



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y  
CRIOPRESERVACIÓN DE TOMATE DE CÁSCARA**  
(*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)

**TESIS  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

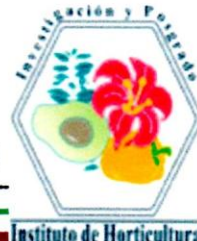


DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
FICHA DE EXÁMENES PROFESIONALES

**PRESENTA:  
KAREN CARSTENSEN BENAVIDES**



CHAPINGO, MÉXICO, FEBRERO DE 2014



**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CRIOPRESERVACIÓN DE TOMATE  
DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)”**

Esta tesis fue realizada por Karen Carstensen Benavides bajo la dirección del Consejo Particular que se indica, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**DIRECTOR:**



DR. AURELIANO PEÑA LOMELÍ

**ASESOR:**



DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

**ASESOR:**



DRA. MARGARITA GISELA PEÑA ORTEGA

Chapingo, Estado de México. Febrero de 2014

## DATOS BIOGRÁFICOS

Karen Carstensen Benavides nació el 16 de enero de 1988 en la Delegación Cuauhtémoc, Distrito Federal. Realizó sus estudios de Licenciatura en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la generación 2006-2010, obteniendo el título de Químico Agrícola. Realizó sus estudios de maestría en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, en el Programa de Biotecnología Agrícola (2012-2013). Obtuvo el título de Maestra en Ciencias en Biotecnología Agrícola con la tesis titulada “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CRIOPRESERVACIÓN DE TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)”.

## **AGRDECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma Chapingo por la oportunidad y el apoyo que me brindaron para realizar mis estudios de maestría.

A todos mis maestros del Posgrado en Biotecnología Agrícola por sus invaluable conocimientos y el apoyo brindado para concluir mis estudios.

A mi comité asesor: Dr. Aureliano Peña Lomelí, Dr. José Luis Rodríguez de La O y Dra. Margarita Gisela Peña Ortega, por su confianza y ayuda en la realización de la presente tesis y durante mis estudios.

A los técnicos del laboratorio de Biotecnología Agrícola M.C. María Elisa Alvarado Cano y Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández por su colaboración en la realización de este trabajo.

Al M. C. Natanael Magaña Lira por valiosos aportes para la mejora de la tesis y apoyo en el análisis estadístico.

A la University of Guelph, Plant Agriculture Department, por la oportunidad y el apoyo para realizar mi estancia de investigación en Canadá.

A mis compañeras Dolores, Jazmín, Evelia y Maricela por compartir conmigo tan gratos momentos.

## **DEDICATORIA**

A Dios por permitirme el maravilloso regalo de la vida.

A mis padres Carlos Carstensen Velazquéz y Silvia Benavides Prado por su apoyo incondicional, sabios consejos y tanto amor que me demuestran.

A mi hermano Detlev Carstensen Benavides por su ayuda y constante aliento a seguir adelante.

A mi amor Sergio Navarro por creer en mí, por su apoyo y siempre estar a mi lado. ¡Te amísimo!

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CRIOPRESERVACIÓN DEL TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)

## MOLECULAR CHARACTERIZATION AND CRYOPRESERVATION OF HUSK TOMATO (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)

Karen Carstensen Benavides<sup>1</sup> y Aureliano Peña Lomelí<sup>2</sup>

### RESUMEN

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) es una hortaliza muy importante en la dieta y economía mexicana. Actualmente su caracterización morfológica se basa en la guía publicada por la UPOV-SNICS, pero no se cuenta con caracterizaciones moleculares. Con la finalidad de obtener los perfiles moleculares de las doce variedades de referencia contempladas en dicha guía, se utilizaron 22 iniciadores ISSR para determinar su utilidad en la discriminación de genotipos. Los 22 iniciadores amplificaron 208 bandas con 83 % de polimorfismo y un promedio de ocho bandas por iniciador. Por otro lado, el principal medio de multiplicación y conservación de germoplasma de tomate de cáscara es la semilla. En este contexto, el cultivo de tejidos ha surgido como una alternativa potencial para conservar germoplasma, y en conjunto con la criopreservación es una importante herramienta para la conservación a largo plazo. Con el objetivo de diseñar un protocolo exitoso de criopreservación para la especie, se probó la aclimatación en frío (4 °C) de yemas por cinco y siete días con medios ricos en melatonina, glutatión y ácido ascórbico para determinar los efectos en la recuperación de los explantes después de la criopreservación por sumersión en nitrógeno líquido. La máxima regeneración (0.2667) después de la encapsulación-vitrificación con PVS2 ocurrió en las yemas con cinco días de aclimatación en frío y pretratadas en medios con melatonina (0.1 µM), las cuales presentaron un desarrollo normal. El protocolo establecido provee un método de criopreservación para la conservación de germoplasma de tomate de cáscara.

### ABSTRACT

The husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) is a very important vegetable in the diet and the economics of Mexico. Recently the morphological characterization is described in the guide of the UPOV-SNICS, but there is not a molecular characterization. With the objective of obtaining the fingerprint profiles of the twelve reference varieties of the guide we used 22 ISSR primers to determine their utility for the discrimination of genotypes. The 22 primers amplified 208 bands, with 83 % of polymorphism across the samples, having an average of eight bands per primer. The principal method of multiplication and germplasm conservation is by seed, but it presents a high genetic variation. *In vitro* germplasm storage has been a potential alternative of seed banks, and in conjunction with the cryopreservation is an important tool for long-term storage. With the goal of designing an effective protocol of cryopreservation for the specie we tested five and seven days cold acclimated shoot tips (4 °C) precultured in enriched media with melatonin, glutathione and ascorbic acid to determine the effects on regrowth following cryopreservation in liquid nitrogen. The maximum regrowth (0.2667) following PVS2 vitrification-encapsulation occurred with shoot tips with five days of cold acclimation and pretreatment on melatonin (0.1 µM). Shoot tips showed normal development. This protocol provides an important long-term storage method and makes possible to use cryopreservation for increasing the storage of germplasm of important varieties of Husk tomato.

**Palabras clave adicionales:** *Physalis ixocarpa*, ISSR, multiplicación *in vitro*, conservación largo plazo, melatonina.

**Additional keywords:** *Physalis ixocarpa*, ISSR, *in vitro* multiplication, long-term storage, melatonin.

1. Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo Km. 38.5 Carretera Mexico-Texcoco. Chapingo. México. Email: karenars@icloud.com
2. Profesor-investigador del Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 38.5 Carretera Mexico-Texcoco. Chapingo. México.

