de electrones y la energía de almacenamiento, cambios en la actividad y en la inhibición de la síntesis de enzimas clave para el ciclo de Calvin y de la ruta C4 (Jouyban *et al.*, 2013).

Respiración y Metabolismo: Se presenta una disminución en la tasa de respiración debido a la destrucción de la estructura de la mitocondria en general, la baja energía cinética y la inhibición de algunas enzimas (Wilson, 1978; Steward *et al.*, 1990; Yadegari *et al.*, 2008). Se ha observado el incremento de la actividad respiratoria durante las bajas temperaturas y una prolongada elevación de la tasa de respiración de la exposición a frío lo cual puede indicar la disfunción metabólica irreversible y la acumulación de incompletos intermediarios oxidados (Jouyban *et al.*, 2013).

Como un resultado a la disminución de la respiración y el consumo de energía rica en fosfatos a temperaturas bajas es la reducción de los niveles de ATP. El frío reduce el camino del criptocromo del transporte de electrones en plántulas e incrementa vías alternas de respiración el cual podría ser importante para la adaptación de las plantas a bajas temperaturas. Esta alternativa inducida por las bajas temperaturas disminuye la generación del superóxido en la mitocondria (Jouyban *et al.*, 2013).

2.7.2 Humedad relativa

Se define como como el porcentaje de saturación del aire con vapor de agua (Aitken-Chirstie *et al.*, 2000). La humedad relativa del microambiente de los recipientes con medio de cultivo es normalmente de aproximadamente 100%. Dicha información puede ser valiosa en climas extremos, sin embargo, en un clima normalmente muy húmedo puede haber problemas de desarrollo del cultivo, mientras que en las zonas secas la pérdida de humedad del medio de cultivo puede ocurrir más rápidamente (Jouyban *et al.*, 2013).

2.7.3 Luz

La iluminación del cultivo de tejidos debe ser considerada en términos de intensidad, duración del período de exposición diaria y la calidad. En primer lugar, los requisitos de luz de cultivos de tejidos no son los mismos que los autotróficos en el desarrollo de plantas enteras (Jouyban *et al.*, 2013).

Sin embargo, al ser un sustrato sumamente importante también puede actuar como un factor de inhibición o un causante de estrés en las plantas cambiando con otros factores y pueden causar la reducción fotosintética. Si la energía lumínica absorbida llega a los centros de reacción, excede la cantidad de energía que puede utilizarse, lo cual puede dañar al aparato fotosintético (Casierra-Posada, 2007).

La fotoinhibición (PI) se definió por Kok (1956) como la reducción de la actividad fotosintética que ocurre con el exceso de iluminación. Sin embargo la exposición adicional a factores de estrés durante la exposición a la alta radiación aumenta el potencial inhibitorio. Además, la fotoinhibición juega un papel importante, ya que puede ser reversible protegiendo a los fotosistemas y también puede reflejar un daño al aparato fotosintético. Las características de este tipo de estrés dependen básicamente de la cantidad de luz a la que las plantas estén expuestas (Casierra-Posada, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad – Genética del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, México.

3.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry (*Solanum lycopersicum*). Las semillas de las colectas números (Núm.) 367 y 457 se obtuvieron en los municipios de Tantoyuca y Coyutla, Veracruz, respectivamente; la colecta número (Núm.) 300 en el municipio de las Jícaras, Guerrero (Figura 1). La cosecha de las semillas de las colectas Núm. 367 y 457 se hicieron en el año 2010 y las de la colecta Núm. 300 en el año 2009 (Figura 2). Todo el material vegetativo empleado en la investigación fue proporcionado por el Dr. Porfirio Ramírez Vallejo†.

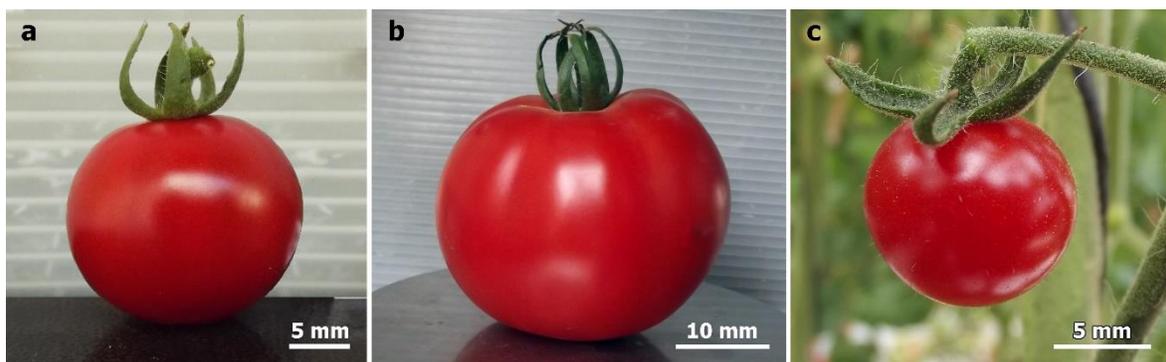


Figura 1. Colectas de jitomate silvestre tipo Cherry evaluadas por su tolerancia a bajas temperaturas. a) Colecta Núm. 300, b) Colecta Núm. 367, c) Colecta Núm. 457.

3.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación

En todos los experimentos de la investigación se usó el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962) (MS, Apéndice 1A) adicionado con sacarosa (30 g L^{-1}), agar (Sigma 9.5 g L^{-1}), mio-inositol (200 mg L^{-1}) y tiamina (2 mg L^{-1}). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N, mediante un potenciómetro Thermo Scientific® Orion 3 Star Plus. La

esterilización del medio de cultivo se hizo en una autoclave vertical (AESA®, modelo 300) a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 min.

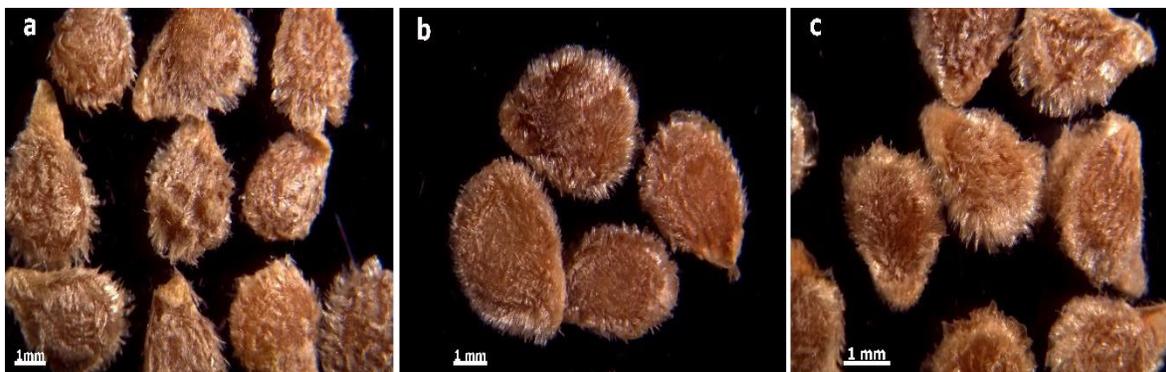


Figura 2. Semillas de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry usadas para la regeneración *in vitro* vía organogénesis. a) Colecta Núm. 300, b) Colecta Núm. 367, c) Colecta Núm. 457.

Los frascos de cultivo con el material sembrado de todos los experimentos se mantuvieron en el cuarto de incubación con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad proporcionado por lámparas Led cuya irradiancia es de 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 25 ± 2 °C y humedad relativa de 30%.

3.3 Regeneración de plantas vía organogénesis

3.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico y germinación *in vitro*

El cultivo aséptico se estableció a partir de semillas de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry. Con ayuda de un transiluminador y la técnica de inmersión en agua, se seleccionaron las semillas sanas y viables y se descartaron las vanas. Las semillas se lavaron con detergente comercial por 5 min; después se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 3.0% (v/v) durante 3 horas como un paso de escarificación química que contribuyera a reducir la barrera que pudiera significar la testa y mejorar la germinación. Enseguida, bajo condiciones asépticas, las semillas se enjuagaron seis veces con agua destilada esterilizada. Posteriormente, se sumergieron en tratamientos con

hipoclorito de sodio comercial (NaClO, cloralex®) y plata coloidal estable (Microdyn®) (Cuadro 2.)

Cuadro 2. Concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de desinfección superficial de semillas de tres colectas de jitomate tipo Cherry.

| Tratamiento (Núm.) | NaClO (% v/v) | Tiempo(min) |
|--------------------|---------------|-------------|
| 1 | 30% | 15 |
| 2 | 30% | 20 |
| 3 | 30% | 30 |
| 4 | 50% | 15 |
| 5 | 50% | 20 |
| 6 | 50% | 30 |

Después de cada tratamiento, las semillas se enjuagaron seis veces con agua destilada esterilizada y se sumergieron en una solución fungicida compuesta por Benlate® (4 g L⁻¹) + Captán® (4 g L⁻¹) durante 15 min. Las semillas desinfectadas se sembraron en frascos de vidrio de 125 mL de capacidad que contenían 30 mL del medio de cultivo básico MS (1962) a la mitad de la concentración de sales. La siembra de las semillas se hizo sumergiendo la zona donde emerge la radícula en el medio de cultivo con una profundidad de 1-2 mm.

3.3.1.1 Variables cuantificadas

Cada tercer día, durante un periodo de 15 d después de la siembra, se evaluaron el porcentaje de contaminación (semillas contaminadas por hongos o bacterias); el porcentaje de supervivencia y el porcentaje de germinación (plántulas con raíz y vástago). El experimento se condujo en un diseño completamente al azar, con 10 repeticiones por colecta. Cada unidad experimental estuvo constituida por un frasco de cultivo con tres semillas en cada frasco.

3.3.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar en arreglo factorial en el que se tuvieron 2 factores: A) Colectas (3 niveles: colecta 300, 357, 367), B) Tratamiento de desinfección (6 niveles: ver cuadro 2). Esto dio un total de 3 X 6 = 18 tratamientos

experimentales. Cada tratamiento estuvo representado por 10 repeticiones cuya unidad experimental fue un frasco con tres semillas. Los datos de cada variable se sometieron a un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y se aplicó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias.

3.3.2 Inducción de brotes

En esta etapa se usaron las plántulas de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry germinadas *in vitro*. Como explantes se evaluaron yemas apicales, yemas axilares y segmentos de tallo que se sembraron en frascos de vidrio de 140 mL de capacidad con 30 mL de medio básico MS (1962) (inciso 3.2) suplementado con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) (Cuadro 3). Los frascos sembrados se mantuvieron en las condiciones de cultivo indicadas en el inciso 3.2.

Cuadro 3. Concentraciones de bencilaminopurina (BAP) evaluadas en la inducción de brotes de tres colectas de jitomate tipo Cherry en tres tipos de explantes.

| Tratamiento (Núm.) | BAP | |
|-----------------------|--------------------|-------|
| | mg L ⁻¹ | μM |
| 1 Testigo | 0 | 0 |
| 2 | 1.5 | 6.66 |
| 3 | 2.5 | 11.10 |
| 4 | 3.5 | 15.54 |
| 5 | 4.5 | 19.98 |

3.3.2.1 Variables cuantificadas

Cuatro semanas después de la siembra se contabilizó, en cada genotipo evaluado, el número de explantes con brotes para, posteriormente determinar la brotación (B, %); el número de brotes por explante (BE); la longitud (cm) de los brotes (LB) y formación de callo (%).

3.3.2.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar en arreglo factorial, en el que se tuvieron 3 factores: A) Colectas (3 niveles: colecta 300, 357, 367), B) Tipos de explantes (3 niveles: yemas apicales, yemas axilares y segmentos de tallo), C)

Concentración de BAP (5 niveles: 0, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 mgL⁻¹). Esto dio un total de 3 X 3 X 5 = 45 tratamientos experimentales. Cada tratamiento estuvo representado por 10 repeticiones cuya unidad experimental fue un frasco con un explante. Los datos de cada variable se sometieron a un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y se aplicó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias.

3.3.3 Multiplicación de brotes

Se evaluaron explantes de yemas apicales de 1.0 cm de longitud disecados de plantas *in vitro* de 5 y 10 cm de altura de cada una de las tres colectas del jitomate silvestre tipo Cherry. Los explantes se sembraron en frascos de vidrio de 140 mL de capacidad con 30 mL de medio básico de cultivo MS (1962) adicionado con BAP, cinetina y ácido naftalenacético (ANA) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina evaluadas en la multiplicación de brotes de tres genotipos silvestres de jitomate tipo Cherry.

| Tratamiento (Núm.) | BAP + 0.1 mg L ⁻¹ ANA | | CIN + 0.1 mg L ⁻¹ ANA | |
|-----------------------|----------------------------------|------|----------------------------------|------|
| | mg L ⁻¹ | μM | mg L ⁻¹ | μM |
| 1 Testigo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0.5 | 2.22 | 0.5 | 2.36 |
| 3 | 1.0 | 4.44 | 1.0 | 4.64 |

3.3.3.1 Variables cuantificadas

Tres semanas después de la siembra se contabilizó en cada colecta evaluada el número de explantes con brotes para posteriormente determinar la brotación (B, %); el número de brotes por explante (BE) y la longitud (cm) de los brotes (LB), % de callo.

3.3.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar en arreglo factorial. Los factores de estudio fueron: A) Colectas (3 niveles: colecta 300, 357, 367) y B) Concentración de la combinación BAP y Kin + ANA (3 niveles: ver cuadro 4). Esto dio un total de 3 X 3 = 9 tratamientos experimentales. Cada tratamiento estuvo representado por 10 repeticiones cuya unidad experimental fue un frasco con un explante. Los datos de cada

variable se sometieron a un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y se aplicó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias.

3.3.4 Enraizamiento *in vitro* de plantas

Se seleccionaron brotes de 1-2 cm de altura de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry y se colocaron en frascos de 235 mL de capacidad con 40 mL del medio de cultivo básico MS (1962) a la mitad de concentración de sales.

3.3.4.1 Variables cuantificadas

Dos semanas después de la siembra se contabilizó, en cada colecta evaluada, el enraizamiento (%), el número de raíces (R), longitud de raíz (L, cm) y altura de plántula (AP, cm).

3.3.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple en el que se evaluaron 3 tratamientos experimentales (colectas). Cada tratamiento estuvo representado por 12 repeticiones cuya unidad experimental fue un frasco con cuatro plántulas. Los datos de cada variable se sometieron a un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y se aplicó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias.

3.3.5 Aclimatación

La aclimatación se estableció a partir de plántulas de 5 y 10 cm de altura de cada una de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry. Las plántulas se retiraron de los frascos de cultivo y se podó la raíz hasta dejarlas de 1 cm aproximadamente de longitud; posteriormente se sumergieron en una solución fungicida compuesta por Benlate® (4 g L⁻¹) + Captán® (4 g L⁻¹) durante un minuto y se colocaron en vasos de unicel previamente perforados y rellenos con una mezcla de sustrato humedecido conformado por vermiculita y peat moss en proporción 1:1 (Mattson, 2013). Después, cada vaso se cubrió con una bolsa de polietileno transparente sujeta con una liga. Las plantas se colocaron en

condiciones de invernadero y después de tres días se hicieron dos perforaciones en la bolsa de plástico, a los cinco días se hicieron otras cuatro perforaciones y finalmente se retiró la bolsa a las dos semanas.

3.3.5.1 Variables cuantificadas

Después de dos semanas se evaluó la tasa de supervivencia de plantas (%) de las tres colectas.

3.3.5.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple en el que se evaluaron 3 tratamientos experimentales (colectas), cada uno de los cuales estuvo representado por 15 repeticiones cuya unidad experimental fue un vaso con una plántula. Los datos de supervivencia se sometieron a un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y se aplicó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias.

3.4 Determinación de la tolerancia de plántulas *in vitro* a bajas temperaturas

Para evaluar la tolerancia a bajas temperaturas de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry se evaluaron diferentes tiempos de exposición a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se empleó una cámara de crecimiento ICP-20 Lumistell[®] (-10 a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) con control de temperatura. Se usaron plántulas enraizadas *in vitro* de 2 y 4 cm de altura de las tres colectas; las plantas se mantuvieron en medio de cultivo MS (1962) a la mitad de concentración de sales, en frascos de 235 mL de capacidad con 40 mL del medio e incubadas en las condiciones indicadas en el inciso 3.2.

Se evaluó la respuesta fisiológica de las plantas de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry expuestas durante 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos a una temperatura de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. La temperatura de la cámara de crecimiento se ajustó a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un termómetro de mercurio.

También se determinó la temperatura del interior de los frascos de cultivo con ayuda de un sensor de temperatura Mod. T27D 3-Digital 0.56.

Los frascos con las plantas se introdujeron a la cámara de crecimiento después de una hora de haber alcanzado la temperatura de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los tiempos de exposición se contaron una vez que la cámara de crecimiento, el termómetro de mercurio y la temperatura interna de los frascos alcanzaran nuevamente los $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de cumplido cada tiempo de exposición, los frascos se retiraron y trasladaron a condiciones de temperatura ambiente de $22 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora en el laboratorio para la estabilización de la temperatura. Posteriormente, las plantas se colocaron en las condiciones de incubación señaladas en el inciso 3.2 y durante dos semanas se mantuvieron bajo observación diaria para evaluar las respuestas fisiológicas.