## ÍNDICE

|                                                  |     |
|--------------------------------------------------|-----|
| ÍNDICE.....                                      | vii |
| ÍNDICE DE CUADROS.....                           | ix  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                           | xi  |
| I. INTRODUCCIÓN.....                             | 1   |
| II. OBJETIVOS.....                               | 5   |
| 2.1.    Objetivo General.....                    | 5   |
| 2.2.    Objetivos Específicos.....               | 5   |
| 2.3.    Hipótesis.....                           | 6   |
| III. REVISIÓN DE LITERATURA.....                 | 7   |
| 3.1. Generalidades del cultivo .....             | 7   |
| 3.1.1. Origen.....                               | 7   |
| 3.1.2. Importancia económica.....                | 8   |
| 3.1.3. Variabilidad genética.....                | 9   |
| 3.2. Estudio de la diversidad genética.....      | 11  |
| 3.2.1. Marcadores.....                           | 13  |
| 3.2.1.1. Marcadores morfológicos.....            | 14  |
| 3.2.1.2. Marcadores moleculares.....             | 15  |
| 3.2.1.2.1. Marcadores moleculares de DNA.....    | 16  |
| 3.2.1.2.2. Marcadores moleculares tipo ISSR..... | 17  |
| 3.2.2. Antecedentes en <i>Physalis</i> .....     | 19  |
| 3.3. Conservación de recursos.....               | 20  |
| 3.3.1. Conservación <i>in vitro</i> .....        | 21  |
| 3.3.2. Conservación a largo plazo.....           | 22  |
| 3.3.2.1. Criopreservación.....                   | 23  |
| 3.3.2.2. Principios básicos.....                 | 25  |
| 3.3.2.2.1. Selección de germoplasma.....         | 31  |

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 3.3.2.2.2. Técnica de Encapsulación-Vitrificación..... | 35 |
| 3.3.2.3. Perspectivas.....                             | 37 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....                          | 38 |
| 4.1. Ubicación de la fase experimental.....            | 38 |
| 4.2. Pruebas de germinación.....                       | 38 |
| 4.3. Caracterización molecular.....                    | 39 |
| 4.3.1. Extracción y purificación del DNA.....          | 39 |
| 4.3.2. Cuantificación, calidad y pureza del DNA.....   | 41 |
| 4.3.3. Obtención de los patrones de ISSR.....          | 43 |
| 4.4. Criopreservación.....                             | 46 |
| 4.4.1. Pruebas de germinación.....                     | 46 |
| 4.4.2. Medios de multiplicación <i>in vitro</i> .....  | 46 |
| 4.4.3. Encapsulación-vitrificación.....                | 48 |
| 4.4.4. Análisis Estadístico.....                       | 51 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                         | 53 |
| 5.1. Pruebas de germinación.....                       | 53 |
| 5.2. Caracterización molecular.....                    | 55 |
| 5.2.1. Cuantificación, calidad y pureza del DNA.....   | 55 |
| 5.2.2. Prueba de iniciadores.....                      | 56 |
| 5.2.3. Obtención de patrones ISSR.....                 | 58 |
| 5.3. Criopreservación.....                             | 68 |
| 5.3.1. Pruebas de germinación.....                     | 68 |
| 5.3.2. Medios de multiplicación.....                   | 68 |
| 5.3.3. Pruebas de encapsulación-vitrificación.....     | 72 |
| 5.3.4. Análisis estadístico.....                       | 73 |
| VI. CONCLUSIONES.....                                  | 83 |
| VII. LITERATURA CITADA.....                            | 85 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Variedades de referencia para la descripción varietal de tomate de cáscara que corresponde a las estudiadas en el presente trabajo .....              | 11 |
| Cuadro 2. Soluciones y reactivos utilizados para la extracción de DNA.....                                                                                      | 41 |
| Cuadro 3. Soluciones utilizadas para teñir geles de agarosa.....                                                                                                | 43 |
| Cuadro 4. Mezcla de reacción PCR para obtención de los patrones ISSRs.....                                                                                      | 44 |
| Cuadro 5. Programa del termociclador para amplificación de ISSRs.....                                                                                           | 45 |
| Cuadro 6. Tratamientos suplementados con thiadiazuron (TDZ).....                                                                                                | 47 |
| Cuadro 7. Tratamientos para la criopreservación con antioxidantes.....                                                                                          | 50 |
| Cuadro 8. Secuencia (5'-3') y temperatura de alineamiento de iniciadores ISSR utilizados para la obtención de huellas genómicas de tomate de cáscara .....      | 58 |
| Cuadro 9. Productos de amplificación obtenidos con 22 iniciadores ISSR en doce variedades de referencia de la guía UPOV-SNICS de <i>Physalis ixocarpa</i> ..... | 60 |
| Cuadro 10. Perfiles moleculares de las doce variedades de referencia de <i>Physalis ixocarpa</i> Brot, ex Horm.....                                             | 62 |

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 11. Comparación de proporciones binomiales para proporción de plantas recuperadas.....                             | 75 |
| Cuadro 12. Cuadrados medios del análisis de varianza para la variable proporción de plantas recuperadas transformada..... | 76 |
| Cuadro 13. Pruebas de comparación de medias para los factores estudiados....                                              | 79 |
| Cuadro 14. Pruebas de comparación de medias para las concentraciones de antioxidantes.....                                | 81 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Gráfica del porcentaje de germinación de las doce variedades de referencia de <i>Physalis ixocarpa</i> germinadas <i>in vitro</i> , a los siete y catorce días..... | 54 |
| Figura 2. Gel de calidad de las doce variedades de referencia de <i>Physalis ixocarpa</i> .....                                                                               | 56 |
| Figura 3. Prueba de 60 iniciadores en <i>Physalis ixocarpa</i> en geles de agarosa.....                                                                                       | 57 |
| Figura 4. Respuestas de los diferentes explantes en los medios suplementados con TDZ.....                                                                                     | 69 |
| Figura 5. Tratamientos de multiplicación de plantas con medios suplementados con BA.....                                                                                      | 71 |
| Figura 6. Respuestas a las pruebas de criopreservación.....                                                                                                                   | 73 |

## I. INTRODUCCIÓN

El miltomate, tomatillo, tomate verde, tomate de fresadilla, tomate de cáscara o simplemente tomate (*Physalis ixocarpa* Brot ex. Horm.) es una especie botánica originaria de México, perteneciente a la familia de las solanáceas. Se conoce en México desde tiempos precolombinos y era cultivado por los Aztecas y Mayas. En México se ha incrementado la superficie destinada a este cultivo en los últimos 15 años, por lo que las compañías productoras de semillas y las universidades se han enfocado al desarrollo de nuevas variedades con las características que requieren los diferentes mercados.

El tomate de cáscara es una especie alógama obligada por presentar autoincompatibilidad gametofítica, característica que dificulta su mejoramiento por métodos tradicionales. México es su centro de origen y aún se encuentra una gran diversidad genética, principalmente en cuanto a hábito de crecimiento, color, tamaño, forma y firmeza del fruto, precocidad y rendimiento (Peña y Márquez, 1990; Santiaguillo *et al.*, 2010).