3.4.1.1 Variables cuantificadas

Las variables fueron cuantificadas diariamente durante un lapso de dos semanas midiendo la tasa de supervivencia (%) y crecimiento de la planta, registradas como altura de planta (Alt), número de hojas (Núm.); daño (% D), número de raíces, (NR) y longitud de raíces (Lg).

3.4.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar en arreglo factorial en el que se evaluaron 3 factores: A) Colectas (3 niveles: colecta 300, 357, 367), B) Tamaño de plantas (2 niveles: 2 y 4 cm de longitud) y C) Tiempo de exposición (6 niveles: 10, 20, 30, 40, 50, 60 min) ($3 \times 2 \times 6 = 36$ tratamientos en total). Los tratamientos estuvieron representados por 12 repeticiones cuya unidad experimental fue un frasco con cuatro plántulas (es decir, 3 frascos por tratamiento: 36 tratamientos \times 3 frascos = 108 frascos en todo el experimento). Los datos de cada variable se sometieron a un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y se aplicó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de medias.

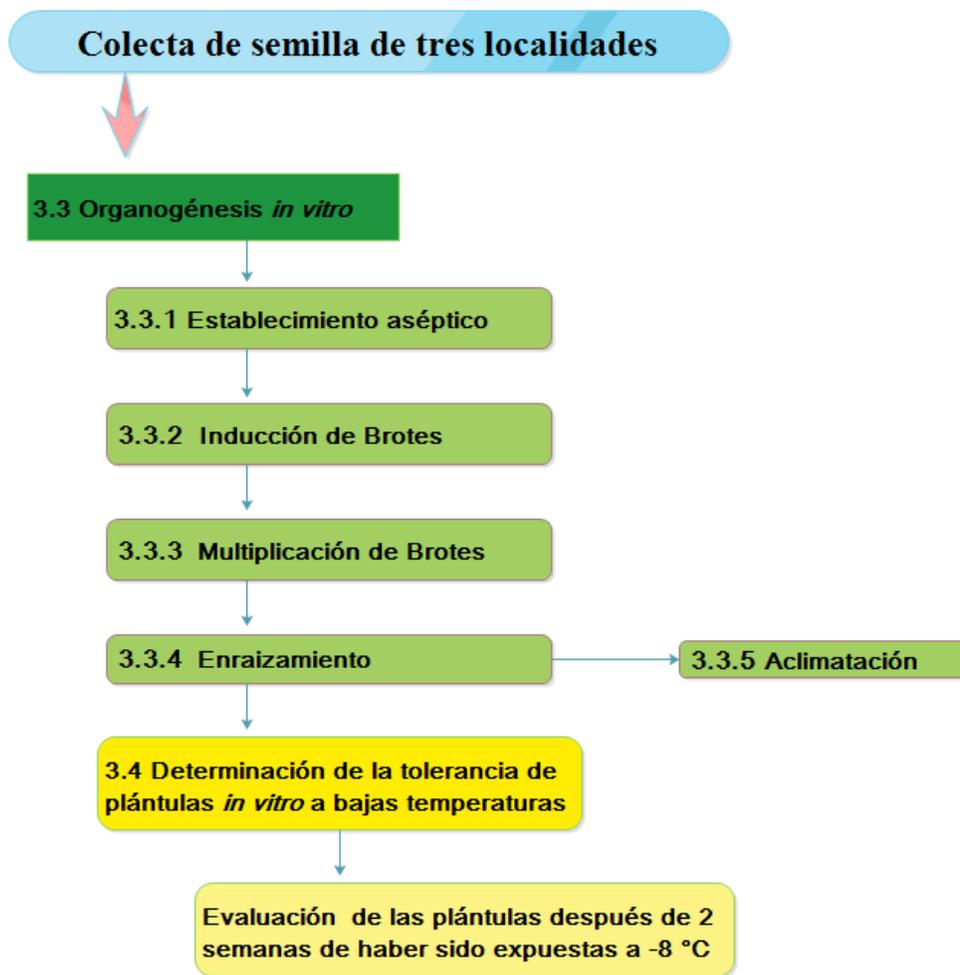


Figura 3. Proceso metodológico de la regeneración *in vitro* de colectas de jitomate y la tolerancia a bajas temperaturas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento del cultivo aséptico

Todos los tratamientos de desinfección probados resultaron eficientes para el establecimiento del cultivo aséptico de las semillas de las tres colectas de jitomate, por lo que no se presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Apéndice 2A). La contaminación fue nula por lo que cualquier método garantiza la obtención de semillas limpias para su siembra *in vitro*. Sin embargo, se definió como el mejor tratamiento el que estuvo constituido por la menor concentración de NaOCl (30%) y menor tiempo de inmersión (15 min); con la finalidad de ocasionar el menor daño posible a las semillas.

Las tres colectas no presentaron un efecto significativo en el uso de los tratamientos de desinfección, tampoco en la interacción de los métodos de desinfección con respecto a las tres colectas; sin embargo, mostraron un 100 % de efectividad en el uso de cualquier método de desinfección en las tres colectas.

La acción desinfectante del cloro o sus compuestos radica en su capacidad de oxidación. En presencia de agua el cloro, bien sea en forma gaseosa (Cl_2) o como hipoclorito de sodio (NaOCl), reacciona para formar ácido hipocloroso (HOCl), la forma con mayor potencial de óxido-reducción y es más efectiva como desinfectante, según las reacciones que se presentan (Smith, 2013).

En una solución con pH 5 todo el cloro se encuentra en forma de ácido hipocloroso, a medida que el pH aumenta este ácido se disocia en $\text{ClO}^- + \text{H}^+$ a $\text{pH} > 7.5$ y una temperatura de $20\text{ }^\circ\text{C}$ (o $\text{pH} > 7.8$ a $0\text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura); entonces comienzan a predominar los iones de hipoclorito y existen casi exclusivamente a partir de pH 9.5 (Madigan *et al.*, 2003; 2009).

En el agua, el cloro reacciona rápidamente con las sustancias inorgánicas reductoras del agua y un poco más lentamente con las sustancias orgánicas susceptibles de ser oxidadas. Para eliminar bacterias y organismos eucariontes, el agente oxidante debe atravesar la membrana plasmática, que es de naturaleza fosfolipídica, y oxidar enzimas respiratorias que contengan grupos sulfhídrico (-SH). Las moléculas son polares, se disuelven mejor en

las membranas que en las polares. Una de las enzimas más afectada es la succinato deshidrogenasa que interviene en el ciclo de Krebs, cuando esta enzima se afecta se frenan los mecanismos celulares de obtención de energía y tienden a perecer. En el caso de los virus el NaOCl y sus agentes oxidantes actúan directamente produciendo oxidaciones sobre los ácidos nucleicos (Smith, 2013).

En general, la eficiencia de la desinfección con NaOCl depende del pH, la temperatura, de las partículas en suspensión, de la composición química del agua, de la concentración del desinfectante y del tiempo de contacto (Madigan *et al.*, 2003; 2009). También se pueden utilizar otros desinfectantes como el hipoclorito de calcio (CaClO), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), Etanol, Isopropanol, Cloro en gas (Cl₂), dicloroisocinato de sodio (NaDCC), entre otros para eliminar agentes contaminantes externos.

Algunos explantes son más complicados de desinfectar respecto a otros para el establecimiento de cultivos asépticos. La concentración de NaOCl y el tiempo de exposición empleados pueden variar dependiendo de la especie y el tipo de explante. Los tiempos de inmersión deben ser cortos cuando se desinfectan explantes delicados, como hojas o meristemos, ya que se pueden generar daños al tejido por la forma de actuar del NaOCl. Las concentraciones recomendadas de NaOCl pueden ser desde 3 hasta 10% con tiempos de inmersión de 3 a 10 min (Smith, 2013).

Para el caso de las semillas las concentraciones de NaOCl pueden ser más elevadas, desde 30 a 50 % con tiempos de inmersión entre 5 y 60 min. En estos explantes el proceso de desinfección puede ser más eficiente porque la testa que protege al embrión lo aísla de microorganismos contaminantes. Para la desinfección de semillas de solanáceas u hortalizas resulta eficiente el uso de CaOCl ó NaOCl y su éxito dependerá de la concentración y tiempo de inmersión (Smith, 2013).

Si bien todas las dosis de NaOCl y tiempos de inmersión evaluados en esta investigación resultaron eficientes para el control de microorganismos contaminantes, es importante señalar que las condiciones de almacenamiento de las semillas son vitales para el éxito de los métodos de desinfección.

4.2 Germinación *in vitro*

Respecto a la germinación de las semillas, el porcentaje promedio para las tres colectas de jitomate fue de 60%. Este porcentaje es relativamente bajo porque el tiempo de almacenamiento de las semillas fue de 5 años y posiblemente habían perdido viabilidad. A partir de las plántulas germinadas fue posible disectar explantes que se usaron para la obtención de mayor cantidad de plantas. El tiempo de germinación de las tres colectas fue diferente; las semillas de la colecta No. 300 fueron más vigorosas y presentaron una tasa de germinación más rápida, así como un tiempo reducido para el inicio de la emergencia de la radícula, el cual fue de cuatro días después de la siembra. Las semillas de la colecta No. 457 tardaron cinco días y finalmente la colecta No. 367 dio inicio al sexto día (Figura 5).

Cuadro 5. Porcentaje de germinación de semillas de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry durante el establecimiento del cultivo aséptico

| Tratamiento No. | NaClO (%) + tiempo (min) | Colecta Núm. 300 | Colecta Núm. 367 | Colecta Núm. 457 |
|-----------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 30 + 15 | 50 | 48 | 94 |
| 2 | 30 + 20 | 26 | 88 | 94 |
| 3 | 30 + 30 | 48 | 58 | 100 |
| 4 | 50 + 15 | 52 | 58 | 78 |
| 5 | 50 + 20 | 80 | 62 | 6 |
| 6 | 50 + 30 | 58 | 74 | 32 |

Normalmente, la viabilidad de las semillas se ve afectada por el método de obtención de las semillas y el tiempo que transcurre antes de la aplicación de un método de conservación. Si las semillas son conservadas en temperatura ambiente pueden perder más rápido la viabilidad debido a la degradación de los almidones y proteínas que se encuentran dentro de las semillas. En cambio, si se utiliza un método adecuado con un rango de temperaturas entre 4 y 10 °C se puede prolongar la viabilidad hasta por ocho años (Desai *et al.*, 1997; 2004).

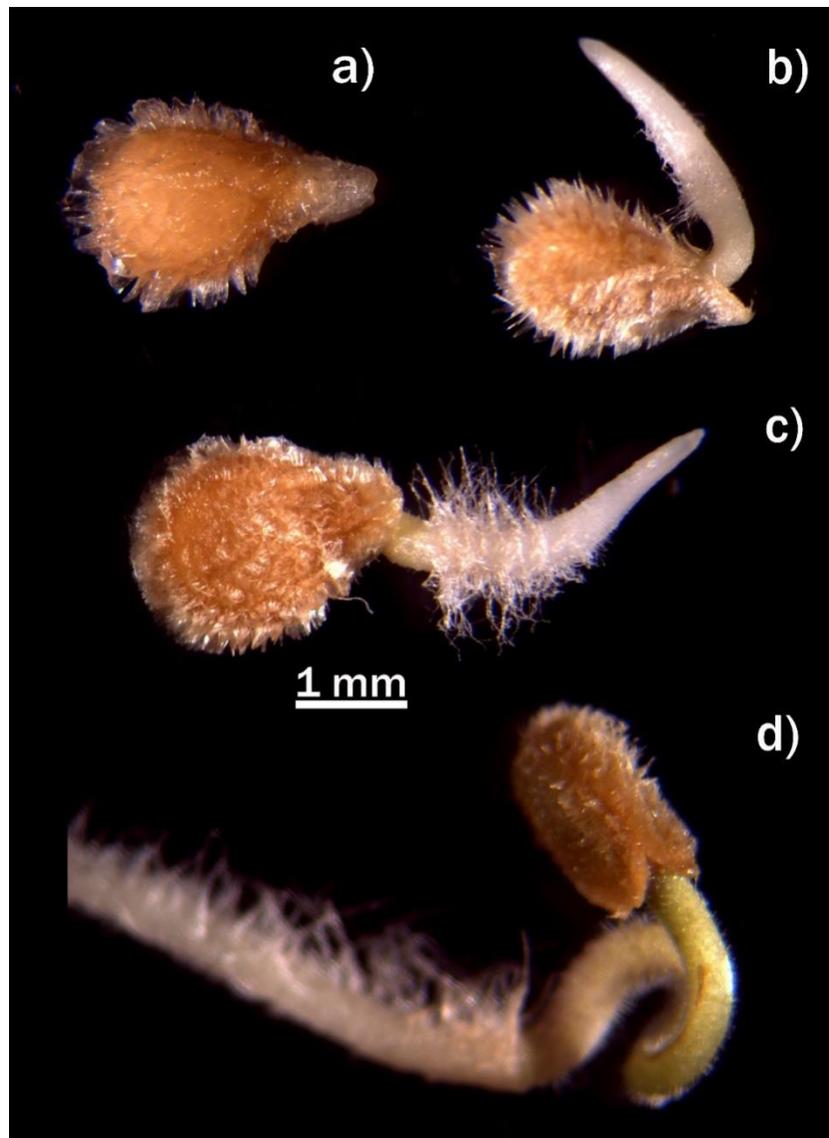


Figura 4. Germinación de semillas de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry. a) Emergencia de la radícula a los cinco días; b) seis días, c) siete días, y d) ocho días después de la siembra.

La germinación *in vitro* es una herramienta para la conservación y el incremento de germoplasma libres de bacterias, hongos y virus, además de ser una alternativa para el establecimiento de bancos de germoplasma, sobre todo para el almacenamiento de semillas que presentan dificultades (Desai *et al.*, 1997; 2004).

La reproducción de las plantas a partir de semilla constituye el método más frecuente de propagación en los cultivos. Sin embargo, el estado de latencia presente en muchas semillas de especies silvestres reduce significativamente su eficacia. Cuando no es viable la propagación por semillas o existe la necesidad de propagar un determinado genotipo, se puede recurrir a las técnicas convencionales de propagación vegetativa o el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Específicamente, la micropropagación resulta la mejor opción debido a las altas tasas de multiplicación que se consiguen a partir de yemas o meristemos (Alegría, 2001).

4.3 Inducción de brotes vía organogénesis directa

Con la finalidad de establecer la regeneración de plantas de las tres colectas de jitomate vía organogénesis se evaluó la capacidad morfogénica de yemas apicales, yemas axilares y segmentos de tallo para la inducción de brotes. Los explantes se establecieron en cuatro concentraciones de BAP (1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 mg L⁻¹) adicionadas al medio de cultivo.

Las concentraciones de BAP, el tipo de explante y la interacción entre ambos factores afectaron significativamente el número de brotes por explante, la longitud de los brotes y la tasa de formación de callos en las tres colectas de jitomate evaluadas. La variable de brotación resultó no significativa para las tres colectas ($P \leq 0.05$, Apéndice 3A, 4A y 5A).

Las concentraciones de BAP y tipos de explantes probados promovieron la brotación de 89% en promedio en las tres colectas de jitomate. Sin embargo, el tipo de explante resultó un factor importante para la brotación en las colectas No. 300 y 367 mientras que para la colecta No. 457 estuvo asociada con la concentración de bencilaminopurina (BAP) más que con el tipo de explante.

En general, se observó que los tres tipos de explantes evaluados fueron capaces de producir brotes durante esta etapa de la micropropagación. Sin embargo, los explantes de yema apical fueron los que mostraron mejor respuesta en el número de brotes por explante (BE) y fue consistente en las tres colectas de jitomate tipo Cherry evaluadas. El número promedio de brotes por explante en las tres colectas fue de 1.6 seguido por los explantes de yema

axilar con 1 brote por explante y finalmente los segmentos de tallo con 0.4 brotes por explante (Cuadro 6).

La concentración de BAP que mejor favoreció el número de brotes por explante fue la de 2.5 mg L⁻¹ para las tres colectas. El número promedio de brotes fue de 1.7, seguido de la concentración de 1.5 mg L⁻¹ con 1.4 brotes. Las concentraciones de 3.5 y 4.5 mg L⁻¹ tuvieron un efecto negativo, ya que redujeron la inducción de brotes (Cuadro 6; Apéndices 3A, 4A y 5A).

Cuadro 6. Efecto del tipo de explante y bencilaminopurina (BAP) sobre el número de brotes por explante en la etapa de inducción en colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las 4 semanas de cultivo.

| Factor | Colecta No. 300 [¶] | Colecta No. 367 [¶] | Colecta No. 457 [¶] |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Tipo de explante | | | |
| Yema apical | 2.075 a | 1.150 a | 1.825 a |
| Yema axilar | 1.075 b | 0.725 b | 1.225 b |
| Segmentos de tallo | 0.550 b | 0.325 c | 0.575 c |
| BAP (mg L⁻¹) | | | |
| 1.5 | 1.533 a | 1.100 a | 1.800 a |
| 2.5 | 1.966 a | 1.200 a | 2.100 a |
| 3.5 | 0.800 b | 0.400 b | 0.666 b |
| 4.5 | 0.633 b | 0.233 b | 0.266 b |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (P≤0.05).

En la interacción tipo de explante y dosis de BAP, la mayor cantidad de brotes se obtuvo con explantes de yema apical cuando se cultivaron con 2.5 mg L⁻¹ de BAP en las tres colectas. En esta concentración hormonal el número promedio de brotes fue de 2.8 por cada explante de yema apical.

La colecta No. 300 fue la que produjo el mayor número de brotes por explante con 3.4 seguida de la colecta No. 457 con 3.1 brotes y la colecta No. 367 con 2 brotes por explante (Cuadro 7; Figura 6).

Cuadro 7. Efecto del tipo de explante y BAP sobre el número de brotes en la etapa de inducción en tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las 4 semanas de cultivo.

| Tipo de explante | BAP (mg L ⁻¹) | Colecta No. 300 [¶] | Colecta No. 367 [¶] | Colecta No. 457 [¶] |
|--------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Yema apical | 1.5 | 2.6 ab | 1.8 a | 2.9 ab |
| | 2.5 | 3.4 a | 2.0 a | 3.1 a |
| | 3.5 | 1.3 bc | 0.5 b | 0.8 cde |
| | 4.5 | 1.0 bc | 0.3 b | 0.5 de |
| Yema axilar | 1.5 | 1.3 bc | 1.0 ab | 1.6 bcd |
| | 2.5 | 1.6 bc | 1.1 ab | 2.1 abc |
| | 3.5 | 0.8 c | 0.5 b | 0.9 cde |
| | 4.5 | 0.6 c | 0.3 b | 0.3 de |
| Segmentos de tallo | 1.5 | 0.7 c | 0.5 b | 0.9 cde |
| | 2.5 | 0.9 c | 0.5 b | 1.1 cde |
| | 3.5 | 0.3 c | 0.2 b | 0.3 de |
| | 4.5 | 0.3 c | 0.1 b | 0.0 e |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).



Figura 5. Inducción de brotes en tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry con 2.5 mg L⁻¹ de BAP (usando como explante la yema apical) a las cuatro semanas de cultivo. a) Colecta Núm. 300; b) Colecta Núm. 367; c) Colecta Núm. 457.

La BAP es una de las citocininas más usadas para la inducción de brotes en los procesos de morfogénesis *in vitro*, ya sea sola o en combinación con alguna auxina. La efectividad del BAP para inducir la organogénesis se ha reportado en tomate silvestre (Rao *et al.*, 2005; Devi *et al.*, 2008; Rashid y Bal, 2010) y en otras especies de solanáceas como papa, tomate verde y papa dulce (Lukatkin *et al.*, 2012).

Gatita y Almeida (2003) reportaron que los explantes de hipocotilos y cotiledones de plántulas *in vitro* de *Cyphomandra betacea* produjeron 4.1 y 2.8 brotes por explante, respectivamente, cuando se cultivaron con 2 mg L⁻¹ de BAP combinada con 0.5 mg L⁻¹ ácido indolacético (AIA).

En un estudio con jitomates, Bathía *et al.* (2004) recopilaron que con explantes de hoja, cotiledones y epicotilos con Zeatina 4 mg L⁻¹ se obtenían brotes, con BAP 2 - 3 mg L⁻¹ con AIA 0.1 mg L⁻¹ también se podían inducir brotes, con Cinetina 1 – 2 mg L⁻¹ de igual manera se podían inducir brotes, entre otras.

Respecto a la variable longitud de brote, para la colecta No. 300 el tipo de explante fue el factor de mayor influencia seguido de la concentración de BAP y la interacción de ambos factores. En cambio, para las colectas No. 367 y 457 la longitud del brote estuvo asociada con la concentración de BAP (Apéndices 3A, 4A y 5A). Los mayores valores de longitud de brote en las tres colectas de jitomate se alcanzaron con la concentración de 1.5 mg L⁻¹ de BAP en brotes obtenidos a partir de yemas apicales (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto del BAP y tipo de explante sobre la longitud de brotes (cm) en la etapa de inducción en colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las 4 semanas de cultivo.

| Factor | Colecta No. 300 [¶] | Colecta No. 367 [¶] | Colecta No. 457 [¶] |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| BAP (mg L⁻¹) | | | |
| 1.5 | 0.32 a | 0.26 a | 0.24 a |
| 2.5 | 0.25 ab | 0.21 ab | 0.26 a |
| 3.5 | 0.19 ab | 0.12 bc | 0.19 a |
| 4.5 | 0.15 b | 0.08 c | 0.07 b |
| Tipo de explante | | | |
| Yema apical | 0.28 a | 0.23 a | 0.22 a |
| Yema axilar | 0.25 ba | 0.16 ab | 0.21 a |
| Segmentos de tallo | 0.14 b | 0.11 b | 0.13 b |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (P≤0.05).

En la interacción tipo de explante y concentración de BAP, la mayor longitud de brote en la Colectas No. 300, 367 y 457 se obtuvo con 1.5 mg L⁻¹ BAP en explantes de yema apical con 0.42, 0.37 y 0.29 cm (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto del BAP en explantes de jitomate silvestre tipo Cherry sobre la longitud de brotes (cm) en la etapa de inducción Cherry a las 4 semanas de cultivo.

| Tipo de explante | BAP (mg L ⁻¹) | Colecta No. 300 [¶] | Colecta No. 367 [¶] | Colecta No. 457 [¶] |
|--------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Yema apical | 1.5 | 0.42 a | 0.37 a | 0.29 a |
| | 2.5 | 0.34 ab | 0.25 ab | 0.28 a |
| | 3.5 | 0.19 ab | 0.18 ab | 0.20 ab |
| | 4.5 | 0.20 ab | 0.12 ab | 0.13 ab |
| Yema axilar | 1.5 | 0.36 a | 0.25 ab | 0.22 ab |
| | 2.5 | 0.20 ab | 0.17 ab | 0.29 a |
| | 3.5 | 0.25 ab | 0.14 ab | 0.27 a |
| | 4.5 | 0.20 ab | 0.10 b | 0.09 ab |
| Segmentos de tallo | 1.5 | 0.18 ab | 0.16 ab | 0.21 ab |
| | 2.5 | 0.22 ab | 0.23 ab | 0.22 ab |
| | 3.5 | 0.13 ab | 0.05 b | 0.10 ab |
| | 4.5 | 0.05 b | 0.03 b | 0.00 b |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (P≤0.05).

La formación de callo fue otra respuesta morfogénica que se presentó en los cultivos durante la etapa de inducción de brotes. El tipo explante fue el factor que mayor efecto tuvo sobre la formación de callo en la Colecta No. 300; en cambio, en las Colectas No. 367 y 467 la respuesta fue influencia principalmente por la concentración de BAP (Apéndices 3A, 4A y 5A). Los mayores porcentaje de formación de callo en las tres colectas de jitomate se alcanzaron con 1.5 mg L⁻¹ de BAP en los explantes de yema apical (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto del BAP y tipo de explante sobre la formación de callo (%) en colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las cuatro semanas de cultivo.

| Factor | Colecta No. 300 [¶] | Colecta No. 367 [¶] | Colecta No. 457 [¶] |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| BAP (mg L⁻¹) | | | |
| 1.5 | 76 a | 76 a | 86 a |
| 2.5 | 73 a | 63 ab | 80 ab |
| 3.5 | 50 a | 40 bc | 53 bc |
| 4.5 | 50 a | 23 c | 26 c |
| Tipo de explante | | | |
| Yema apical | 80 a | 65 a | 77 a |
| Yema axilar | 65 ab | 55 ab | 67 a |
| Segmentos de tallo | 42 b | 32 b | 40 b |

[¶]Medias con diferentes letras en columnas significativamente diferentes (P≤0.05).

En la interacción de ambos factores el mayor porcentaje de formación de callo (100%) se obtuvo con la dosis de 1.5 mg L⁻¹ de BAP en explantes de yemas apicales en las tres colectas de jitomate. También, todos los explantes de segmentos de tallo de las tres colectas formaron callo pero con la dosis de 2.5 mg L⁻¹ de BAP (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto del BAP en explantes de jitomate silvestre tipo Cherry sobre la formación de callo (%) Cherry a las cuatro semanas de cultivo.

| Tipo de explante | BAP (mg L ⁻¹) | Colecta No. 300 [¶] | Colecta No. 367 [¶] | Colecta No. 457 [¶] |
|--------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Yema apical | 1.5 | 100 a | 100 a | 100 a |
| | 2.5 | 100 a | 80 ab | 100 a |
| | 3.5 | 60 ab | 50 abc | 60 abc |
| | 4.5 | 60 ab | 30 bc | 50 abc |
| Yema axilar | 1.5 | 80 ab | 80 ab | 80 ab |
| | 2.5 | 60 ab | 60 abc | 90 ab |
| | 3.5 | 60 ab | 50 abc | 70 ab |
| | 4.5 | 60 ab | 30 bc | 30 bc |
| Segmentos de tallo | 1.5 | 50 ab | 50 abc | 60 abc |
| | 2.5 | 100 a | 100 a | 100 a |
| | 3.5 | 100 a | 80 ab | 100 a |
| | 4.5 | 60 ab | 50 abc | 60 abc |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna de cada colecta son significativamente diferentes (p≤0.05).

La formación de callo en la etapa de inducción de brotes es una respuesta que está estrechamente relacionada con el genotipo, el tipo de explante y los reguladores de crecimiento que se utilizan para la regeneración *in vitro* (Bathía *et al.*, 2004). La callogénesis es una respuesta morfogénica que puede ser utilizada para la inducción indirecta de brotes o para el establecimiento de cultivos en suspensión. Es una alternativa para la inducción de brotes cuando la organogénesis directa no es viable (Bathía *et al.*, 2004; 2005).

Los callos obtenidos en esta etapa de inducción de brotes fueron de color blanco a verde de un tamaño aproximado de 2 cm. Los callos no fueron la primer respuesta esperada en esta etapa y debido a que la intención de esta etapa era la obtención de brotes de forma directa no se les dio seguimiento a los callos y se mantuvieron en el cuarto de incubación para conservación. Desafortunadamente, durante los subcultivos la respuesta no fue favorable, ya que murió la gran mayoría de ellos o ennegrecieron.

4.4 Multiplicación de brotes

Los brotes de las tres colectas de jitomate generados en la fase de inducción fueron la fuente de explantes para la etapa de multiplicación; se evaluó el efecto del BAP y Cinetina (Kin) combinadas con ANA (0.1 mg L⁻¹) con la finalidad de incrementar el número de brotes.

El genotipo, la concentración de citocininas y la interacción de ambos factores sólo afectaron significativamente el número de brotes por explante; la brotación resultó afectada únicamente por la concentración de citocininas y su interacción con el genotipo; mientras que la longitud del brote sólo fue afectada por la concentración de citocinina. La formación de callos resultó no significativa ($P \leq 0.05$, Apéndice 15A).

La brotación, medida como el número de explantes que generaron brotes, tuvo un comportamiento similar en las tres colectas de jitomate, lo que indica que el genotipo no tuvo una influencia en la respuesta. En cambio, el tipo y dosis de citocinina produjeron respuestas diferentes; el medio adicionado con 0.5 mg L⁻¹ de cinetina fue donde se obtuvo

el mayor porcentaje de brotación promedio con 93%, seguido por el medio libre de reguladores de crecimiento (Cuadro 12).

Cuadro 12. Efecto del BAP sobre la brotación (B, %), número de brotes por explante (BE) y la longitud de brotes (LB, cm) en la etapa de multiplicación de brotes en colectas de jitomate a las 4 semanas de cultivo.

| BAP (mg L ⁻¹) + Kin (mg L ⁻¹) [¶] | B [¶] | BE [¶] | LB [¶] |
|--|----------------|-----------------|-----------------|
| Sin reguladores de crecimiento | 73.0 ab | 0.8 b | 0.20 ab |
| 0.5 + 0 | 66.0 ab | 1.0 b | 0.19 ab |
| 1.0 + 0 | 50.0 b | 0.8 b | 0.14 b |
| 0 + 0.5 | 93.0 a | 3.5 a | 0.26 a |
| 0 + 1.0 | 53.0 b | 1.0 b | 0.14 b |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (P≤0.05). Cada tratamiento de BAP + KIN se combinó con 0.1 mg L⁻¹ de ANA.

En cuanto al número de brotes por explante, la mejor respuesta fue promovida por la cinetina (0.5 mg L⁻¹), ya que el número promedio fue de 3.5 brotes (Cuadro 12). El genotipo también tuvo influencia sobre esta variable ya que el comportamiento de las tres colectas fue diferente; la mayor cantidad de brotes se presentó en la Colecta No. 300 con 2 brotes, seguida de la Colecta No. 457 con 1.4 brotes y la Colecta No. 367 con 0.8 brotes.

Respecto a la longitud de los brotes, los mayores valores (0.26 cm) se presentaron en los explantes cultivados con 0.5 mg L⁻¹ de cinetina seguido por el medio libre de reguladores de crecimiento (Cuadro 12).

En la interacción del genotipo y la concentración de citocinina los mayores porcentajes de brotación (100%) se obtuvieron en las Colecta No. 367 y 457 con 0.5 mg L⁻¹ de cinetina; en la colecta No. 300 el porcentaje más alto fue de 90% y se obtuvo en el medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento (Cuadro 13).

Respecto al número de brotes por explante, la mayor cantidad se produjo en la Colecta No. 300 con 5.2 brotes cuando se cultivaron con 0.5 mg L⁻¹ de cinetina seguida de la Colecta No. 457 con 3.6 brotes con esta misma dosis de cinetina. En contraste, la Colecta No. 367 también produjo la mayor cantidad de brotes con esta concentración de cinetina pero la

respuesta fue considerablemente menor (1.7 brotes) que las otras dos colectas (Cuadro 13, Figura 7).

Cuadro 13. Efecto del genotipo y citocininas sobre la brotación (B, %) y el número de brotes por explante (BE) en la etapa de multiplicación en colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las 4 semanas de cultivo.

| Genotipo | BAP + Cinetina (mg L ⁻¹) [¶] | B [¶] | BE [¶] |
|------------------------|---|----------------|-----------------|
| Colecta No. 300 | Testigo | 90.0 ab | 0.9 c |
| | 0.5 + 0 | 50.0 ab | 1.1 c |
| | 1.0 + 0 | 40.0 ab | 1.1 c |
| | 0 + 0.5 | 80.0 ab | 5.2 a |
| | 0 + 1.0 | 80.0 ab | 1.9 bc |
| Colecta No. 367 | Testigo | 60.0 ab | 0.6 c |
| | 0.5 + 0 | 60.0 ab | 0.6 c |
| | 1.0 + 0 | 80.0 ab | 0.8 c |
| | 0 + 0.5 | 100.0 a | 1.7 bc |
| | 0 + 1.0 | 30.0 b | 0.3 c |
| Colecta No. 457 | Testigo | 70.0 ab | 0.9 c |
| | 0.5 + 0 | 90.0 ab | 1.3 c |
| | 1.0 + 0 | 30.0 b | 0.6 c |
| | 0 + 0.5 | 100.0 a | 3.6 ab |
| | 0 + 1.0 | 50.0 ab | 0.8 c |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (P≤0.05). Cada tratamiento de BAP + KIN se combinó con 0.1 mg L⁻¹ de ANA.

La multiplicación de los brotes se vio afectada por la concentración de los reguladores de crecimiento más que por el tipo de colecta; también se observó que las dosis altas de BAP redujeron la producción de brotes. Resultados similares también se han reportado en otras especies de jitomate con el uso de BAP de (2 – 4mg L⁻¹) obteniendo de 3 – 5 brotes por explante (Namitha y Negi, 2013). Las variedades silvestres no responden de la misma manera que las líneas comerciales, además que cada línea o colecta puede mostrar cierta afinidad por algún regulador de crecimiento en particular, lo cual lleva a un comportamiento distinto para cada línea con la aplicación de reguladores de crecimiento (Namitha y Negi, 2013).

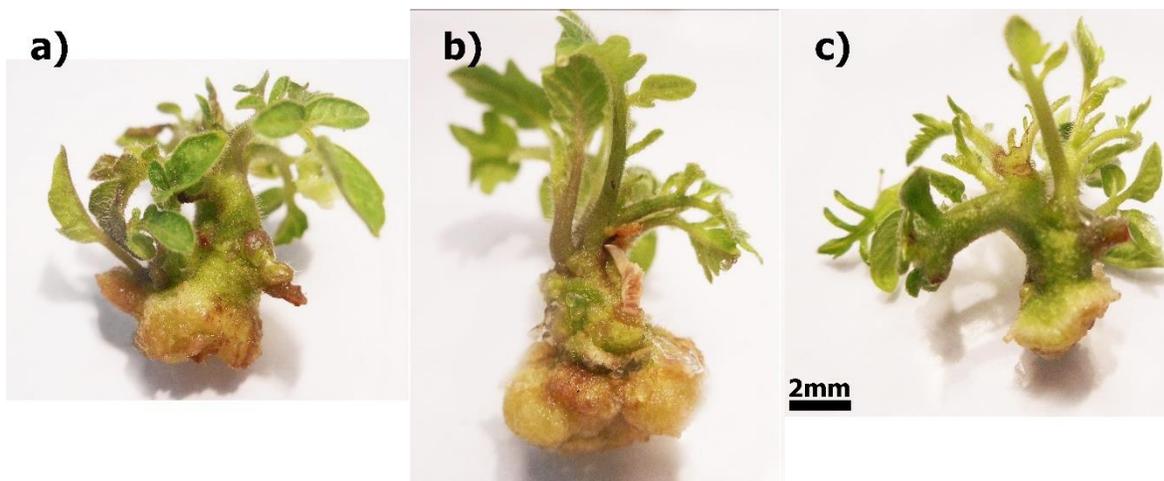


Figura 6. Multiplicación de brotes de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry cultivados con 0.5 mg L^{-1} de cinetina a las cuatro semanas. a) Colecta Núm. 300; b) Colecta Núm. 367; c) Colecta Núm. 457.