Investigaciones realizadas con base en caracteres morfológicos y evolutivos, han agrupado las diversas poblaciones de tomate de cáscara *Physalis ixocarpa* Brot ex. Horm. en ocho razas: Milpero Silvestre, Milpero Cultivado, Arandas, Tamazula, Manzano, Rendidora, Salamanca y Puebla, proponiendo este orden de acuerdo al grado evolutivo presentado (Peña *et al.*, 1998).

El Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) es un órgano desconcentrado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, encargado de normar y vigilar el cumplimiento de las disposiciones legales en materia de semillas y variedades vegetales. En el SNICS se encuentran registradas once variedades de tomate de cáscara: CHF1-Chapingo, Diamante, Manzano Tepetliltla, Milpero Tetela, Potrero, Puebla SM3, Rendidora, Salamanca, Tamazula SM3, Tecozautla 04 y Yema de Huevo (SNICS, 2012), las cuales están descritas morfológicamente con base en la guía para la descripción varietal de tomate de cáscara de la Unión para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). La guía tiene como referencia las once variedades registradas en el SNICS y consta de 49 características concentradas en 11 grupos: Plántula, Planta, Tallo, Hoja, Pecíolo, Flor, Fruto, Cáliz, Pendúnculo, Semilla, Floración, Cosecha y Poscosecha (Peña *et al.*, 2011).

Las variedades vegetales, nativas o mejoradas, son el resultado del trabajo de los productores que las usan y conservan y de la investigación agrícola, que requiere grandes cantidades de recursos su conservación, protección y mejoramiento. Por ello, es necesario proteger el germoplasma mediante el registro y control de variedades a favor de quien logra una nueva variedad. Con este propósito, la UPOV cuenta con guías para la descripción varietal en la mayoría de especies cultivadas a gran escala en el mundo. En particular, la guía para la descripción de variedades de tomate de cáscara se basa en características morfológicas; aspecto sin duda importante pero que

adolece criterios más precisos que permitan la identificación enequivoca de variedades con fines de protección, ya sean estas nativas o producto del mejoramiento genético. Por lo anterior, se han buscado diferentes alternativas para describir las variedades de forma precisa, aspecto donde el uso de marcadores moleculares tiene ventajas y está en pleno desarrollo.

Por otro lado, si bien la conservación de semillas ortodoxas en bancos de germoplasma ha permitido resguardar la diversidad genética de las especies cultivadas como el tomate de cáscara (Santiaguillo *et al.*, 2012 y se han obtenido y registrado variedades mediante los métodos clásicos de mejoramiento, se ha reportado que mediante el uso de las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es factible el mejoramiento genético del tomate de cáscara, lo que contribuye a superar los problemas que limitan el mejoramiento del cultivo (Peña y Márquez, 1990; Peña *et al.*, 2008; Peña *et al.*, 2011). En este contexto, la micropropagación de cultivares y la criopreservación de germoplasma es una buena alternativa para el apoyo en el mejoramiento genético (Robert y Loyola, 1985), siempre y cuando se cuente con una metodología de manejo *in vitro* que asegure su buen desarrollo y multiplicación.

La criopreservación es la conservación de especies vegetales como complemento a las colecciones y bancos de germoplasma clásicos. Es un proceso que consiste en la preparación, mantenimiento y preservación a largo plazo del material vegetal en condiciones de temperatura ultrabajas (-196 °C). Es un método rápido, sencillo, no altera la estabilidad genética y reduce

sustancialmente el esfuerzo y los costos que representa el mantenimiento de colecciones de germoplasma vegetal *in vivo*.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se evaluaron 60 iniciadores ISSR para determinar aquellos de mayor utilidad en la discriminación de genotipos y que permitieran obtener los perfiles moleculares de las doce variedades de referencia contempladas en la guía UPOV para la descripción varietal de tomate de cáscara. Por otro lado, con el objetivo de diseñar un protocolo de criopreservación para la especie, se probó la aclimatación en frío (4 °C) de yemas por cinco y siete días con medios ricos en melatonina, glutatión y ácido ascórbico, para determinar los efectos en la recuperación de los explantes después de la criopreservación con sumersión en nitrógeno líquido. Los objetivos e hipótesis se describen a continuación.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Caracterizar las variedades de referencia de la Guía UPOV-SNICS de tomate de cáscara, a partir de marcadores moleculares de DNA tipo ISSR y establecer un protocolo de multiplicación *in vitro* y su criopreservación.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1. Identificar los iniciadores ISSRs que muestren más bandas polimórficas en tomate de cáscara.
2. Obtener los perfiles moleculares de ISSRs de las variedades de referencia de la guía para la descripción varietal de tomate de cáscara.
3. Diseñar un protocolo de criopreservación y recuperación de plantas.

### **2.3. Hipótesis**

La caracterización de las variedades de referencia del tomate de cáscara mediante marcadores moleculares (ISSRs) permitirá la diferenciación de los cultivares de esta especie y servirá como complemento de la caracterización morfológica.

Es posible diseñar un protocolo de criopreservación para la conservación de germoplasma de tomate de cáscara *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm. a largo plazo.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Generalidades del cultivo

##### 3.1.1. Origen

El miltomate, tomatillo, tomate verde, tomate de fresadilla, tomate de cáscara o simplemente tomate (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) es una especie botánica originaria de México, perteneciente a la familia de las solanáceas.

La especie es originaria de Mesoamérica, de donde su nombre original en náhuatl es "tomātl" que significa "agua gorda" y pasó al español como "tomate". También es conocido como tomate de cáscara y que el hombre la ha venido manejando desde tiempos precolombinos. Diversos hallazgos arqueológicos prueban que su uso en la alimentación y de forma medicinal en la población mexicana se remonta a tiempos precolombinos (Saray y Loya, 1977).

Se han encontrado vestigios de la utilización de *Physalis* como alimento en las excavaciones del valle de Tehuacán (900 a.C - 1540 D.C.). En tiempos prehispánicos, en México era mucho más apreciado que el jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.); sin embargo, esta preferencia no se ha mantenido, excepto en el medio rural, donde, además de la persistencia de

hábitos alimenticios antiguos, aún es estimada la mayor resistencia del tomate a la putrefacción (FAO, 1992).

### **3.1.2. Importancia económica**

El tomate de cascará es una especie hortícola de importancia en México por su amplio consumo en la alimentación de la población, con amplias perspectivas de mejorar dicha importancia al incrementarse el rendimiento y el consumo per cápita, lo que por consecuencia aumentaría los ingresos económicos al mejorarse la productividad, industrialización y exportación.

En la actualidad, el tomate de cáscara se ubica entre las principales cinco especies hortícolas cultivadas en México, solamente superada por el chile *Capsicum annun* L., la papa *Solanum tuberosum* L., el jitomate *Lycopersicon esculentum* Mill. y la cebolla *Allium cepa* L. La superficie nacional dedicada a este cultivo es de 43,505 ha con un rendimiento promedio aproximado de 14 ton.ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2012), aunque diversas investigaciones reportan un potencial productivo de hasta 40 ton.ha<sup>-1</sup> (Santiaguillo *et al.*, 1998).