La cantidad de brotes obtenidos en esta etapa representó un aumento del doble de los alcanzados en la inducción. En líneas como Haelani, TH802, VFN8, TH2312 de jitomate donde Bhushan y Gupta (2010) reportaron su mejor respuesta con el uso de 2 mg L^{-1} de mg L^{-1} de BAP obteniendo de 3 – 5.5 brotes por explante.

4.5 Enraizamiento

Los brotes de las tres colectas de jitomate establecidos en los tratamientos de inducción y multiplicación de brotes mostraron capacidad morfogénica para la formación de raíces; debido a esta respuesta no fue necesario diseñar un nuevo tratamiento para la inducción de raíces y los brotes se establecieron en medio MS (1962) a la mitad de concentración de sales.

En esta etapa no se detectaron diferencias significativas estadísticas entre las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry sobre el enraizamiento (%), número de raíces (R), y longitud de raíces (L), solo se presentaron diferencias significativas en la altura de plántula (AP) ($P \leq 0.05$; Apéndice 17A y 18A). El enraizamiento de las plántulas en las tres colectas se presentó a los seis días de cultivo (Figura 8). El 90% de los cultivos produjeron raíces, con un número promedio de 8.9 raíces por plántula que midieron 4.12 cm de longitud.

Respecto a la altura, las plántulas de la colecta Núm. 300 fueron las más altas con 7.7 cm, seguida por las Colectas No. 457 y 367 con 6.35 y 4.55 cm, respectivamente.



Figura 7. Enraizamiento *in vitro* de plántulas de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 367 después de una semana.

Los brotes generados *in vitro* frecuentemente se necesitan enraizar para convertirlos en una planta funcional que pueda ser trasplantada a condiciones de invernadero. En muchas especies vegetales los brotes generan raíces *in vitro* fácilmente después de transferirlos de un medio de regeneración, el cual generalmente tiene concentraciones de citocininas y auxinas, a un medio libre de reguladores de crecimiento. Para lograr un enraizamiento *in vitro* eficaz se requiere del uso de auxinas y su eficiencia depende, principalmente, de la especie vegetal (Gaba, 2005).

El enraizamiento en el medio libre de reguladores de crecimiento indica que el cultivo de jitomate tiene la habilidad para generar raíces fácilmente y los resultados son similares a los reportados por (Rao *et al.*, 2005; Devi *et al.*, 2008; Bhushan y Gupta, 2010) en especies de jitomate comerciales.

4.6 Aclimatación

Una vez que las plántulas de las tres colectas de jitomate generaron raíces *in vitro*, se seleccionaron plántulas de 5 y 10 cm de altura para evaluar su respuesta a las condiciones de aclimatación. Las diferencias observadas entre las colectas y la altura de plantas resultaron no significativas ($P \leq 0.05$; Apéndice 19A), lo que indicó que el comportamiento fue similar. Sin embargo, se observó que, independientemente de la altura de la plántula, el porcentaje de supervivencia en las tres colectas fue de 85%.

El porcentaje de supervivencia obtenido en la aclimatación de las plantas de las tres colectas de jitomate silvestre se considera relativamente elevado, ya que en otros estudios de propagación *in vitro* obtuvieron porcentajes menores; por ejemplo, en cuatro variedades comerciales de jitomate Devi *et al.* (2008) reportaron una tasa máxima de supervivencia de 63%. Afroz *et al.* (2009) registraron porcentajes de supervivencia de entre 80 y 90% en plantas de jitomate en variedades comerciales. Estos datos y los obtenidos en la presente investigación evidencian que el jitomate es una especie vegetal sensible a los efectos negativos del trasplante o “transplant shock”, lo cual puede estar relacionado con las características morfológicas, fisiológicas y anatómicas que desarrollan las plantas micropropagadas debido a las condiciones ambientales bajo las cuales crecieron *in vitro* y el régimen heterótrofo al que fueron sometidas. Se ha visto que en muchas especies vegetales las plantas desarrollan estomas que funcionan inadecuadamente y no logran controlar el intercambio gaseoso (traspiración y CO₂), lo cual resulta en pérdidas excesivas de turgencia y bajas tasas fotosintéticas, poseen hojas anormales con una reducida área foliar y están prácticamente desnudas porque no desarrollan cutícula, o bien, solo una cubierta reducida; las raíces son incapaces de absorber agua y nutrimentos minerales. Otra posible explicación de los porcentajes bajos de supervivencia observados en este estudio podrían estar relacionados con el manejo de las plantas durante el trasplante, es decir, el estrés al que fueron sometidas por efecto de la poda de las raíces practicada antes de la transferencia al suelo.

En esta investigación se desarrolló un protocolo para la producción de plántulas de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry (*Solanum lycopersicum*) vía organogénesis a

partir de yemas apicales de plántulas germinadas *in vitro*. Esta metodología podría usarse en la propagación clonal de otras variedades silvestre o cultivares comerciales de jitomate. También podría servir para la propagación de especies relacionadas filogenéticamente con el jitomate.

4.7 Respuesta de plántulas *in vitro* a bajas temperaturas

Las colectas de jitomate tipo Cherry evaluados en la presente investigación son el resultado de los trabajos de campo del Dr. Porfirio Ramírez Vallejo† dentro del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad - Genética del Colegio de Postgraduados. Estos jitomates son valiosos por tratarse de recursos fitogenéticos silvestres y porque poseen un alto potencial para su incorporación en la dieta alimenticia de las comunidades donde están presentes. De los frutos colectados se extrajeron semillas que se han mantenido en evaluación para determinar su comportamiento en condiciones de invernadero con la finalidad de establecer su manejo agronómico.

En la evaluación de la tolerancia a bajas temperaturas se usaron plántulas enraizadas *in vitro* de 2 y 4 cm de altura de las tres colectas; las plantas se mantuvieron en medio de cultivo MS (1962) a la mitad de concentración de sales, en frascos de 235 mL de capacidad con 40 mL del medio e incubadas en condiciones indicadas en el inciso 3.2.

La selección de -8 °C para la evaluación de la tolerancia a heladas corresponde a la temperatura más baja a la que estuvieron expuestas las plántulas de las tres colectas en el año 2013 en condiciones de invernadero (Figura 8).

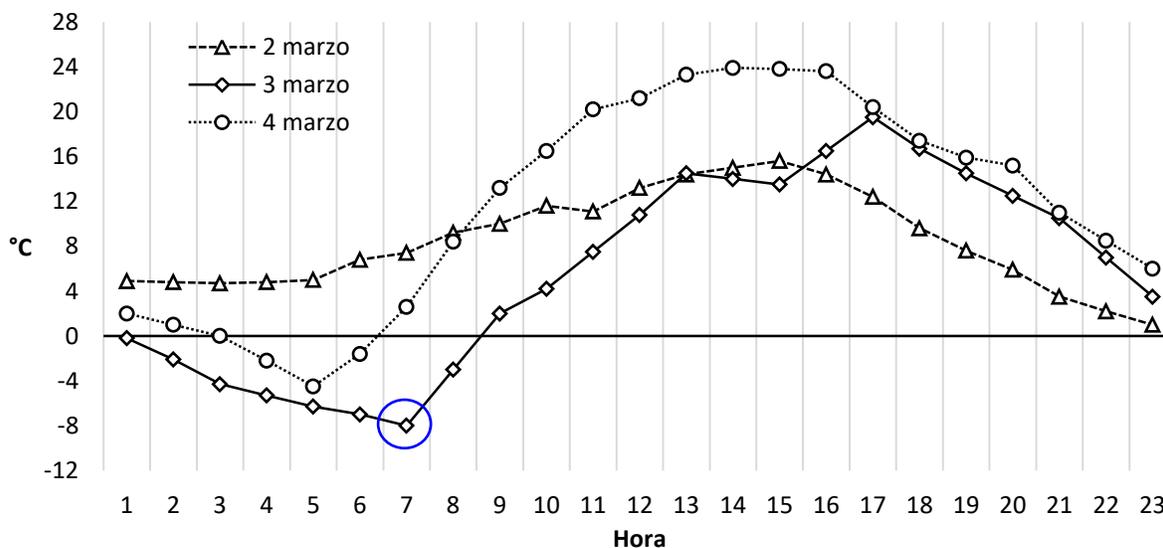


Figura 8. Comportamiento de la temperatura a la que estuvieron expuestas las plántulas de las colectas de tomate silvestre tipo Cherry 300, 367 y 457 en condiciones de invernadero en marzo del año 2013. En el círculo se indica la temperatura mínima de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ alcanzada. Datos obtenidos de las estaciones meteorológicas de la Universidad Autónoma de Chapingo y el Colegio de Posgraduados Campus Montecillo.

La tasa de supervivencia fue afectada significativamente por el factor tiempo de exposición a los $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$; sin embargo, el genotipo *per se* no tuvo ninguna influencia, tanto en las plántulas de 2 cm como de 4 cm de altura. Esto indica que las tres colectas de jitomate responden de manera similar a las bajas temperaturas y que son tolerantes a las bajas temperaturas.

Las variables de altura de planta y número de hojas también resultaron afectadas por el tiempo de exposición y la interacción con el genotipo en las plántulas de 2 y 4 cm; pero la mayor influencia se atribuyó al tiempo de exposición. El número de raíces fue afectado por el genotipo, el tiempo de exposición a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la interacción de ambos factores, en las dos alturas de plántula evaluadas; sin embargo, para la longitud de la raíz la influencia fue similar pero sólo en plántulas de 2 cm, no en las de 4 cm donde el genotipo no tuvo participación. Respecto al daño generalizado a las plántulas, en las de 2 cm los efectos se debieron principalmente al tiempo de exposición al igual que en las de 4 cm, pero en éstas también hubo influencia del genotipo y la interacción con la exposición ($P \leq 0.05$; Apéndices 20A).

Las plántulas afectadas, perdieron las hojas y se marchitaron del ápice hacia la raíz mostrando la muerte total de la plántula. La temperatura por debajo del punto de congelación del agua después del tratamiento de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, el congelamiento es intracelular, se daña la estructura citoplasmática y los cristales de hielo formados pueden literalmente matar a la célula. Si el congelamiento es extracelular, la formación de hielo fuera de la célula impone una fuerza deshidratadora a la solución no congelada intracelular, determinando que el agua sea transferida desde el interior hacia los cristales de hielo formados fuera de la célula. Como consecuencia, las membranas se van arrugando a medida que el volumen celular disminuye. Según la especie la tolerancia a bajas temperatura difiere. Algunas especies son tan susceptibles al daño por congelamiento que pueden morir al primer contacto con una helada (el arroz, el maíz y el tomate); no toleran hielo en sus tejidos y muestran rápidamente síntomas de daño que incluyen apariencia flácida con pérdida de turgencia (Matías *et al.*, 2001; Chaar, 2013; Jouyban *et al.*, 2013).

La tasa de supervivencia de las plántulas fue la variable de mayor interés en la evaluación de la tolerancia a bajas temperaturas, ya que fue la forma directa de medir el grado de tolerancia de las tres colectas de jitomate a los tiempos de exposición de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los resultados negativos de la influencia del genotipo sobre la mayoría de las variables evaluadas indicaron de forma consistente que las tres colectas mostraron un nivel de tolerancia similar a las temperaturas de congelamiento.

Los porcentajes de supervivencia de plántulas, después de dos semanas de su exposición al congelamiento, fueron similares en los dos tamaños de plántula evaluados y en promedio fue de 45% para las tres colectas de jitomate estos valores son elevados, ya que las variedades comerciales no sobrevivirían a esta temperatura y tiempo de exposición (Carvallo *et al.*, 2011; Sanghera *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2016). Sin embargo el 55 % de las plántulas al término del tiempo de exposición fue letal para las tres colectas y termino por eliminar los tejidos de las plántulas mostrando necrosamiento y/o marchites. En cambio, la tasa de supervivencia resultó inversamente proporcional al tiempo de exposición a los $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$; los porcentajes fueron mayores cuando las plántulas estuvieron expuestas menos tiempo a la baja temperatura y fueron disminuyendo conforme el tiempo de exposición se

incrementó. En las plántulas de 2 cm el mayor porcentaje de supervivencia promedio fue de 88% mientras que en las de 4 cm fue de 94%, cuando se expusieron por 10 minutos. En contraste, los porcentajes se redujeron hasta 5 y 19% cuando estuvieron expuestas por 50 min; con 60 minutos de exposición las plántulas no sobrevivieron (Cuadro 18, Figura 9). Las plantas difieren en la tolerancia de temperaturas a frío (15 – 0 °C) y congelamiento (< 0°C) (Sanghera *et al.*, 2011). La adaptación y la aclimatación depende de la especie de planta, sin embargo las plántulas que son tolerantes o resistentes tienden a activar ciertos mecanismos de defensa a este tipo de estrés por ejemplo; los órganos de las células tolerantes a temperaturas de congelamiento acumulan solutos con bajo peso molecular así como los cambios biológicos como la reducción de la fotosíntesis, el transporte celular y la fluidez en la membrana celular (Thomashow, 1999; Ouellet, 2007; Sandve *et al.*, 2011).

Cuadro 18. Efecto del genotipo y tiempo de exposición a -8 °C sobre la supervivencia (%) de plántulas *in vitro* de jitomate silvestre.

| Factor | Plántulas de 2 cm [¶] | Plántulas de 4 cm [¶] |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Colecta de jitomate | | |
| Número 300 | 44.0 a | 41.0 a |
| Número 367 | 44.0 a | 43.0 a |
| Número 457 | 47.0 a | 55.0 a |
| Tiempo de exposición | | |
| 10 | 88.0 a | 94.0 a |
| 20 | 72.0 ab | 75.0 ab |
| 30 | 61.0 bc | 50.0 bc |
| 40 | 44.0 c | 41.0 dc |
| 50 | 5.0 d | 19.0 de |
| 60 | 0 d | 0 e |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (P≤0.05).

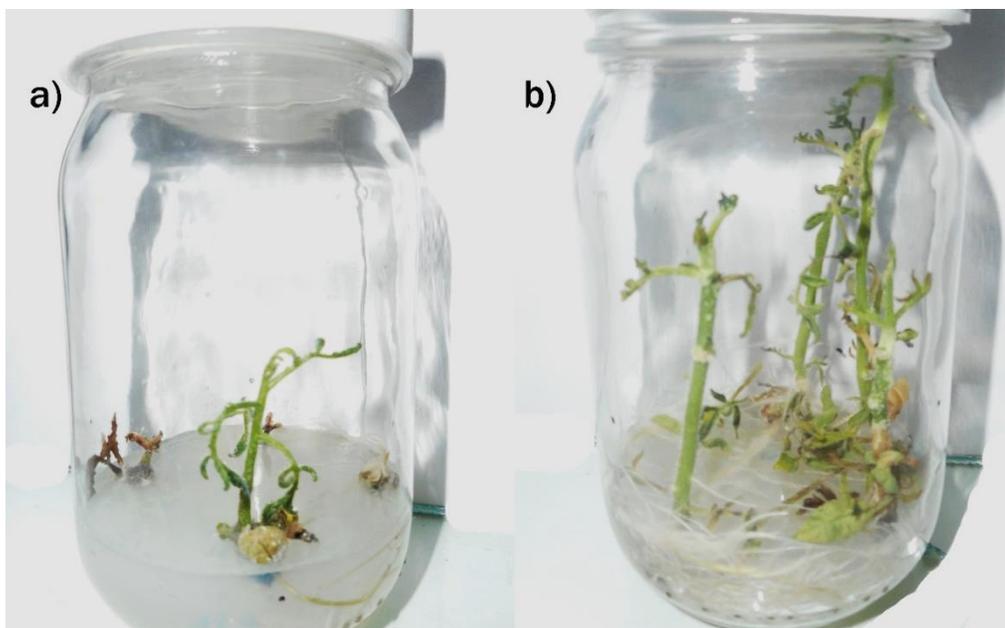


Figura 9. Comportamiento de las plántulas de la colecta No. 457 sometidas a punto de congelación por 50 min, resultado después de dos semanas de haber sido expuestas a -8°C donde los incisos muestran las diferencias en el tamaño de plántula respecto al porcentaje de supervivencia, a) plántulas de 2 cm y b) plántulas de 4 cm de altura.

Las temperaturas máximas de tolerancia reportadas en los cultivos de tomate y chile son de -1 y 0°C ; con valores negativos superiores los cultivos presentan daños severos o la muerte de las plantas (LeBoeuf, 2004). Es por ello que los resultados obtenidos en esta investigación son valiosos, ya que se confirmó que las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry son capaces de tolerar temperaturas congelantes de -8°C superiores al límite reportado en jitomate y otras solanáceas. La tolerancia observada en las plantas de estas colectas confirma que dicha respuesta está determinada por un origen genético y representa un campo de investigación para su eventual inclusión en programas de mejoramiento genético del cultivo de jitomate.

El comportamiento de la supervivencia de las plántulas a los -8°C , para cada colecta, mostró que en la Núm. 300 el 58% de las plántulas de 2 cm toleró como máximo 40 min de exposición. En cambio, las de 4 cm pudieron tolerar hasta 50 min pero sólo sobrevivió el 17% de las plántulas (Cuadro 19).

Cuadro 19. Supervivencia (%) de plántulas *in vitro* de jitomate después de dos semanas de haber sido expuestas a -8 °C por diferentes tiempos.

| Colecta | Tiempo de exposición (min) | Plántulas de 2 cm [¶] | Plántulas de 4 cm [¶] |
|------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Número 300 | 10 | 75.0 abc | 91.0 ab |
| | 20 | 66.0 a-d | 66.0 a-d |
| | 30 | 66.0 a-d | 41.0 b-e |
| | 40 | 58.0 a-d | 33.0 cde |
| | 50 | 0.0 e | 17.0 de |
| | 60 | 0.0 e | 0.0 e |
| Número 367 | 10 | 91.0 ab | 100.0 a |
| | 20 | 66.0 a-d | 83.0 abc |
| | 30 | 50.0 a-e | 41.0 b-e |
| | 40 | 41.0 b-e | 33.0 cde |
| | 50 | 16.0 de | 0.0 e |
| | 60 | 0.0 e | 0.0 e |
| Número 457 | 10 | 100.0 a | 91.0 ab |
| | 20 | 80.0 abc | 75.0 abc |
| | 30 | 66.0 a-d | 66.0 a-d |
| | 40 | 33.0 cde | 58.0 a-d |
| | 50 | 0.0 e | 41.0 b-e |
| | 60 | 0.0 e | 0.0 e |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

En la supervivencia de las plántulas de la colecta No. 457 se observó una tendencia similar con la colecta Núm. 300 pero los porcentajes de supervivencia fueron más altos. El 40% de las plántulas de 4 cm toleraron hasta 50 min la exposición al congelamiento mientras que las de 2 cm sólo sobrevivió el 33% cuando se expusieron 40 min (Cuadro 19).

En las plántulas de la colecta No. 367, la supervivencia mostró un comportamiento diferente a las otras colectas. En este caso, las plántulas de 2 cm fueron las que toleraron mejor las bajas temperaturas, ya que alcanzaron 16% de supervivencia cuando se expusieron por 50 min. Por el contrario, en las plántulas de 4 cm el porcentaje fue el doble pero sólo toleraron un máximo de 40 min de exposición (Cuadro 19).

Las variables de crecimiento medidas a las dos semanas después de los tratamientos de exposición al congelamiento tuvieron la finalidad de evaluar la capacidad de recuperación de las plántulas. La altura de las plántulas se midió considerando la longitud final de los tallos que estaban verdes, ya que el ápice de brote, después de los tratamientos con -8 °C,

presentó daños por necrosamiento. Por este efecto, los valores de altura resultaron, en algunos casos, menores a la altura de la plántulas de 2 y 4 cm sometidas a los tratamientos. Los mayores valores de altura de plántula se presentaron en los tratamientos de 10 minutos de exposición en ambos tamaños de plántula evaluados; sin embargo, las plántulas de 4 cm mostraron un mejor respuesta de recuperación, ya que la altura fue de 5.59 cm. Respecto al número de hojas, las plántulas de 4 cm de altura, expuestas por 10 minutos a -8 °C, fueron las que mostraron mayor cantidad de hojas. En contraste, las plántulas sometidas a 50 y 60min de exposición no prosperaron (Cuadro 20).

Cuadro 20. Efecto del genotipo y tiempo de exposición a -8 °C sobre la altura (cm) y número de hojas de plantas *in vitro* de jitomate silvestre.

| Colecta | Plántulas de 2 cm [¶] | | Plántulas de 4 cm [¶] | |
|-----------------------------------|--------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|
| | Altura (cm) | No. de hojas | Altura (cm) | No. de hojas |
| Número 300 | 1.26 a | 1.62 a | 2.54 a | 2.30 a |
| Número 367 | 1.37 a | 2.19 a | 2.81 a | 2.29 a |
| Número 457 | 0.81 a | 1.52 a | 3.59 a | 3.01 a |
| Tiempo de exposición (min) | | | | |
| 10 | 2.65 a | 2.36 b | 5.59 a | 4.2 a |
| 20 | 1.09 bcd | 1.77 b | 3.84 ab | 2.7 ab |
| 30 | 1.46 bc | 2.83 ab | 2.68 bc | 2.8 ab |
| 40 | 1.58 ab | 3.72 a | 3.58 abc | 3.5 ab |
| 50 | 0.10 cd | 0.05 c | 1.66 cd | 1.6 bc |
| 60 | 0.00 d | 0.00 c | 0.54 d | 0.5 c |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (P≤0.05).

En la interacción de las tres colectas con el tiempo de exposición se observó que las plántulas de 4 cm fueron las que obtuvieron la mejor respuesta respecto a las de 2 cm en cuanto a la altura de plántulas. De igual manera, el número de hojas fue mayor en las plántulas de 4 cm que en las de 2 cm. La mejor respuesta en altura de plántula se cuantificó en aquellas que tenían de 4 cm de la colecta No. 457 cuando se expusieron 10 min a -8 °C con un valor de 8.25 cm. El mayor número de hojas también lo presentaron las plántulas de 4 cm de la colecta No. 457 con un promedio de 5.4 hojas por planta, seguido de la colecta No. 300 con un promedio de 4.4 hojas en plántulas de 4 cm. En las de plántulas de 2 cm el

mayor número de hojas se presentó en la colecta No. 367 con un promedio 3.5 hojas por planta (Cuadro 21).

Cuadro 21. Altura de planta (cm) y número de hojas de plántulas *in vitro* de jitomate después de dos semanas de exposición a -8 °C por diferentes tiempos.

| Colecta | Tiempo de exposición (min) | Altura de planta (cm) | | Número de hojas | |
|------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | Plántulas de 2 cm [¶] | Plántulas de 4 cm [¶] | Plántulas de 2 cm [¶] | Plántulas de 4 cm [¶] |
| Número 300 | 10 | 1.35 ab | 4.61 ab | 1.25 cd | 4.41 abc |
| | 20 | 2.24 ab | 3.95 a-d | 2.58 a-d | 2.58 a-d |
| | 30 | 2.14 ab | 3.24 bcd | 2.75 abc | 3.25 a-d |
| | 40 | 1.87 ab | 1.65 bcd | 3.33 ab | 1.91 a-d |
| | 50 | 0.00 b | 0.48 bcd | 0.00 d | 0.41 cd |
| | 60 | 0.00 b | 1.33 bcd | 0.00 d | 1.25 bcd |
| Número 367 | 10 | 3.93 a | 3.92 bcd | 3.58 ab | 2.75 a-d |
| | 20 | 1.03 ab | 3.80 bcd | 2.75 abc | 3.00 a-d |
| | 30 | 0.65 b | 2.12 bcd | 2.50 a-d | 1.75 a-d |
| | 40 | 2.29 ab | 4.59 abc | 4.16 a | 3.75 a-d |
| | 50 | 0.30 b | 2.16 bcd | 0.16 cd | 2.25 a-d |
| | 60 | 0.00 b | 0.29 cd | 0.00 d | 0.25 d |
| Número 457 | 10 | 2.69 ab | 8.25 a | 2.25 a-d | 5.47 a |
| | 20 | 0.00 b | 3.78 bcd | 0.00 d | 2.41 a-d |
| | 30 | 1.58 ab | 2.70 bcd | 3.25 ba | 3.25 a-d |
| | 40 | 0.60 b | 4.50 abc | 3.66 ba | 4.83 ab |
| | 50 | 0.00 b | 2.33 bcd | 0.00 d | 2.16 a-d |
| | 60 | 0.00 b | 0.00 d | 0.00 d | 0.00 d |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (P≤0.05).

En cuanto a las variables de enraizamiento, se observó que el genotipo tuvo cierta influencia en la respuesta. Sin embargo, el mayor número de raíces y longitud de las mismas se presentaron en las plántulas de 4 cm en las tres colectas. Al igual que en la altura de planta y número de hojas, el mayor número de raíces y crecimiento de las mismas se observó en las plántulas expuestas por 10 minutos a -8 °C (Cuadro 22).

Cuadro 22. Efecto del genotipo y tiempo de exposición a -8 °C sobre el número de raíces y longitud de raíces (cm) de plantas *in vitro* de jitomate silvestre.

| Colecta | Plántulas de 2 cm [¶] | | Plántulas de 4 cm [¶] | |
|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| | Núm. de raíces | Longitud de raíces (cm) | Núm. de raíces | Longitud de raíces (cm) |
| Número 300 | 0.59 b | 1.36 a | 0.95 b | 1.71 a |
| Número 367 | 1.43 a | 1.80 a | 2.11 a | 1.76 a |
| Número 457 | 0.52 b | 0.56 b | 1.40 ab | 1.94 a |
| Tiempo de exposición (min) | | | | |
| 10 | 1.16 ab | 2.02 a | 1.9 ab | 3.12 a |
| 20 | 1.00 abc | 1.44 ab | 2.4 a | 2.55 a |
| 30 | 1.55 a | 1.72 ab | 1.8 abc | 1.69 ab |
| 40 | 1.11 abc | 1.61 ab | 2.1 a | 1.94 ab |
| 50 | 0.27 bc | 0.66 bc | 0.4 bc | 0.72 b |
| 60 | 0.00 c | 0.00 c | 0.3 c | 0.80 b |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (P≤0.05).

El crecimiento de las plántulas después de los tratamientos con -8 °C se caracterizó por ser lento en comparación con el crecimiento normal sin estrés. En general, las plántulas mostraron necrosamiento como respuesta natural al daño por las bajas temperaturas; sin embargo, las plántulas mantuvieron la capacidad para emitir nuevos brotes a partir de los tallos que permanecieron vivos o de color verde.

La cantidad y longitud de la raíces en las plántulas de 2 y 4 cm en general mostraron un comportamiento similar en las tres colectas. El mayor número de raíces lo presentó la colecta No. 367 con un promedio de 5.0 raíces por plántula, mientras que en la longitud de raíz las plántulas de 4 cm mostraron ligeramente una mejor respuesta que las de 2 cm. La colecta que mostró mayor longitud de raíz fue la No. 457 con un promedio de 5.0 cm por raíz mientras que en las plántula de 2 cm la colecta No. 300 alcanzó un promedio de 2.9 cm (Cuadro 23).

Cuadro 23. Número de raíces y longitud de raíz (cm) de plántulas *in vitro* de jitomate después de dos semanas de haber sido expuestas a -8 °C por diferentes tiempos.

| Colecta | Tiempo de exposición (min) | Número de raíces | | Longitud de raíz (cm) | |
|------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | Plántulas de 2 cm [¶] | Plántulas de 4 cm [¶] | Plántulas de 2 cm [¶] | Plántulas de 4 cm [¶] |
| Número 300 | 10 | 0.92 bc | 0.91 bc | 2.91 a | 1.70 bc |
| | 20 | 1.25 bc | 1.25 bc | 2.25 ab | 2.41 abc |
| | 30 | 1.92 abc | 1.91 abc | 0.00 b | 2.16 abc |
| | 40 | 0.83 bc | 0.83 bc | 1.66 ab | 1.16 bc |
| | 50 | 0.08 c | 0.08 c | 0.00 b | 0.41 c |
| | 60 | 0.75 bc | 0.75 bc | 0.00 b | 2.41 abc |
| Número 367 | 10 | 2.33 abc | 2.33 abc | 1.83 ab | 2.66 abc |
| | 20 | 5.00 a | 5.00 a | 2.08 ab | 3.75 abc |
| | 30 | 1.33 bc | 1.33 bc | 2.16 ab | 1.33 bc |
| | 40 | 3.83 ab | 3.83 ab | 2.75 ab | 2.66 abc |
| | 50 | 0.17 c | 0.16 c | 2.00 ab | 0.16 c |
| | 60 | 0.00 c | 0.00 c | 0.00 b | 0.00 c |
| Número 457 | 10 | 2.58 abc | 2.58 abc | 1.33 ab | 5.00 a |
| | 20 | 1.00 bc | 1.00 bc | 0.00 b | 1.50 bc |
| | 30 | 2.08 abc | 2.08 abc | 1.66 ab | 1.58 bc |
| | 40 | 1.67 bc | 1.66 bc | 0.41 ab | 2.00 abc |
| | 50 | 1.08 bc | 1.08 bc | 0.00 b | 1.58 bc |
| | 60 | 0.00 c | 0.00 c | 0.00 b | 0.00 c |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (P≤0.05).

Las variables de crecimiento evaluadas demostraron que, después del estrés ocasionado por el frío, las plántulas mostraron capacidad para recuperarse. Si bien el meristemo apical de brote resultó dañado, después de las dos semanas de estar expuestas se activaron las yemas axilares y emergieron como nuevos brotes. Los factores de estrés abióticos afectan de manera adversa el crecimiento y la productividad en las plantas desencadenando una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares. El estrés por frío es uno de los principales factores de estrés ambiental que limita la productividad agronómica de las plantas. Las plantas se adaptan y responden a niveles moleculares y celulares así como fisiológicos y biológicos a estos tipos de estrés para sobrevivir bajo estas condiciones (Sanghera *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2016). El crecimiento de las plantas después del estrés por frío confirmó su recuperación y tolerancia. Este estudio es el primer reporte donde un

estudio fisiológico por estrés al frío se apoya en las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

Las especies vegetales difieren en la tolerancia de temperaturas al frío (15 – 0 °C) y congelamiento (<0°C). La tolerancia a bajas temperaturas en plantas es un proceso complejo de manejar, debido a que involucra diferentes procesos metabólicos y componentes celulares (Sanghera *et al.*, 2011). El cultivo de tomate en general es vulnerable a bajas temperaturas (Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, los resultados aquí obtenidos confirmaron que las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry tienen la capacidad para tolerar la exposición a -8 °C y recuperarse después de cierto tiempo de exposición.

Cuando se presentan temperaturas congelantes, el hielo comienza a formarse en el espacio apoplástico y el agua que se encuentra en el citoplasma sale de las células para formar una estructura de hielo extracelular. Para evitar la pérdida de agua, los órganos de las células tolerantes a temperaturas de congelamiento acumulan solutos con bajo peso molecular como prolina, azúcares o glicina betaína (Thomashow, 1999; Ouellet, 2007).

Posteriormente, los cambios biológicos que involucran la inducción a frío incluyen la reducción de la fotosíntesis, cambios en el contenido de azúcares, transporte celular y de membrana, producción de proteínas anti-congelamiento, desequilibrio del metabolismo y la disminución de la respiración (Sandve *et al.*, 2011).

Estos daños pueden ser más severos en unas plantas que en otras y va a depender de su adaptación al frío. Así, especies de cereales y otros cultivos han desarrollado diferentes estrategias para lidiar con el invierno; por ello existen variedades tolerantes y variedades sensibles (Carvallo *et al.*, 2011).

Principalmente la tolerancia de las plantas al frío está determinada por un origen genético, donde participa la expresión génica (Lee *et al.*, 2002). La tolerancia a frío es controlada por múltiples genes y es complicado crear ensayos multigénicos para evaluar la tolerancia (Roy *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2016). Los genes responsables de codificar la tolerancia a frío activan diversas matrices de proteínas y enzimas involucradas en la respiración y en el

metabolismo de los carbohidratos y lípidos, así como fenilpropanoides, antioxidantes, moléculas chaperon y proteínas anticongelamiento, entre otras; que se encuentran relacionadas con la tolerancia debido a la deshidratación causada por el congelamiento (Sanghera *et al.*, 2011). Por esta participación de los genes se sugiere, salvo estudios futuros, que la tolerancia observada en las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry esté soportada por una base genética. La información contenida en sus genomas es una fuente valiosa para experimentación y eventual incorporación en programas de mejoramiento genético del tomate.

V. CONCLUSIONES

- El establecimiento del cultivo aséptico a partir de semillas de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry Núm. 300, 367 y 457 fue posible con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (3.0%, v/v), NaClO (30 y 50%), Tween[®] 20 (4%, v/v) y plata coloidal (3%, v/v).
- La germinación *in vitro* de las semillas de jitomate de las tres colectas resultó útil debido a que se observó una reducción en el tiempo de germinación (3 – 5d) a pesar del tiempo de la semilla que es de 4 a 5 años.
- La regeneración *in vitro* de *Solanum lycopersicum* silvestre tipo Cherry de las tres colectas Núm. 300, 367 y 457 es posible a partir de explantes de yema axilar y apical.
- Con la dosis de 2.5 mg L^{-1} de BAP se indujo la mayor cantidad de brotes en las tres colectas de jitomate; en la colecta Núm. 300 fue de 2.8 brotes por explante, seguida de la colecta Núm. 457 con 2.6 brotes por explante; la colecta Núm. 367 presentó el menor número de brotes con 1.8 brotes.
- La multiplicación de brotes en las tres colectas de jitomate fue de 3.5 brotes por explante cuando al medio se le adicionó BAP o Kin en combinación con ANA (0.10 mg L^{-1}).
- El enraizamiento *in vitro* de plántulas de las tres colectas de jitomate se consiguió en el medio MS (1962), medio libre de reguladores de crecimiento, ya sea completo ó a la mitad de concentración de sales, ya que en ambos medios, la eficiencia es la misma para la obtención de raíces a los seis días. El promedio general de la formación de raíces fue de 8.8 con una longitud promedio de 4.1 cm y el porcentaje total de enraizamiento fue de 88 %.
- Las plantas micropropagadas de 5 ó 10 cm de altura fueron capaces de aclimatarse y sobrevivir en un sustrato artificial compuesto de peat moss y agrolita (1:1); los porcentajes de supervivencia promedio fueron de 85% después de dos semanas.
- La tolerancia de las plántulas *in vitro* de las tres colectas de jitomate a temperaturas congelantes de $-8 \text{ }^\circ\text{C}$ está asociada con un origen genético. Las tres colectas resultaron

tolerantes y la supervivencia se comportó inversamente proporcional con el tiempo de exposición.