Desde varios puntos de vista, el cultivo del tomate verde es de extraordinario interés nacional. Forma parte de los cuatro productos básicos en la alimentación del mexicano junto con el maíz *Zea mays* L., frijol *Phaseolus*

*vulgaris* L. y chile *Capsicum annun* L. Su importancia económica va en auge dado que su cultivo se ha extendido a otros países con fines alimenticios y/o comerciales. Asimismo, en la medicina tradicional desde épocas remotas se ha usado para la cura de diversas enfermedades (Villatoro, 1996).

### **3.1.3. Variabilidad genética**

El género *Physalis* incluye más de ochenta especies entre hierbas perennes y anuales, varias comestibles y cultivadas, muchas silvestres y poco conocidas. Por ser considerado centro de origen, distribución y domesticación; México es poseedor de una amplia diversidad genética de tomate de cáscara, misma que ha sido agrupada en ocho razas: Silvestre, Milpero, Arandas, Tamazula, Manzano, Rendidora, Salamanca y Puebla (Pérez *et al.*, 1992), distribuidas prácticamente en todo el país en altitudes que van desde los 8 hasta los 3 350 msnm (López *et al.*, 1994; Santiaguillo *et al.*, 2010). Las razas más importantes por la magnitud de su uso comercial son Rendidora, Puebla, Tamazula y Salamanca, siendo la última la única en que no existen variedades mejoradas (Saray *et al.*, 1978; Peña y Márquez, 1990, Peña *et al.*, 2011).

Parte de esta diversidad se atribuye a que la especie presenta autoincompatibilidad gametofítica, determinada por dos *loci* con alelos múltiples (Pandey, 1957), lo que ocasiona que sea alógama obligada y presente poblaciones heterogéneas y heterocigótica; las cuales tienen dificultad en su

clasificación debido a esta heterogeneidad, así como a la presencia de poblaciones intermedias y con diferente estado evolutivo (silvestres, toleradas, fomentadas, cultivadas y domesticadas). Esta diversidad, aunque de manera limitada, se ha aprovechado en los programas de mejoramiento genético de la especie, existiendo a la fecha once variedades registradas: CHF1-Chapingo, Diamante, Manzano Tepetliltla, Puebla SM3, Rendidora Precoz, Tamazula SM3, Tecozautla 04, Salamanca, Milpero Tetela, Potrero y Yema de Huevo, de las cuales las siete primeras son producto del programa de mejoramiento genético llevado a cabo en la Universidad Autónoma Chapingo (Peña, 1998; Peña *et al.*, 2011; SNICS, 2012).

La utilización plena del potencial genético de cualquier cultivo depende de la disponibilidad de una base genética amplia para poder aplicar procesos de mejoramiento. Así mismo, se relaciona con la existencia de colecciones representativas de la diversidad, tanto de la especie objetivo como de los *taxa* relacionados, así como de un buen conocimiento de los atributos presentes en los materiales de las colecciones (Lobo, 2006). En el mejoramiento genético del tomate de cáscara se hace necesaria la utilización de forma rápida y continua de semilla, tanto para el establecimiento de lotes de evaluación como de selección. Se requiere también contar con variedades de referencia que representen la diversidad genética de la especie, que para el caso son doce (Cuadro 1), once de las cuales están registradas (Peña *et al.*, 2011; SNICS, 2012)

Cuadro 1. Variedades de referencia para la descripción varietal de tomate de cáscara que corresponde a las estudiadas en el presente trabajo.

| <b>Raza</b>                  | <b>Variedad</b>    |
|------------------------------|--------------------|
| Milpero                      | Milpero Tetela     |
| Manzano                      | Manzano Tepetlixpa |
|                              | Yema de Huevo      |
| Tamazula                     | Tamazula SM3       |
| Salamanca                    | Salamanca          |
|                              | Potrero            |
| Arandas                      | Morado R           |
| Puebla                       | Puebla SM3         |
|                              | Tecoautla 04       |
| Rendidora                    | Rendidora          |
|                              | CHF1 Chapingo      |
| Hibrido (Rendidora x Puebla) | Diamante           |

### 3.2. Estudio de la diversidad genética

La variabilidad genética o diversidad genética en sentido amplio es el componente básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas

variaciones. Su conocimiento y comprensión es de vital importancia tanto para la conservación y el avance de la genética evolutiva, como para la salud pública, la sustentabilidad y la productividad agrícola, pecuaria, pesquera y forestal, la domesticación y la biomedicina (Piñero *et al.*, 2008).

La diversidad genética que se presenta en las poblaciones naturales permite entender cómo es que las especies se adaptan y evolucionan. Por lo tanto, la pérdida de esta variación puede reducir la capacidad de una población a adaptarse a los cambios de su ambiente. Entre los principales factores de la variabilidad genética está la distribución geográfica, los sistemas de reproducción, las formas de vida y las características de dispersión del polen y de las semillas; todos ellos influyen fuertemente en la estructura genética de las poblaciones naturales (Santos, 2006).

Este conocimiento puede ser utilizado en varias vertientes: a] evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante los cambios ambientales naturales o provocados por las actividades humanas conscientes o inconscientes; b] evaluar los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos que disminuyen nuestra capacidad de sobrevivencia como sociedad y como especie; c] conocer la riqueza genética de la nación y su distribución geográfica; d] planear las estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones, especies y recursos genéticos; e] entender la

forma, la velocidad y las causas de la pérdida de la diversidad genética; f] evaluar los riesgos de introducción de enfermedades, plagas, especies invasoras, variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre las poblaciones, especies nativas y recursos genéticos de plantas, animales y humanos.

### **3.2.1. Marcadores**

Para Valadez y Kahl (2000) un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, RNA o DNA de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente.

La importancia de los marcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquéllos que presentan rasgos de interés para el hombre. En ocasiones, el uso de marcadores permite seleccionar los individuos aun antes de que expresen el rasgo de interés. Gracias al empleo de marcadores ha sido posible mejorar muchas especies que son la base de la alimentación del mundo. Hay dos tipos principales de marcadores: los marcadores morfológicos y los marcadores moleculares. Algunos de los métodos para evaluar la variación genética se basan en la observación de las características morfológicas, o bien, en los cambios en

proteínas con actividades enzimáticas específicas (isoenzimas), entre otros (Santos *et al.*, 2006).

#### **3.2.1.1. Marcadores morfológicos**

Los marcadores morfológicos fueron el iniciador tipo que el hombre utilizó desde la domesticación de las plantas y animales. Se consideran marcadores morfológicos a los caracteres de un individuo que se expresan en un ambiente específico y que el hombre identifica con un objetivo determinado. Este tipo de marcadores son muy utilizados para estimar la variación morfológica existente en una población. Sin embargo, hay varias limitaciones para su uso, de las que la principal es precisamente que se basan en las características morfológicas expresadas en el individuo (fenotipo), las cuales son fuertemente influidas por el ambiente en que se desarrollan, además de que generalmente sólo se pueden identificar y medir en individuos completos o adultos (Solís, 2005).