VI. RECOMENDACIONES

La temperatura evaluada y el comportamiento *in vitro* de las plántulas podría complementarse si se incrementa el rango inferior y superior a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el tiempo de exposición.

Se recomienda realizar análisis bioquímicos para determinar si las plantas desarrollan respuestas de estrés, síntesis y acumulación de metabolitos que estén relacionados con la tolerancia o resistencia, etc. Con esto se podrían establecer los fundamentos de la tolerancia o resistencia a las bajas temperaturas y buscar marcadores bioquímicos y moleculares.

VII. LITERATURA CITADA

- Afroz, A., Chaudhry, Z., Khan, R., Rashid, H., y Alikhan, S. 2009. Effect of Ga₃ on regeneration response of three tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*). Pak. J. Bot., 41(1): 143-151.
- Alegría, I. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16 (1).
- Alleweldt, G. y Radler, F. 1961. Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes and growth of plant tissue cultures. Plant Physiology. 36: 376-379.
- Almeida, M. 2015. Advances in Forestry Science. Review: Plant morphogenesis: theoretical bases Adv. For. Sci., Cuiabá, v.2, n.1, p.13-22.
- Ancora, G. y Sree-Ramulu, K. 1981. Plant regeneration from *in vitro* cultures of stem internodes in self-incompatible triploid *Lycopersicon peruvianum* Mill. and cytogenetic analysis of regenerated plants. Plant Sci. Lett. 22: 197-204.
- Applewhite, P.B., Kaur-Sawhney, R. y Galston, A.W. 1994. Isatin as an auxin source favoring floral and vegetative shoot regeneration from calli produced by thin layer explants of tomato pedicel. Plant Growth Regul 15: 17-21.
- Bathía, P., Ashwath, N., Senaratna, T., y Midmore, D. 2004. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 1-21.
- Bathía, P., Ashwath, N., y Midmore, D., J. 2005. Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41:457-464.
- Bauchet, G. y Causse, M. 2012. Genetic Diversity in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. In: Mahmut Caliskan (Editeur), Genetic diversity in plants (p. 133-162). Vienne, AUT: IN-TECH Education and Publishing.
<http://prodinra.inra.fr/record/48918>.
- Beregounoux, V. 2013. The history of tomato: From domestication to biopharming. Biotechnology Advances 32 (2014) 170-189.
- Bhushan, A., y Gupta, R.K. 2010. Adventitious shoot regeneration in different explants of six genotypes of tomato. Indian J. Hort. 67.
- Borges, P.N., V. y Campos, W.O. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? Scientia Horticulturae 97: 193-202.

- Calva, C.G, Pérez, V.J. 2005. Cultivo de células y tejidos Vegetales: fuente de alimentos Para el futuro. Revista Digital Universitaria. Volumen 6 Número 11 • ISSN: 1067-6079.
- Carvallo, M. A., Pino, M. T., Jeknic, Z., Zou, C., Doherty, C. J., Shiu, S. H., Chen, T. H., Thomashow, M. F. 2011. A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, and *Arabidopsis thaliana*. J Exp Bot 62(11).
- Cassells, A. 1979. The effect of 2, 3, 5-triiodobenzoic acid on callogenesis in callus cultures of tomato and pelargonium. Physiol. Plant 37: 239–246.
- Cassierra-Posada, F. 2007. Photoinhibition: Physiological response of plants to high-irradiance stress. A review. Revista colombiana de ciencias hortícolas. Vol. 1. No.1 pp. 114-123.
- Chaar, J. E. 2013. Resistencia a heladas en plantas frutales. Avances en Investigación Agropecuaria. Aia. 17(3): 109-121
- Chandel, G. y Katiyar, S.K. 2000. Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.). Adv. Plant Sci. 13: 11–17.
- Chaudhry, Z. 2010. Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. Moneymaker. Pak. J. Bot., 42(1): 155-163.
- Cherry, J.H., Locy, R.D., y Rychter, A. 2000. Plant tolerance to abiotic stress in agriculture: Role of Genetic Engineering. 376 pp.
- Chlyah, A. y Taarji, H. 1984. Androgenizes in tomato. Plant tissue and cell culture application to crop improvement. Czechoslovak Ac: 241–242.
- Compton, M.E. y Veilleux, R.E. 1991. Shoot, root and flower morphogenesis on tomato inflorescence explants. Plant Cell Tissue. Org. Cult. 24: 223–231.
- Cuenca, B. y Vieitez, A.M. 2000. Influence of carbon source on shoot multiplication and adventitious bud regeneration in *in vitro* beech cultures. Plant Growth Regulation 32: 1–12.
- Dai, C. X., Mertz, D. y Lambeth, V.N. 1988. Effect of seedling age, orientation and genotype of hypocotyl and cotyledon explants of tomato on shoot and root regeneration. Genet. Manip. Crops Newslett. 4: 26–35
- Delporte, F. 2014b. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. Protoplasma 251:1455–1470.

- Delporte, F., Pretova, A., Jardin, P., Watillon, B. 2014b. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma* 251:1455–1470 pp.
- Devi, R., Dhaliwal, M.S., Kaur, A., y Gosal, S.S. 2008. Effect of growth regulators on *in vitro* morphogenic response of tomato. *Indian Journal Biotechnology*. Vol. 7, 526-530pp.
- Duncan, R.R. 2000. In: Plant environment interactions, R.E. Wilkinson (Ed). (Marcel Dekker, New York) 1-38pp.
- Duzyaman, E., Tanrisever, A. y Gunver, G. 1994. Comparative studies on regeneration of different tissues of tomato *in vitro*. *Acta. Horti*: 235–242.
- El-Farash, E.M., Abdalla, H.I., Taghian, A.S. y Ahmad, M.H. 1993. Genotype, explant age and explant type as effecting callus and shoot regeneration in tomato. *Assiut J. Agri. Sci.* 24:3–14.
- Elhiti, M. y Stasolla, C. 2011. Ectopic expression of the Brassica Shoot meristemless attenuates the deleterious effects of the auxin transport inhibitor TIBA on somatic embryo number and morphology. *Plant Science* 180: 383 - 390.
- Evans, D.A. 1989. Somaclonal variation – genetic basis and breeding applications. *Trends Genet.* 5: 46–50.
- FAO. 2014. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El estado mundial de la agricultura y la alimentación disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i4040s.pdf>
- Fari, M., Szasz, A., Mityko, J., Nagy, I., Csanyi, M. y Andrasfalvy, A. 1992. Induced organogenesis via the seedling decapitation method (SDM) in three solanaceous vegetable species. *Capsicum Newsletter*: 243–248.
- Ferl, R., Paul, A., L. 2000. Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruis R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. USA: American Society of Plant Physiologist, 312-357 pp.
- Frankenberger, E.A., Hasegawa, P.M. y Tigchelaar, E.C. 1981a. Influence of environment and developmental state on the shoot forming capacity of tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol.* 102: 221–232.
- Frankenberger, E.A., Hasegawa, P.M. y Tigchelaar, E.C. 1981b. Diallel analysis of shoot-forming capacity among selected tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol.* 102: 233–242.
- Friml, J. 2003. Auxin transport – shaping the plant. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:7-12.

- Gaba, V. P. 2005. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. *In*: Trigiano, R. N. and Gray, D. J. (Eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press. Boca Raton, FL. 87-99 pp.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F. y Dommes, J. 2002. Concepts in plants stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263-285.
- Gaspar, T., Kevers, Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. y Thorpe, T.A. 1996. Review. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 3 2:272-289.
- Gautheret, R.J. 1969. Investigations on the root formation in the tissues of *Helianthus tuberosus* culture *in vitro*. *Am. J. Bot.* 56:702 – 711.
- George, E., F., Hall, M., A. y Klerk, GJ. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition, Volume 1. The Background, Springer. 501pp.
- Gregory, C., P. 2004. Invited Review: *In vitro* morphogenesis in plants – recent advances. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* — *Plant* 40:342–345.
- Gresshoff, P.M. y Doy, C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107:161–170.
- Gunay, A.L. y Rao, P.S. 1980. *In vitro* propagation of hybrid tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L.) using hypocotyl and cotyledon explants. *Ann. Bot.* 45: 205–207.
- Haccius, B. 1965. Haben Gewebekultur-Embryonen einen Suspensor? *Ber. dtseh, bot. Ges.* 78, 11 - 21.
- Hasegawa, P.M., Murashige, T., y Takatori, F.H. 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cyto-histological characteristics. *J. Amer. Soc. ttort. Sci.* 98: 143-148. <http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort410/tomat/to00001.htm>.
- Isah, T. 2015. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associate danomalies in plants. *Acta biológica cracoviensia Series Botanica* 57/2: 9–28.
- Izadpanah, M. y Khosh-Khui, M. 1992. Comparisons of *in vitro* propagation of tomato cultivars. *Iran Agric. Res.* 8: 37–47.
- Jones, J. B. 2007. Tomato plant culture, in the field, greenhouse, and home garden. 2nd Ed.
- Jouyban, Z., Hasanzade, R., Sharafi, S. 2013. Chilling stress in plants. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* Vol., 5 (24), 2961-2968.

- Kaul, M. 1991. Reproductive biology of tomato. In: Kalloo G (Eds). Monographs on Theoretical and Applied Genetics 14, Genetic Improvement of Tomato. 39–43 pp. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Kawahara, R., Komamine, A. 1995. Molecular basis of somatic embryogenesis. In: IYPS (Ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 30. Somatic embryogenesis and synthetic seeds I. Springer, Berlin Heidelberg New York, and 30-40pp.
- Komamine, A., Murata, N., Nomura, K. 2005. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In vitro Cell Develop Biol. – Plant* 41:6-10.
- Kurtz, S., M., y Lineberger, R., D. 1983. Genotypic differences in morphogenic capacity of cultured leaf explants of tomato. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108: 710–714.
- LeBoeuf, J. 2004. The Effect of Extreme Temperatures on the Tomato and Pepper Crop. Ministry of Agriculture, Food and rural affairs. Ontario. CA.
- Lee, H., Guo, Y., Ohta, M., Xiong, L., Stevenson, B. y Zhu, J. K. 2002. LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J.*, 21: 2692–2702.
- Letouzé, R. y Beauchesne, G. 1969. Action d'éclairermonochromatiques sur la rhizogenèse de tissus de Topinambour. *C. R. Acad. Sci.* 269: 1528 – 1531.
- Lobato-Ortiz R., Rodríguez Guzmán, J.C. Carrillo-Rodríguez, J.L. Chávez-Servía. P. Sánchez-Peña y A. Aguilar-Meléndez. 2012. Exploración, colecta y conservación de recursos genéticos de jitomate: avances de la Red de Jitomate. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y Agricultura (SINAREFI). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación y Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 54 p.
- Lukyanenko, A.N. 1991. Disease resistance in tomato. In: Kalloo G (Eds) Monographs on Theoretical and Applied Genetics 14, Genetic Improvement of Tomato. 99–119 pp. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Matías R. L. G., Fuentes, M. O. A., García, J. F. 2001. CENAPRED. Serie Fascículos.
- Magdalita, P.M., Godwin, I.D., Drew, R.A., Adkins, S.W. 1997. Effect of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.49: 93-100 p.
- Mroginski, L., Sansberro, P., y Flaschland, E. 2014. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Cap.1. Parte I Herramientas básicas. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. INTA. ArgenBio.

- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physio.* 25:135-66.
- Naika, S., Lidt, J., Goffau, M., Hilmi, M., Dam, B. 2005. Cultivation of tomato (production, processing and marketing). Agromisa.
- Namitha, K.K. y Negi, P.S. 2013. Morphogenetic Potential of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. 'Arka Ahuti' to Plant Growth Regulators. *Not Sci Biol*, 5(2):220-225.
- Nebel, B. J. y Naylor, A. W. 1968. Light, temperature and carbohydrate requirements for shoot – bud initiation from protonemata in moss *Physcomitrium tubinatum*. *Am. J. Bot.* 55:38 – 44.
- Novak, F.J. y Maskova, I. 1979. Apical shoot tip culture of tomato. *Sci. Hort.* 10: 337–344.
- Nuez, Fernando. 1995. El Cultivo del Tomate. Ediciones Mundi-Prensa, España, Barcelona: 793 pp.
- Ouellet, F. 2007. Cold acclimation and freezing tolerance in plants. *Encyclopedia of life sciences*, John Wiley y Sons, Ltd. www.els.net.
- Padmanabhan, V., Paddock, E.F. y Sharp, W.R. 1974. Plantlet formation from *in vitro* from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. *Can. J. Bot.* 52: 1429–1432.
- Peralta, I., E., y Spooner, D., M. 2000. Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28(1): 45-54.
- Peralta, I., E., y Spooner, D., M. 2007. History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). *Genetic improvement of Solanaceae crops Vol. 2. Tomato*. Science Publishers.
- Philips, G. 2004. Invited review: *in vitro* morphogenesis in plants – recent advances. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 40:342–345.
- Plastira, V., A., y Perdikaris, A., K. 1997. Effect of genotype and explant type in regeneration frequency of tomato *in vitro*. *Hor. Biotech, In Vitro Cult. and Breeding. Acta Horti.* 447. 231–234.
- Quiroz – Figueroa, F.R., Rojas – Herrera, R., Galaz – Avalos y Loyola – Vargas, V.M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86: 285-301.
- Radice, S. 2014. Morfogénesis Cap.2. Parte I Herramientas básicas. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. INTA. ArgenBio.

- Rahman, M.M. y Kaul, K. 1989. Differentiation of sodium chloride tolerant cell lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Jet Star. J. Plant Physiol. 133: 710–712.
- Ramage, C.M., y Williams, R.R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant*.38 (2):116–124.
- Rao, K.V., Kiranmayee, K., Pavan, U., Sree, T.J., Rao, A. V., Sadanandam, A. 2005. Induction of multiple shoots from leaf segments, *in vitro*-flowering and fruiting of a dwarf tomato (*Lycopersicon esculentum*). Journal of Plant Physiology 162. 959-962pp.
- Rhodes D. 2002. Tomatoes – Notes (Purdue University).
- Roy, R., Purty, R. S., Agrawal, V. y Gupta, S. C. 2006. Transformation of tomato cultivar ‘Pusa Ruby’ with bspA gene from *Populus tremula* for drought tolerance. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 84: 55–67.
- Saad, A.I.M. y Elshahed, A.M. 2012. Plant tissue culture media. Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. INTECH.
- Sandve, S. R., Kosmala, A., Rudi, H., Fjellheim, S., Rapacz, M., Yamada, T., Rognli, O. A. 2011. Molecular mechanisms underlying frost tolerance in perennial grasses adapted to cold climates. Plant Sci 180(1).
- Sanghera, G. S., Wani, S. H., Hussain, W. y Singh, N. B. 2011. Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants. Current Genomics, Vol. 12, No. 1.
- Schmidt, E.D.L., Guzzo, F., Toonen, MAJ., de Vries SC. 1997. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development. 124: 2049-2062.
- Schutze, R. y Wiczorrek, G. 1987. Investigations into tomato tissue cultures. I. Shoot regeneration in primary explants of tomato. Arch. Zuchtungsforchung 17: 3–15.
- Shah, S. H., Ali, S., Hussain, Z., Jan, S. A., Din, J. U. y Ali, G. M. 2016. Genetic improvement of tomato (*Solanum lycopersicum*) with AtDREB1A gene for cold stress tolerance using optimized Agrobacterium-mediated transformation system. Int. J. Agric. Biol., 18: 471–482.
- Sink, K.C., Handley, L.W., Niedz, R.P. y Moore, P.P. 1986. Protoplast culture and use of regeneration attributes to select tomato plants. Genet. Manip. 405–413.
- Smith, R.H. 2013. Plant tissue culture. Techniques and experiments. Third edition. Elsevier.
- Soh, W., Y. y Bhojwani, S., S. 2010. Morphogenesis in Plant Tissue Culture. Springer Netherlands. 520 pp.

- Soh, W., Y. y Bhojwani, S., S. 2013. Morphogenesis in Plant Tissue Culture. Springer Science & Business Media. 520 pp.
- Stavarek, S.J. y Rains, D.W. 1984. The development of tolerance to mineral stress. Hort. Science I19: 377–382.
- Stavarek, S.J. y Rains, D.W. 1984. The development of tolerance to mineral stress. HortScience I19: 377–382.
- Steward F.C. y Israel H.W. 1970. Plant growth substances, multiple interaction between media, growth factors and the environment of carrot cultures: effects of growth and morphogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, XIV, 838 pp.
- Steward, C.R., Martin, B.A., Reding, L., Cerwick, S. 1990. Respiration and alternative oxidase in corn seedling tissues during germination at different temperatures // Plant Physiology. p. 92, No. 3, 755–760 p.
- Sugiyama M. 1999. Organogenesis *in vitro*. Elsevier Science Ltd ISSN 1369-5266.
- Theocharis, A., Clement, C., Barka, E. A. 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. Planta.
- Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50.
- Torres, K.C. 1989. Tissue culture techniques for horticultural crops. Springer link.
- Toyoda, H., Matsuda, Y. y Hirai, T. 1985. Resistance mechanism of cultured plant cells to tobacco mosaic virus (III) Efficient microinjection of tobacco mosaic virus into tomato callus cells. Ann. Phytol. Soc. Jap. 51: 32–38.
- Toyoda, H., Shimizu, K., Chatani, K., Kita, N., Matsuda, Y. y Ouchi, S. 1989. Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue culture. Plant Cell Rep. 8: 317–320.
- Toyoda, H., Tanaka, N. y Hirai, T., 1984 Effects of the culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersicon* tomato callus growth and the selection of resistant callus cells to the filtrate. Ann. Phytol. Soc. Jap. 50: 53–62.
- Vasil, I., K, Thorpe, T., A. 1998. Plant cell and tissue culture. Springer Science + Business Media Dordrecht: Kluwer Acad. Publ.
- Vasil, I., K. 2008a. A short history of plant biotechnology. Phytochem Rev (2008) 7:387-394.
- Vasil, I., K. 2008b. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. Plant Cell Rep (2008) 27:1423–1440.

- Wijbrandi, J., Vos, J.G.M. y Koornneef, M. 1988. Transfer of regeneration capacity from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum* by protoplast fusion. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 12: 193–196.
- Wilson, J.M. 1978. Leaf respiration and ATP levels at chilling temperatures // *New Phytologist*. Vol. 80, No. 2, p. 325–334.
- Yadegari, L.Z., Heidari, R., Carapetian, J. 2008. Chilling pretreatment causes some changes in respiration, membrane permeability and some other factors in soybean seedlings // *Research Journal of Biological Sciences*. Vol. 3, No. 9, p. 1054–1059.
- Yeoman, M., M. 1986. Plan cell culture technology. Chapter 2 Determination and morphogenetic competence in plant tissue culture. *Bot. Mon.* Vol 23.
- Zagorska, N.A., Abadjieva, M.D. y Georgiev, H.A. 1982. Inducing regeneration in anther cultures of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sci.* 35: 97–100.
- Zagorska, N.A., Shtereva, A., Dimitrov, B.D. y Kruleva, M.M. 1998. Induced androgenizes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). I. Influence of genotype on androgenetic ability. *Plant Cell Rep.* 17: 968–973.
- Zapata, F.J., Sink, K.C. y Cocking, E.C. 1981. Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species: *L. esculentum*, cv. Walter, *L. pimpinillifolium* and *L. hirsutum* F. glabratum. *Plant Sci. Lett.* 23: 41–46.
- Zhang, Y., Liu, H., Li, B., Zhang, J. T., Li, Y. y Zhang, H. 2009. Generation of selectable marker-free transgenic tomato resistant to drought, cold and oxidative stress using the Cre/loxP DNA excision system. *Transgenic Res.*, 18: 607–619.
- Zimmerman, L., J. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, Vol. 5, 1411-1423.

VIII. APÉNDICE

1A. Componentes del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) empleados para la inducción, multiplicación y enraizamiento de brotes de tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry *in vitro*.

| Macronutrientes (mg L ⁻¹) | | Micronutrientes (mg L ⁻¹) | | | |
|---------------------------------------|------|--|-------|-------------------------------------|-------|
| KH ₄ NO ₃ | 1650 | KI | 0.83 | CuSO ₄ 5H ₂ O | 0.025 |
| KNO ₃ | 1900 | H ₃ BO ₃ | 6.20 | CoCl ₂ 6H ₂ O | 0.025 |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 440 | MnSO ₄ H ₂ O | 15.60 | Na ₂ EDTA | 37.30 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 370 | ZnSO ₄ 7H ₂ O | 8.60 | FeSO ₄ 7H ₂ O | 27.80 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O | 0.25 | o EDTA | 50.00 |

2A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de supervivencia y germinación *in vitro* de semillas de tres colectas jitomate silvestre tipo Cherry.

| Fuente de Variación | S | G |
|--------------------------|--------|---------|
| Método de esterilización | 0.0 NS | 0.451 * |
| Error | 0 | 0.035 |
| CV | 0 | 29.230 |
| R ² | 0 | 0.602 |
| Media | 100 | 0.644 |

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación; S: Porcentaje de supervivencia; G: Porcentaje de germinación.

3A. Cuadrados medios y su significancia de análisis de varianza de cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la inducción de brotes *in vitro* en tres explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 300.

| Fuente de Variación | B (%) | BE (Núm.) | LB (cm) | Callo (%) |
|------------------------|----------|-----------|---------|-----------|
| BAP | 0.061 NS | 11.755 * | 0.166 * | 0.630 * |
| Tipos de Explantes | 0.180 NS | 24.008 * | 0.220 * | 1.425 * |
| BAP x Tipo de explante | 0.054 NS | 8.624 * | 0.104 * | 0.493 * |
| Error | 0.642 | 1.172 | 0.041 | 0.210 |
| C.V. | 28.127 | 87.785 | 89.158 | 73.353 |
| R ² | 0.079 | 1.082 | 0.204 | 0.192 |
| Media | 0.901 | 1.233 | 0.228 | 0.625 |

*: Significativo; NS: No significativo; B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación.

4A. Cuadrados medios y su significancia de análisis de varianza de cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la inducción de brotes *in vitro* en tres explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 367.

| Fuente de Variación | B (%) | BE (Núm.) | LB (cm) | Callo (%) |
|------------------------|----------|-----------|---------|-----------|
| BAP | 0.029 NS | 7.133 * | 0.199 * | 1.697 * |
| Tipos de Explantes | 0.232 NS | 6.808 * | 0.127 * | 1.108 * |
| BAP x Tipo de explante | 0.017 NS | 3.842 * | 0.089 * | 0.699 * |
| Error | 0.065 | 0.511 | 0.029 | 0.206 |
| C.V. | 28.642 | 97.489 | 99.795 | 89.390 |
| R ² | 0.045 | 0.433 | 0.239 | 0.256 |
| Media | 0.896 | 0.733 | 0.170 | 0.508 |

*: Significativo; NS: No significativo; B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación.

5A. Cuadrados medios y su significancia de análisis de varianza de cuatro concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la inducción de brotes *in vitro* en tres explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 457.

| Fuente de Variación | B (%) | BE (Núm.) | LB (cm) | Callo (%) |
|------------------------|----------|-----------|---------|-----------|
| BAP | 0.122 NS | 23.252 * | 0.214 * | 2.255 * |
| Tipos de Explantes | 0.069 NS | 15.633 * | 0.105 * | 1.508 * |
| BAP x Tipo de explante | 0.047 NS | 10.335 * | 0.085 * | 0.924 * |
| Error | 0.059 | 0.834 | 0.024 | 0.168 |
| C.V. | 28.014 | 75.589 | 81.665 | 66.569 |
| R ² | 0.075 | 0.557 | 0.263 | 0.358 |
| Media | 0.871 | 1.208 | 0.191 | 0.616 |

*: Significativo; NS: No significativo; B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación.

6A. Respuesta de diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 300 en la inducción de brotes a las cuatro semanas de cultivo.

| Explante | B (%) [¶] | BE (Núm.) [¶] | LB (cm) [¶] | Callo (%) [¶] |
|--------------------|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Yema apical | 94.0 a | 2.075 a | 0.287 a | 80.0 a |
| Yema axilar | 94.0 a | 1.075 b | 0.252 ab | 65.0 ab |
| Segmentos de Tallo | 82.3 a | 0.550 b | 0.145 b | 42.5 b |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna de cada colecta son significativamente diferentes (P≤0.05); B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación n=10 repeticiones.

7A. Respuesta de diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 367 en la inducción de brotes a las cuatro semanas de cultivo.

| Explante | B (%) [¶] | BE (Núm.) [¶] | LB (cm) [¶] | Callo (%) [¶] |
|--------------------|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Yema apical | 94.0 a | 1.150 a | 0.230 a | 65.0 a |
| Yema axilar | 91.4 a | 0.725 b | 0.165 ab | 55.0 ab |
| Segmentos de Tallo | 83.6 a | 0.325 c | 0.117 b | 32.5 b |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna de cada colecta son significativamente diferentes (P≤0.05); B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación n=10 repeticiones.

8A. Respuesta de diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colecta No. 457 en la inducción de brotes a las cuatro semanas de cultivo.

| Explante | B (%) [¶] | BE (Núm.) [¶] | LB (cm) [¶] | Callo (%) [¶] |
|--------------------|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Yema apical | 90.1 a | 1.825 a | 0.225 a | 77.5 a |
| Yema axilar | 88.8 a | 1.225 b | 0.217 a | 67.5 a |
| Segmentos de Tallo | 82.3 a | 0.575 c | 0.132 b | 40.0 b |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna de cada colecta son significativamente diferentes (P≤0.05); B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación n=10 repeticiones.

9A. Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colectas No. 300 a las cuatro semanas de cultivo.

| BAP (mg L ⁻¹) | B (%) [¶] | BE (Núm.) [¶] | LB (cm) [¶] | Callo (%) [¶] |
|---------------------------|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| 1.5 | 96.5 a | 1.533 a | 0.320 a | 76.6 a |
| 2.5 | 89.6 a | 1.966 a | 0.253 ab | 73.3 a |
| 3.5 | 87.9 a | 0.800 b | 0.190 ab | 50.0 a |
| 4.5 | 86.2 a | 0.633 b | 0.150 b | 50.0 a |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna de cada colecta son significativamente diferentes (P≤0.05); B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación n=10 repeticiones.

10A. Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colectas No. 367 a las cuatro semanas de cultivo.

| BAP (mg L ⁻¹) | B (%) [¶] | BE (Núm.) [¶] | LB (cm) [¶] | Callo (%) [¶] |
|---------------------------|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| 1.5 | 87.9 a | 1.100 a | 0.260 a | 76.6 a |
| 2.5 | 93.1 a | 1.200 a | 0.216 ab | 63.3 ab |
| 3.5 | 91.4 a | 0.400 b | 0.123 bc | 40.0 bc |
| 4.5 | 86.2 a | 0.233 b | 0.083 c | 23.3 c |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna de cada colecta son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación n=10 repeticiones.

11A. Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry Colectas No. 457 a las cuatro semanas de cultivo.

| BAP (mg L ⁻¹) | B (%) [¶] | BE (Núm.) [¶] | LB (cm) [¶] | Callo (%) [¶] |
|---------------------------|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| 1.5 | 91.4 a | 1.800 a | 0.240 a | 86.0 a |
| 2.5 | 93.1 a | 2.100 a | 0.263 a | 80.0 ab |
| 3.5 | 84.5 a | 0.666 b | 0.190 a | 53.3 bc |
| 4.5 | 79.3 a | 0.266 b | 0.073 b | 26.6 c |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna de cada colecta son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación n=10 repeticiones.

12A. Efecto de la interacción de la colecta No. 300 con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (kin) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en tres diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry a las cuatro semanas de cultivo.

| BAP (mg L ⁻¹) + Tipo de explante | B (%) [¶] | BE (Núm.) [¶] | LB (cm) [¶] | Callo (%) [¶] |
|--|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| 1.5 + yema apical | 100.0 a | 2.6 ab | 0.42 a | 100.0 a |
| 1.5 + yema axilar | 100.0 a | 1.3 bc | 0.36 a | 80.0 ab |
| 1.5 + segmentos de tallo | 86.2 a | 0.7 c | 0.18 ab | 50.0 ab |
| 2.5 + yema apical | 91.4 a | 3.4 a | 0.34 ab | 100.0 a |
| 2.5 + yema axilar | 92.5 a | 1.6 bc | 0.20 ab | 60.0 ab |
| 2.5 + segmentos de tallo | 81.0 a | 0.9 c | 0.22 ab | 60.0 ab |
| 3.5 + yema apical | 91.4 a | 1.3 bc | 0.19 ab | 60.0 ab |
| 3.5 + yema axilar | 91.4 a | 0.8 c | 0.25 ab | 60.0 ab |
| 3.5 + segmentos de tallo | 81.0 a | 0.3 c | 0.13 ab | 30.0 b |
| 4.5 + yema apical | 91.4 a | 1.0 bc | 0.20 ab | 60.0 ab |
| 4.5 + yema axilar | 86.2 a | 0.6 c | 0.20 ab | 60.0 ab |
| 4.5 + segmentos de tallo | 81.0 a | 0.3 c | 0.05 b | 30.0 b |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna de cada colecta son significativamente diferentes (P≤0.05); B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación n=10 repeticiones.

13A. Efecto de la interacción de la colecta No. 367 con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (kin) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en tres diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry a las cuatro semanas de cultivo.

| BAP (mg L ⁻¹) + Tipo de explante | B (%) [¶] | BE (Núm.) [¶] | LB (cm) [¶] | Callo (%) [¶] |
|--|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| 1.5 + yema apical | 91.4 a | 1.8 a | 0.37 a | 100.0 a |
| 1.5 + yema axilar | 91.4 a | 1.0 ab | 0.25 ab | 80.0 ab |
| 1.5 + segmentos de tallo | 81.0 a | 0.5 b | 0.16 ab | 50.0 abc |
| 2.5 + yema apical | 96.5 a | 2.0 a | 0.25 ab | 80.0 ab |
| 2.5 + yema axilar | 96.5 a | 1.1 ab | 0.17 ab | 60.0 abc |
| 2.5 + segmentos de tallo | 86.2 a | 0.5 b | 0.23 ab | 50.0 abc |
| 3.5 + yema apical | 96.5 a | 0.5 b | 0.18 ab | 50.0 abc |
| 3.5 + yema axilar | 91.4 a | 0.5 b | 0.14 ab | 50.0 abc |
| 3.5 + segmentos de tallo | 86.2 a | 0.2 b | 0.05 b | 20.0 bc |
| 4.5 + yema apical | 91.4 a | 0.3 b | 0.12 ab | 30.0 bc |
| 4.5 + yema axilar | 86.2 a | 0.3 b | 0.10 b | 30.0 bc |
| 4.5 + segmentos de tallo | 81.0 a | 0.1 b | 0.03 b | 10.0 c |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna de cada colecta son significativamente diferentes (P≤0.05); B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación n=10 repeticiones.

14A. Efecto de la interacción de la colecta No. 457 con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (kin) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de inducción de brotes en tres diferentes explantes de jitomate silvestre tipo Cherry a las cuatro semanas de cultivo.

| BAP (mg L ⁻¹) + Tipo de explante | B (%) [¶] | BE (Núm.) [¶] | LB (cm) [¶] | Callo (%) [¶] |
|--|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| 1.5 + yema apical | 97.0 a | 2.9 ab | 0.29 a | 100.0 a |
| 1.5 + yema axilar | 91.0 a | 1.6 bcd | 0.22 ab | 80.0 ab |
| 1.5 + segmentos de tallo | 86.0 a | 0.9 cde | 0.21 ab | 60.0 abc |
| 2.5 + yema apical | 97.0 a | 3.1 a | 0.28 a | 100.0 a |
| 2.5 + yema axilar | 97.0 a | 2.1 abc | 0.29 a | 90.0 ab |
| 2.5 + segmentos de tallo | 86.0 a | 1.1 cde | 0.22 ab | 70.0 ab |
| 3.5 + yema apical | 86.0 a | 0.8 cde | 0.20 ab | 60.0 abc |
| 3.5 + yema axilar | 86.0 a | 0.9 cde | 0.27 a | 70.0 ab |
| 3.5 + segmentos de tallo | 81.0 a | 0.3 de | 0.10 ab | 30.0 bc |
| 4.5 + yema apical | 81.0 a | 0.5 de | 0.13 ab | 50.0 abc |
| 4.5 + yema axilar | 81.0 a | 0.3 de | 0.09 ab | 30.0 bc |
| 4.5 + segmentos de tallo | 76.0 a | 0.0 e | 0.00 b | 0.00 c |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna de cada colecta son significativamente diferentes (P≤0.05); B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación n=10 repeticiones.

15A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de cinco concentraciones de citocininas; bencilaminopurina (BAP) y cinetina (Kin) adicionadas con ácido naftalenacético (0.1 mg L⁻¹ ANA) en la multiplicación de brotes *in vitro* en explantes de yema apical de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry.

| Fuente de Variación | B (%) | BE (Núm.) | LB (cm) | Callo (%) |
|----------------------------|----------|-----------|----------|-----------|
| Genotipo | 0.006 NS | 18.620 * | 0.018 NS | 0.046 NS |
| Concentración de BAP + Kin | 0.906 * | 40.860 * | 0.072 * | 0.260 NS |
| Genotipo x BAP + kin | 0.563 * | 17.302 * | 0.036 NS | 0.155 NS |
| Error | 0.185 | 1.868 | 0.021 | 0.152 |
| C.V. | 64.038 | 96.272 | 78.075 | 48.028 |
| R ² | 0.239 | 0.489 | 0.148 | 0.095 |
| Media | 0.673 | 1.420 | 0.189 | 0.813 |

*: Significativo; NS: No significativo; B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación.