En el caso de tomate de cáscara se cuenta con una guía de marcadores morfológicos llamada “Manual Gráfico para la Descripción Varietal de Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot ex. Horm.)”. La guía para la descripción varietal de tomate de cáscara tiene 49 características, concentradas en 11 grupos: plántula, planta, tallo, hoja, peciolo, flor, fruto, cáliz, pedúnculo, semilla, floración, cosecha y poscosecha. La guía de la UPOV, publicada en forma de manual gráfico, tiene el propósito de facilitar su correcta aplicación en la

descripción y registro de variedades de tomate de cáscara, ya sea en México o en otros países. Se espera que contribuya a motivar el registro de más variedades de *Physalis ixocarpa* Brot ex. Horm. (Peña *et al.*, 2011).

### **3.2.1.2 Marcadores moleculares**

Desde la prehistoria, el hombre ha seleccionado y mejorado especies vegetales, animales y microbianas basándose en el fenotipo. Las mejoras genéticas eran posibles gracias a la variabilidad genética, a la heredabilidad del carácter que se quería mejorar, a la eficacia e intensidad de la selección aplicada, y al tiempo necesario para realizar un ciclo de selección. Sin embargo, quedan muchos aspectos desconocidos, como son el número y efecto de los genes implicados en la expresión de un carácter, la localización de estos genes, y su función fisiológica. La aparición de los marcadores moleculares está ayudando a eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa (Nonnatus, 2001).

Un marcador molecular es cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético, por lo que es un locus marcado que tiene que ser polimórfico. Como marcador puede utilizarse con una doble finalidad, para marcar o señalar el locus que controla la diferencia fenotípica o para marcar otro locus próximo que controle algún carácter de

interés (Nuez *et al.*, 2000). Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores idóneos son los de DNA, donde es válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (SIDTA, 1999). Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas y el DNA. Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético forman un QTL (*loci* de carácter cuantitativos o cuantificables) (Sun y Wong, 2001).

#### **3.2.1.2.1 Marcadores moleculares de DNA**

Los marcadores del DNA se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias entre individuos en pequeñas secuencias del DNA. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples (Simpson, 1997).

La Reacción de Polimerización en Cadena (PCR, por sus siglas en inglés) es una de las técnicas esenciales para la preparación de huellas genómicas, si bien no vale para elaborar marcadores por sí sola. La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del DNA original para

separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con su DNA molde, y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo DNA entre los dos oligonucleótidos. De aquí se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo (Nonnatus, 2001).

### **3.2.2.2 Marcadores moleculares tipo ISSR**

Es un marcador molecular conocido como Inter Secuencias Simples Repetidas (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR). Los ISSRs son un tipo de marcador genético que permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de segmentos simples como (CT) $n$  ó (CA) $n$ , ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Esta es una técnica relativamente nueva y es similar a los RAPDs, excepto que en los ISSRs el iniciador es un di ó trinucleotido repetido (Culley y Wolfe, 2001).

Las bandas que se obtienen con esta técnica van de 100 a 2000 pb. La variación alélica en los ISSRs consiste de la presencia o ausencia de los productos amplificados. Comparada con los iniciadores de los RAPDs, las secuencias de los ISSRs son usualmente largas, lo que resulta en una mayor reproducibilidad de las bandas.

Los ISSRs han sido utilizados en especies cultivadas desde 1994, pero sólo recientemente se han empleado en estudios de la variación poblacional en especies silvestres (Wolfe y Liston, 1998; Wolfe *et al.* 1998). Esta técnica ha sido efectiva en especies donde la variación poblacional con enzimas es pequeña o no existe.

Una de las ventajas principales de los ISSRs es que producen un gran número de bandas polimórficas. Además, es una técnica relativamente fácil de montar, altamente repetible y ya existen iniciadores universales para plantas. Por otro lado, las limitaciones de los ISSRs son: que las bandas son leídas como marcadores dominantes, cuando tenemos la presencia de la banda no se sabe si el individuo es homocigote dominante o heterocigote, que la estimación de la diversidad genética está basada considerando que cada banda representa un locus con dos alelos y que el alelo dominante está en equilibrio de Hardy-Weinberg con el alelo recesivo.

### **3.2.2 Antecedentes en *Physalis***

Wei *et al.* (2012) estudiaron 38 accesiones de seis especies de *Physalis* utilizando 97 marcadores (COS, SSR y PIP) de jitomate y 25 marcadores ISSR de *P. peruviana* para probar la similitud entre especies y su capacidad de

amplificación. Los resultados indicaron un 73 % de similitud entre *Physalis* y *Solanum lycopersicum* por lo que los marcadores desarrollados en jitomate se pueden utilizar en el estudio genético de *Physalis*.

Ye *et al.* (2005) encontraron que marcadores RAPDs se podrían utilizar con éxito junto con iniciadores ISSRs para la detección genómica de nuevos *loci*, lo que representa una manera nueva para el mapeo genómico, toma de huellas genómicas y la marcación de genes.

Simbaqueba *et al.* (2011) identificaron 932 repeticiones imperfectas y 201 repeticiones perfectas de secuencia simple (SSR) en las regiones no traducidas (UTR), y 304 imperfectas y 83 perfectas de SSR en regiones codificantes del ensamble de *Physalis peruviana* en transcriptoma de hoja. Los *loci* UTR SSR se utilizaron para el desarrollo de 162 iniciadores para la amplificación, obteniendo así el juego de iniciadores específicos para microsatélites en *P. peruviana*.

Vargas *et al.* (2010) probaron seis iniciadores ISSR: (GA)<sub>8</sub> YG, (CA)<sub>6</sub> RY, (CA)<sub>6</sub> RG, RY(GACA)<sub>3</sub>, (CT)<sub>8</sub> RG y (CT)<sub>8</sub> RC) en ocho especies mexicanas de *Physalis* para determinar su utilidad en la discriminación taxonómica interespecífica y evaluar su potencial para inferir las relaciones interespecíficas. Los seis iniciadores ISSR amplificaron 101 bandas, con un 100 % de polimorfismo través de las muestras. El número de bandas por iniciador varió de 10 a 21, con un promedio de 16.8 bandas por iniciador.

### 3.3. Conservación de recursos

Una alternativa a los mecanismos de conservación *in situ* son los sistemas de conservación *ex situ*, con el objetivo de resguardar el material genético de las especies de importancia para el mejoramiento genético y para el sector productivo, lo que permite además la conservación de especies vulnerables a procesos de erosión genética. La conservación *ex situ* se refiere al mantenimiento de los organismos fuera de su hábitat natural, conservando especies amenazadas y recursos genéticos en bancos de semillas, bancos genéticos *in vitro*, bancos de genes, colecciones de campo y jardines botánicos (Medina, 2008).

Existen variadas estrategias de conservación de recursos fitogenéticos, las cuales dependerán del tipo de germoplasma y de los objetivos de la misma. La conservación no se limita a la consecución y posesión física de los materiales, sino que requiere asegurar la existencia de éstos en el tiempo en condiciones viables y con sus características genéticas originales (Jaramillo y Baena, 2000). Una parte esencial en sistemas de conservación de germoplasma *ex situ*, como los bancos de semillas o de almacenamiento a largo plazo, es la ejecución de pruebas cuantitativas de germinación y crecimiento a partir de las cuales se establece la viabilidad y longevidad de una muestra de semillas, con lo que se obtiene el conocimiento con respecto a la capacidad de sobrevivencia de las mismas.

Existe una infraestructura mínima adecuada para la conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos; es decir, los bancos de semilla, y en algunos casos la infraestructura para la conservación de colecciones *in vitro*. El problema común es la falta de recursos para desarrollar actividades propias de mantenimiento de las colecciones, situación que conduce a que los bancos de germoplasma sean solamente depósitos de semillas (Seguel, 2001).

### **3.3.1. Conservación *in vitro***

La conservación *in vitro* es el cultivo de tejidos vegetales, la cual se basa en la totipotencialidad celular para la obtención de plantas completas. Con estas metodologías se controlan relativamente los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos de los tejidos. El mantenimiento de células, tejidos u órganos ocurre asépticamente y el explante desarrollará las distintas partes de la planta hasta obtener un individuo completo. Cada cierto tiempo hay que tomar un nuevo explante y repetir el proceso, lo que genera una técnica que requiere trabajo continuo, además de ser un método caro que debe optimizarse para cada especie (Santos *et al.*, 2006). Siempre se debe tener en cuenta el ciclo morfogénico, la especie a conservar, la parte de la planta a utilizar, el estado vegetativo y el tiempo que el material vegetal tiene que permanecer conservado.

Un factor no deseable en la conservación *in vitro* de germoplasma es la variación somaclonal, que puede ser atribuida a diversos factores como los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento, el tipo de explante y el número de subcultivos. Por ésto, es importante manejar los factores que inducen variación somaclonal y evaluar posibles alteraciones, utilizando análisis citológicos o moleculares en los materiales conservados *in vitro* (Seguel, 2001).

### **3.3.2. Conservación a largo plazo**

La conservación de germoplasma comienza a ser una herramienta de gran utilidad para el aprovechamiento de los recursos fitogenéticos. Las técnicas basadas en el cultivo *in vitro* se están haciendo imprescindibles para la conservación *ex situ*. Estas técnicas están basadas en la disminución de la temperatura para retardar el proceso de deterior, permitiendo un estado de suspensión animada por periodos largos de tiempo. El paso más crítico para lograr un protocolo viable es reducir el contenido de humedad del material a conservar, evitando así la formación de cristales de hielo (Toribio *et al.*, 2000).

Como metodologías de conservación *in vitro* a largo plazo existe la de congelamiento a ultrabajas temperaturas, que ha demostrado ser muy eficiente para detener los procesos metabólicos de los organismos y se lo conoce como criopreservación o sistema criogénico de almacenamiento (Day y McLellan, 1995).

### **3.3.2.1. Criopreservación**

Durante el último medio siglo los científicos han desarrollado y probado una serie de técnicas de criopreservación para la conservación de las células y los tejidos de las plantas, pero el almacenamiento de germoplasma vegetal, a excepción de la conservación las semillas en nitrógeno líquido (LN), es una práctica relativamente nueva (Engelmann, 2004). El enfriamiento con velocidad controlada, la vitrificación, deshidratación-encapsulación, la preservación de las yemas dormantes y combinaciones de estas técnicas, son ahora directamente aplicables para genotipos de plantas de cientos de especies. Un número creciente de laboratorios son la base de estas técnicas para la conservación alternativa de recursos genéticos.

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionamiento celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares, ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío lo prolonga puesto que retarda estas reacciones. Sin embargo, éste no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas, las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada

interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (Ávila, 2006).

El método de criopreservación consiste en llevar material biológico desde su temperatura fisiológicamente normal hasta ultrabajas temperaturas (generalmente en NL a  $-196^{\circ}\text{C}$ ). A esta temperatura la división celular y los procesos metabólicos cesan, por lo que el material puede estar almacenado por tiempo indefinido sin que sufra modificaciones o alteraciones. Sin embargo, el éxito del proceso dependerá del acondicionamiento que se le dé al material para que resista tanto el congelamiento como el descongelamiento. El acondicionamiento consiste en provocar una deshidratación protectora en las células y tejidos, de manera que se evite o disminuya la formación de cristales de hielo, que provoca grandes daños en las membranas de las células (Villalobos y Engelman, 1995).

La criopreservación es un valioso método para conservar plantas propagadas por clonación o como un sistema seguro para el mantenimiento del potencial embriogénico o metabólico de cultivos importantes económica, alimenticia o farmacéuticamente (Reed, 2007).

El almacenamiento en nitrógeno líquido es utilizado para conservar diferentes materiales con características específicas, como puede ser:

suspensión de células, protoplastos, callos, polen, embriones, ápices (Engelmann, 1991).

La criopreservación es considerada un método alternativo para la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos. Los resultados obtenidos en este campo han demostrado su disponibilidad y aplicación a muchas otras especies (Niino *et al.*, 1998). Esta técnica es práctica y requiere de espacios pequeños, donde el material almacenado queda protegido de la contaminación y las necesidades de mantenimiento son muy pocas, por lo que representa una opción de conservación a largo plazo y costos bajos (Rao, 2004).

#### **3.3.2.2. Principios básicos**

El método de congelación, la deshidratación, la vitrificación y la utilización de sustancias crioprotectoras, son los recursos existentes para reducir al máximo los daños que se producen en la célula durante el proceso de congelación. El hielo causa por sí mismo daños celulares, que se agravan debido a que se produce el fenómeno de recristalización, que consiste en que los cristales de hielo se forman en el interior de la célula y durante el proceso de congelación se derriten y vuelven a formarse, dando lugar a estructuras termodinámicamente más estables, es decir, cristales más grandes con un

efecto sumamente dañino, que provoca una extensa destrucción de estructuras protoplasmáticas y la lisis celular (Westendorp y Encina, 2004).

El agua se congela a 0 °C y existe en ella un núcleo para la cristalización (partículas de polvo, macromoléculas o la misma pared del contenedor) conocido por los criobiólogos como núcleo heterogéneo (Meryman y Williams, 1985). En ausencia de este núcleo, el agua puede ser enfriada a -40 °C, temperatura que es conocida como temperatura de nucleación homogénea de hielo, que se refiere al proceso en que, por debajo de los -40 °C, todo el agua existente en el tejido se convierte en hielo. A temperaturas inferiores a -40 °C ocurren agrupaciones de moléculas de agua, formando cristales de hielo que se expanden por todo el material biológico. Cuando el agua se convierte en hielo (nucleación) se presentan eventos exotérmicos (desprendimiento de calor en forma desordenada) los cuales liberan energía como calor latente de fusión (Meryman y Williams, 1985).