16A. Efecto de la interacción del genotipo con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (kin) sobre el porcentaje de brotación (B), el número de brotes (BE), la longitud de brotes (LB) y la formación de callo (FC) en la etapa de multiplicación de brotes en explantes de yema apical de las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry a las cuatro semanas de cultivo.

| Colecta x BAP (mg L ⁻¹) + Kin (mg L ⁻¹) | B (%) [¶] | BE (Núm.) [¶] | LB (cm) [¶] | Callo (%) [¶] |
|---|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Colecta No. 300 + (Sin hormona) | 90.0 ab | 0.9 c | 0.23 a | 90.0 a |
| Colecta No. 300 + (0.5 + 0) | 50.0 ab | 1.1 c | 0.15 a | 70.0 a |
| Colecta No. 300 + (1.0 + 0) | 40.0 ab | 1.1 c | 0.14 a | 80.0 a |
| Colecta No. 300 + (0 + 0.5) | 80.0 ab | 5.2 a | 0.24 a | 90.0 a |
| Colecta No. 300 + (0 + 1.0) | 80.0 ab | 1.9 bc | 0.21 a | 90.0 a |
| Colecta No. 367 + (Sin hormona) | 60.0 ab | 0.6 c | 0.22 a | 60.0 a |
| Colecta No. 367 + (0.5 + 0) | 60.0 ab | 0.6 c | 0.22 a | 70.0 a |
| Colecta No. 367 + (1.0 + 0) | 80.0 ab | 0.8 c | 0.21 a | 90.0 a |
| Colecta No. 367 + (0 + 0.5) | 100.0 a | 1.7 bc | 0.29 a | 100.0 a |
| Colecta No. 367 + (0 + 1.0) | 30.0 b | 0.3 c | 0.09 a | 70.0 a |
| Colecta No. 457 + (Sin hormona) | 70.0 ab | 0.9 c | 0.16 a | 70.0 a |
| Colecta No. 457 + (0.5 + 0) | 90.0 ab | 1.3 c | 0.2 a | 90.0 a |
| Colecta No. 457 + (1.0 + 0) | 30.0 b | 0.6 c | 0.08 a | 80.0 a |
| Colecta No. 457 + (0 + 0.5) | 100.0 a | 3.6 ab | 0.26 a | 100.0 a |
| Colecta No. 457 + (0 + 1.0) | 50.0 ab | 0.8 c | 0.14 a | 70.0 a |

[¶]Medias con diferentes letras en cada columna con significativamente diferentes (P≤0.05); B: porcentaje de brotación; BE: número de brotes por explante; LB: longitud de brotes; C: porcentaje de formación de callo; C.V.: Coeficiente de variación n=10 repeticiones.

17A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en el comportamiento de las colectas de jitomate silvestre tipo Cherry en el enraizamiento *in vitro* de plántulas de las colectas Núm. 300, 367 y 457.

| Fuente de Variación | (%) | R | L (R) | AP |
|---------------------|----------|---------|--------|--------|
| Colecta | 0.098 NS | 49.89 * | 4.52 * | 8.35 * |
| Error | 0.10 | 45.22 | 3.49 | 6.39 |
| CV | 36.19 | 75.65 | 45.31 | 40.73 |
| R ² | 0.35 | 0.39 | 0.43 | 0.43 |
| Media | 0.88 | 8.88 | 4.12 | 6.20 |

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación. % = Porcentaje de enraizamiento; R=Raíces; L(R)=Longitud de raíces; AP=Altura de planta.

18A. Efecto de la colecta en la respuesta organogénica medida en porcentaje de enraizamiento (%), número de raíces (R), longitud de raíces (LR) y altura de planta (AP) en tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry durante la etapa de enraizamiento de plántulas. n=12 repeticiones.

| Colecta (Núm.) | (%) | R | L (R) | AP |
|----------------|---------|--------|--------|---------|
| 300 | 100.0 a | 8.75 a | 5.08 a | 7.77 a |
| 367 | 91.0 a | 9.97 a | 3.58 a | 4.55 b |
| 457 | 75.0 a | 8.00 a | 3.70 a | 6.35 ab |

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (P≤0.05). n=12 repeticiones.

19A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en el comportamiento de las colecta de jitomate silvestre tipo Cherry en la aclimatación *in vivo* de plántulas de las colectas Núm. 300, 367 y 457, medida en porcentaje de supervivencia (%).

| Fuente de Variación | 5 cm | 10 cm |
|---------------------|----------|----------|
| Colecta | 0.066 NS | 0.022 NS |
| Repetición | 0.276 * | 0.374 * |
| Error | 0.042 | 0.022 |
| CV | 23.886 | 17.653 |
| R ² | 0.769 | 0.894 |
| Media | 0.866 | 0.844 |

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

20A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de seis tiempos de exposición a -8 °C de plántulas *in vitro* de 2 y 4 cm de altura de colectas de jitomate tipo Cherry.

| Fuente de Variación | S | | AP (cm) | | Nh | | Nr | | Lr (cm) | | D (%) | |
|-----------------------------|-------|----|---------|----|--------|----|--------|---|---------|----|-------|----|
| Plántulas de 2 cm | | | | | | | | | | | | |
| Colecta | 0.29 | NS | 6.35 | NS | 9.04 | NS | 18.17 | * | 28.22 | * | 0.14 | NS |
| Tiempo de exposición | 4.20 | * | 35.90 | * | 81.79 | * | 12.51 | * | 20.87 | * | 1.98 | * |
| Colecta x Tiempo exposición | 1.47 | * | 16.62 | * | 29.81 | * | 7.02 | * | 13.33 | * | 0.70 | * |
| Error | 0.13 | | 4.09 | | 3.58 | | 2.49 | | 4.01 | | 0.09 | |
| C.V. | 90.64 | | 175.92 | | 105.74 | | 200.19 | | 160.92 | | 42.32 | |
| R ² | 0.48 | | 0.25 | | 0.41 | | 0.17 | | 0.22 | | 0.38 | |
| Media | 0.40 | | 1.15 | | 1.79 | | 0.85 | | 1.24 | | 0.72 | |
| Plántulas de 4 cm | | | | | | | | | | | | |
| Colecta | 0.72 | * | 21.37 | NS | 12.28 | NS | 24.33 | * | 1.04 | NS | 0.56 | * |
| Tiempo de exposición | 3.97 | * | 113.29 | * | 62.95 | * | 29.98 | * | 32.46 | * | 1.89 | * |
| Colecta x Tiempo exposición | 1.39 | * | 47.52 | * | 27.46 | * | 21.35 | * | 20.01 | * | 0.71 | * |
| Error | 0.15 | | 8.92 | | 8.02 | | 5.3 | | 4.46 | | 0.13 | |
| C.V. | 83.36 | | 100 | | 111.65 | | 154.54 | | 116.88 | | 60.69 | |
| R ² | 0.44 | | 0.31 | | 0.22 | | 0.25 | | 0.27 | | 0.31 | |
| Media | 0.46 | | 2.98 | | 2.53 | | 1.49 | | 1.8 | | 0.6 | |

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación. S =Supervivencia; AP=Altura de planta; Nh=Número de hojas; Nr=Número de raíces; Lr=Longitud de raíces; D=Daño a la plántula.

21A. Efecto de las colectas en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia (S), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) en tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry durante la etapa de inducción de heladas en plantas de dos centímetros. n=12 repeticiones.

| Colecta (Núm.) | S [¶] | | AP (cm) [¶] | | Nh [¶] | | Nr [¶] | | Lr (cm) [¶] | | D (%) [¶] | |
|----------------|----------------|---|----------------------|---|-----------------|---|-----------------|---|----------------------|---|--------------------|---|
| 300 | 44.0 | a | 1.26 | a | 1.62 | a | 0.59 | b | 1.36 | a | 71.0 | a |
| 367 | 44.0 | a | 1.37 | a | 2.19 | a | 1.43 | a | 1.80 | a | 68.0 | a |
| 457 | 33.0 | a | 0.81 | a | 1.52 | a | 0.52 | b | 0.56 | b | 77.0 | a |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (P≤0.05). n=12 repeticiones.

22A. Efecto de la interacción entre el tiempo de exposición a -8 °C y las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia (S), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) durante la etapa de inducción de heladas en plantas enraizadas *in vitro* de dos centímetros, obtenidas de la etapa de enraizamiento. n=12 repeticiones.

| Tiempo de exposición (min) | S [¶] | AP (cm) [¶] | Nh [¶] | Nr [¶] | Lr [¶] | D [¶] |
|----------------------------|----------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| 10 | 86.0 a | 2.65 a | 2.36 b | 1.16 ab | 2.02 a | 40.0 c |
| 20 | 36.0 c | 1.09 bcd | 1.77 b | 1.00 abc | 1.44 ab | 75.0 b |
| 30 | 69.0 ab | 1.46 bc | 2.83 ab | 1.55 a | 1.72 ab | 58.0 bc |
| 40 | 47.0 bc | 1.58 ab | 3.72 a | 1.11 abc | 1.61 ab | 62.0 b |
| 50 | 5.0 d | 0.10 cd | 0.05 c | 0.27 bc | 0.66 bc | 97.0 a |
| 60 | 0.0 d | 0.00 d | 0.00 c | 0.00 c | 0.00 c | 100.0 a |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (P≤0.05). n=12 repeticiones.

23A. Efecto de la interacción entre las colecta Núm. 300, 367 y 457 y tiempos de exposición a -8 °C en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia (R), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) durante la etapa de inducción de heladas en plantas enraizadas *in vitro* de dos centímetros, obtenidas de la etapa de enraizamiento. n=12 repeticiones.

| Colecta (Núm.) | Tiempo de exposición (min) | S [¶] | AP (cm) [¶] | Nh [¶] | Nr [¶] | Lr (cm) [¶] | D (%) [¶] |
|----------------|----------------------------|----------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------------|--------------------|
| 300 | 10 | 66.0 a-d | 1.35 ab | 1.25 cd | 0.92 bc | 2.91 a | 56.0 ab |
| | 20 | 66.0 a-d | 2.24 ab | 2.58 a-d | 1.25 bc | 2.25 ab | 60.0 ab |
| | 30 | 75.0 abc | 2.14 ab | 2.75 abc | 1.92 abc | 0.00 b | 47.0 b |
| | 40 | 58.0 a-c | 1.87 ab | 3.33 ab | 0.83 bc | 1.66 ab | 62.0 ab |
| | 50 | 0.0 e | 0.00 b | 0.00 d | 0.08 c | 0.00 b | 100.0 a |
| | 60 | 0.0 e | 0.00 b | 0.00 d | 0.75 bc | 0.00 b | 100.0 a |
| 367 | 10 | 91.0 ab | 3.93 a | 3.58 ab | 2.33 abc | 1.83 ab | 25.0 b |
| | 20 | 41.0 b-e | 1.03 ab | 2.75 abc | 5.00 a | 2.08 ab | 67.0 ab |
| | 30 | 66.0 a-d | 0.65 b | 2.50 a-d | 1.33 bc | 2.16 ab | 68.0 ab |
| | 40 | 50.0 a-e | 2.29 ab | 4.16 a | 3.83 ab | 2.75 ab | 58.0 ab |
| | 50 | 16.0 e | 0.30 b | 0.16 cd | 0.17 c | 2.00 ab | 93.0 a |
| | 60 | 0.0 e | 0.00 b | 0.00 d | 0.00 c | 0.00 b | 100.0 a |
| 457 | 10 | 100.0 a | 2.69 ab | 2.25 a-d | 2.58 abc | 1.33 ab | 39.0 b |
| | 20 | 0.0 e | 0.00 b | 0.00 d | 1.00 bc | 0.00 b | 100.0 a |
| | 30 | 66.0 a-d | 1.58 ab | 3.25 ba | 2.08 abc | 1.66 ab | 58.0 ab |
| | 40 | 33.0 cde | 0.60 b | 3.66 ba | 1.67 bc | 0.41 ab | 66.0 ab |
| | 50 | 0.0 e | 0.00 b | 0.00 d | 1.08 bc | 0.00 b | 100.0 a |
| | 60 | 0.0 e | 0.00 b | 0.00 d | 0.00 c | 0.00 b | 100.0 a |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (P≤0.05). n=12 repeticiones.

24A. Efecto de las colectas en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia (S), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) en tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry durante la etapa de inducción de heladas en plantas de cuatro centímetros. n=12 repeticiones.

| Colecta (Núm.) | S [¶] | AP (cm) [¶] | Nh [¶] | Nr [¶] | Lr [¶] | D [¶] |
|----------------|----------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| 300 | 41.0 b | 2.54 a | 2.30 a | 0.95 b | 1.71 a | 70.0 a |
| 367 | 40.0 b | 2.81 a | 2.29 a | 2.11 a | 1.76 a | 57.0 ab |
| 457 | 58.0 a | 3.59 a | 3.01 a | 1.40 ab | 1.94 a | 53.0 b |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (P≤0.05). n=12 repeticiones.

25A. Efecto de la interacción entre el tiempo de exposición a -8 °C y las tres colectas de jitomate silvestre tipo Cherry en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia(S), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) durante la etapa de inducción de heladas en plantas enraizadas *in vitro* de cuatro centímetros, obtenidas de la etapa de enraizamiento. n=12 repeticiones.

| Tiempo de exposición (min) | S [¶] | AP (cm) [¶] | Nh [¶] | Nr [¶] | Lr [¶] | D [¶] |
|----------------------------|----------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| 10 | 75.0 ab | 5.59 a | 4.2 a | 1.9 ab | 3.12 a | 42.0 c |
| 20 | 88.0 a | 3.84 ab | 2.7 ab | 2.4 a | 2.55 a | 40.0 c |
| 30 | 47.0 c | 2.68 bc | 2.8 ab | 1.8 abc | 1.69 ab | 57.0 bc |
| 40 | 50.0 bc | 3.58 abc | 3.5 ab | 2.1 a | 1.94 ab | 48.0 c |
| 50 | 19.0 d | 1.66 cd | 1.6 bc | 0.4 bc | 0.72 b | 74.0 b |
| 60 | 0.0 d | 0.54 d | 0.5 c | 0.3 c | 0.80 b | 100.0 a |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (P≤0.05). n=12 repeticiones.

26A. Efecto de la interacción entre las colecta Núm. 300, 367 y 457 y tiempos de exposición a -8 °C en la respuesta organogénica medida en porcentaje de supervivencia (S), altura de planta (AP), número de hojas (Nh), número de raíces (Nr), longitud de raíces (Lr) y porcentaje de daño (%) durante la etapa de inducción de heladas en plantas enraizadas *in vitro* de cuatro centímetros, obtenidas de la etapa de enraizamiento. n=12 repeticiones.

| Colecta (Núm.) | Tiempo de exposición (min) | S [¶] | AP (cm) [¶] | Nh [¶] | Nr [¶] | Lr (cm) [¶] | D (%) [¶] |
|----------------|----------------------------|----------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------------|--------------------|
| 300 | 10 | 66.0 a-d | 4.61 ab | 4.41 abc | 0.91 bc | 1.70 bc | 60.0 abc |
| | 20 | 91.0 ab | 3.95 a-d | 2.58 a-d | 1.25 bc | 2.41 abc | 43.0 bc |
| | 30 | 41.0 b-e | 3.24 bcd | 3.25 a-d | 1.91 abc | 2.16 abc | 56.0 abc |
| | 40 | 33.0 cde | 1.65 bcd | 1.91 a-d | 0.83 bc | 1.16 bc | 70.0 abc |
| | 50 | 16.0 de | 0.48 bcd | 0.41 cd | 0.08 c | 0.41 c | 91.0 ab |
| | 60 | 0.0 e | 1.33 bcd | 1.25 bcd | 0.75 bc | 2.41 abc | 100.0 a |
| 367 | 10 | 66.0 a-d | 3.92 bcd | 2.75 a-d | 2.33 abc | 2.66 abc | 41.0 bc |
| | 20 | 100.0 a | 3.80 bcd | 3.00 a-d | 5.00 a | 3.75 abc | 29.0 c |
| | 30 | 33.0 cde | 2.12 bcd | 1.75 a-d | 1.33 bc | 1.33 bc | 68.0 abc |
| | 40 | 41.0 b-e | 4.59 abc | 3.75 a-d | 3.83 ab | 2.66 abc | 39.0 bc |
| | 50 | 0.0 e | 2.16 bcd | 2.25 a-d | 0.16 c | 0.16 c | 66.0 abc |
| | 60 | 0.0 e | 0.29 cd | 0.25 d | 0.00 c | 0.00 c | 100.0 a |
| 457 | 10 | 91.0 ab | 8.25 a | 5.47 a | 2.58 abc | 5.00 a | 25.0 c |
| | 20 | 75.0 a-d | 3.78 bcd | 2.41 a-d | 1.00 bc | 1.50 bc | 47.0 abc |
| | 30 | 66.0 a-d | 2.70 bcd | 3.25 a-d | 2.08 abc | 1.58 bc | 47.0 abc |
| | 40 | 75.0 abc | 4.50 abc | 4.83 ab | 1.66 bc | 2.00 abc | 35.0 c |
| | 50 | 41.0 b-e | 2.33 bcd | 2.16 a-d | 1.08 bc | 1.58 bc | 64.0 abc |
| | 60 | 0.0 e | 0.00 d | 0.00 d | 0.00 c | 0.00 c | 100.0 a |

[¶]Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (P≤0.05). n=12 repeticiones.