En el sistema de congelación lenta, el hielo comienza a formarse desde el exterior hacia el interior de la célula. El agua sale hacia el exterior del citoplasma y la vacuola, provocando una diferencia de potencial osmótico que causa un aumento de concentración del soluto en el interior celular, lo que va en detrimento de la posibilidad de supervivencia de la célula. En el caso del sistema de congelación rápida ocurre lo contrario: se forma hielo desde el

interior celular al exterior, el agua entra y la diferencia de potencial osmótico provocada es menor que en el método lento, por lo que los daños celulares debido a una alta concentración de solutos no son tan críticos (Westendorp y Encina, 2004).

Cuando la temperatura no es tan baja como para que se forme hielo en el tejido tiene lugar el llamado daño por enfriamiento, relacionado con el hecho de que los fluidos celulares de la plantas pueden mantenerse en estado líquido a temperaturas inferiores al punto de congelación, fenómeno conocido como sobre enfriamiento. Los daños por enfriamiento incluyen lesiones generalizadas en las membranas celulares, producidas porque los lípidos que las componen sufren una transición de fase y pasan del estado de líquido cristalino, que es el fisiológico, al de sólido cristalino o gel. Las alteraciones en las membranas van acompañadas por considerables cambios en su permeabilidad.

A temperaturas muy bajas, se forma hielo en los líquidos intra o extracelular y se produce el llamado daño por congelamiento. La formación de hielo intracelular es casi siempre letal, presumiblemente porque los cristales de hielo lesionan las membranas internas de las células; el fenómeno, sin embargo, es poco frecuente, ya que requiere descensos bruscos de la temperatura, que pocas veces acontecen en la naturaleza.

Generalmente, la aparición de hielo ocurre en las soluciones acuosas del espacio extracelular, en las cuales el hielo formado no incluye las sales, que permanecen en el agua no congelada, con el consiguiente aumento de su concentración en ella; esto último provoca la transferencia, por ósmosis, de agua desde las células al medio extracelular y la consecuente deshidratación celular, causante de alteraciones metabólicas generalizadas. La velocidad de descongelamiento, si es elevada, contribuye al daño, porque la célula no logra reparar a tiempo las fisuras ocasionadas por el congelamiento (Westendorp y Encina, 2004).

La criopreservación de tejidos biológicos es posible sólo si se evita la formación de los cristales de hielo intracelularmente, si esto no ocurre, causa daños irreversibles a las membranas celulares, dando como resultado una destrucción de su permeabilidad (Panis y Lambarri, 2005). La formación de cristales solo puede evitarse con vitrificación, que se refiere al proceso de transición de una solución acuosa a un estado amorfo, cristalino o viscoso (Panis y Lambardi, 2005). Para que una célula se vitrifique debe reunir dos aspectos: tasas rápidas de congelamiento y una solución celular altamente concentrada. Las tasas altas de congelamiento ( $6\text{ }^{\circ}\text{Cseg}^{-1}$ ) se alcanzan normalmente poniendo los explantes en crioviales y sumergiéndolos rápidamente en nitrógeno líquido, mientras que las tasas de congelamiento ultra rápidas ( $60 - 130\text{ }^{\circ}\text{Cseg}^{-1}$ ) se logra con el protocolo de vitrificación de gota, en donde las muestras son inmersas directamente a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  sobre gotas de

solución crioprotectora colocadas en laminas de papel aluminio (Schafer y Shumacher, 1997).

De acuerdo con Mazur (1984), los períodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del enfriamiento y el período de retorno a condiciones fisiológicas. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16 °C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991). Las bajas temperaturas y la rapidez con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP), la disminución de temperatura desde 25 °C a 10 °C reduce en un 60 % la actividad de las bombas dependientes de ATP y la difusión facilitada o como transporte, en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico (Ávila, 2006).

La difusión es el proceso mediante el cual las moléculas de una sustancia tienden a alcanzar una distribución homogénea en todo el espacio que les es accesible. La ósmosis es el movimiento del agua desde soluciones

con baja concentración hasta soluciones con alta concentración de soluto; y la presión osmótica es la presión hidrostática que se genera a través de una membrana con un gradiente de concentración al lado y lado (Ávila, 2006). La lesión celular crio-inducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación, Meryman (1985) propone la hipótesis del volumen celular mínimo, que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce la relación a el aumento de la osmolaridad extracelular; a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad, en este caso los crioprotectores actuarían reduciendo la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada (Ávila, 2006).

Aunque los métodos de congelación son variados, curiosamente casi todos los autores coinciden en que el proceso de descongelación debe realizarse de forma rápida para evitar la recristalización, siendo el método más habitual la inmediata introducción del material congelado en agua caliente a 40 °C (Westendorp y Encina, 2004).

#### **3.3.2.2.1. Selección de germoplasma.**

La adquisición del germoplasma es de suma importancia para poder almacenarlo a largo plazo. Esta técnica es aplicable a semillas frescas o partes vegetativas (ápices y yemas), tomando en cuenta su previo manejo *in vitro* (Benson, 1999). Se deberán tomar en cuenta factores como la estructura genética de la población y el germoplasma disponible. Se pueden almacenar ápices, meristemas, semillas, embriones cigóticos y somáticos, pólen y células (Seguel, 2001). El material debe ser seleccionado de plantas sanas y, en el caso de proceder de material de cultivo *in vitro*, los parámetros de cultivo se deben optimizar antes de la criopreservación, ya que el éxito de este proceso va a depender tanto de los tratamientos utilizados antes de someter al material al nitrógeno líquido como de los utilizados una vez recuperado el material. Por lo tanto, es de suma importancia poner especial atención en la composición de los medios de cultivo donde se incuba el material vegetal antes y después de introducirlo en nitrógeno líquido para su conservación (Sakai *et al.*, 1993).

Etapas fisiológicas. Las células vegetales con crecimiento exponencial son más tolerantes al congelamiento que aquellas obtenidas durante la etapa de detención del crecimiento, debido a las características que presentan, como son: células pequeñas, contienen pocas y pequeñas vacuolas, por lo que

contienen menor cantidad de agua, adquiriendo un citoplasma denso y en el que existe un alto balance entre núcleo y citoplasma (Withers, 1985).

Origen del material vegetal. Se prefiere el material proveniente de cultivo *in vitro*, debido a que los explantes están en tamaño pequeño y libres de contaminación (Engelmann, 1991).

Periodo de cultivo *in vitro*. La permanencia de los tejidos bajo cultivo *in vitro* por periodos prolongados antes de la criopreservación reduce significativamente la sobrevivencia al congelamiento, por ejemplo en ápices de papa (Harding, 1991).

Pretratamiento. El pretratamiento corresponde a someter a un cultivo por un tiempo a condiciones que lo preparen antes de los procesos de congelamiento (Engelmann, 1991). Se pueden utilizar pretratamientos en frío, uso de antioxidantes u otros crioprotectores en los medios de cultivo, condiciones de luz/obscuridad o inclusive inoculación de algunas cepas. Este se aplica al explante como crioprotección, ya que por sí sólo el material biológico no es capaz de soportar la criopreservación y generalmente la sobrevivencia aumenta cuando se usan varias estrategias combinadas (Benson, 1999).

Para la crioprotección se recurre a agentes químicos como son los crioprotectores, sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (punto en el cual una composición solidifica como un elemento puro). El descenso del punto eutéctico implica que

se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que será sometido es menor (Ávila, 2006). Los crioprotectores se dividen de acuerdo a su permeabilidad en la célula en: **a) Penetrantes**, son de bajos pesos moleculares y permeables a través de la membrana celular. Son utilizados el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanodiol (PROH). El dimetil sulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock (1959), el DMSO se ha usado como un crioprotector. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana; su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos (Ávila, 2006). **b) No-penetrantes**, son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son sacarosa, glucosa y dextrosa, generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se reduciría por su concentración molar (Ávila, 2006).

La adición del criopreservante *per se* genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACP (agentes crioprotectores) y después se hidrata. La definición de los parámetros biofísicos de cada célula y el estudio de la interacción con los ACP durante la congelación y descongelación de las células deben ser definidos para establecer los límites físicos que aseguren la supervivencia de la célula (Ávila, 2006). Para incrementar los efectos de la utilización de los crioprotectores, el material vegetal puede precultivarse en un medio que contenga altas concentraciones de azúcares que reducirán el contenido hídrico de la célula, disminuyendo así la formación de hielo intracelular. El trabajo preliminar para la conservación en cada especie es determinar su tolerancia a la deshidratación y ajustar los protocolos de congelación para obtener una elevada supervivencia y viabilidad del material criopreservado, con el propósito de poder manejar los bancos de germoplasma (Benson, 1999).

Se pueden identificar dos grandes grupos de procedimientos utilizados para la criopreservación. Los métodos clásicos, que consisten en el pretratamiento del material con sustancias crioprotectoras como el dimetil sulfóxido (DMSO), el glicerol, la sacarosa y el polietilenglicol, así como mezclas de ellas durante unos minutos, horas o días para lograr la deshidratación lenta de las células. El pretratamiento es seguido por un congelamiento controlado que se lleva a cabo lentamente ( $0.3$  a  $2\text{ }^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ ) hasta  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , luego se

almacenan las muestras en NL (Abdelnour, 1999). Los métodos modernos evitan la formación de hielo durante los procesos de criopreservación, los cuales se basan en vitrificación (Benson, 1999).

Los procedimientos basados en vitrificación son operacionalmente menos complejos que los clásicos. Estos procedimientos son más apropiados para congelamiento de órganos, como ápices o embriones, los cuales contienen gran variedad de tipos de células, cada uno con requerimientos específicos bajo condiciones de deshidratación inducido durante el congelamiento. Esta técnica posee gran potencial por su amplia aplicabilidad en comparación con las técnicas clásicas, puesto que se requieren modificaciones en menor grado para optimizar los protocolos (Engelmann, 1997; Withers y Engelmann, 1997).

#### **3.3.2.2.2. Técnica de encapsulación-vitrificación**

Se basa en la tecnología desarrollada para la producción de semilla sintética; consiste en encapsular meristemos, ápices y embriones somáticos en alginato de sodio y cultivarlos en medio líquido a concentraciones altas de sacarosa durante diferentes periodos. Antes de congelarse en nitrógeno líquido las cápsulas se someten a procesos de vitrificación. Para la recuperación, las muestras se colocan en medio de cultivo estándar (Fabre y Dreuddre, 1990). Este método se sustenta en el hecho de que la encapsulación protege a los

explantes, haciéndolos más resistentes a tratamientos que podrían ser letales (Takai, 2000; González y Engelmann, 2006).

Esta técnica comprende las siguientes etapas: Pre-cultivo, encapsulación, pretratamiento, deshidratación, congelamiento, descongelamiento y recuperación. Las plantas madre o los explantes a criopreservar deben someterse a condiciones de tratamiento, con la finalidad de incrementar su tolerancia a los procesos de estrés (González y Engelmann, 2006). En especies tolerantes a frío, las plantas madre *in vitro* o sus ápices pueden mantenerse a bajas temperaturas por varias semanas (Hirai y Sakai, 1999).

La vitrificación consiste en el pretratamiento de las muestras con soluciones concentradas de crioprotectores (sacarosa, glicerol y DMSO) por unos minutos; una de las mezclas más utilizadas es la de PVS2 (30 % glicerol, 15 % etilenglicol y 15 % DMSO en un medio líquido de MS con 0.4 M azúcar), seguido por el congelamiento en NL para alcanzar un estado de vitrificación de los solutos internos. Para incrementar los efectos de la utilización de los crioprotectores, el material vegetal puede precultivarse en un medio que contenga altas concentraciones de azúcar. Los azúcares reducirían el contenido hídrico de la célula, disminuyendo así la formación de hielo intracelular. Como estas soluciones son tóxicas para las células, es importante controlar

cuidadosamente el tiempo de incubación y removerlas gradualmente después de descongelar las muestras (Sakai *et al.*, 1990).

Las soluciones vitrificadoras son mezclas de crioprotectores que tienen la capacidad de desplazar el agua formando una estructura sólida. Los explantes contenidos en crioviales, se enfrían rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido para lograr la vitrificación de los solutos internos. El descongelamiento de los explantes se realiza tan rápido como sea posible para evitar la devitrificación, que puede llevar a la formación de cristales de hielo, letal para la integridad celular (Meryman y Williams, 1985).

### **3.3.2.3. Perspectivas**

En el ámbito mundial, la criopreservación ha sido utilizada hasta ahora en aproximadamente 100 especies, lo que permite suponer que en el futuro cercano se convertirá en la metodología de conservación más eficaz, segura y de bajo costo. La criopreservación se reconoce como la única opción disponible para el almacenamiento, a largo plazo, del germoplasma de especies propagadas vegetativamente, aquellas con semillas clasificadas como recalcitrantes e intermedias en cuanto al almacenamiento (Villalobos y Engelmann, 1995).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Ubicación de la fase experimental

La presente investigación se desarrolló en dos etapas. La primera consistió en la caracterización molecular de las doce variedades de referencia de la guía UPOV-SNICS de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) (Peña *et al.*, 2011), la cual se realizó en el Laboratorio de Semillas del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. La segunda fue establecer las condiciones de manejo *in vitro* y adaptar los protocolos para la criopreservación del tomate de cáscara, estudios que fueron realizados en The Plant Cell Technology Laboratory, Department of Plant Agriculture, University of Guelph, Ontario, Canadá.

### 4.2. Pruebas de germinación

Se utilizaron semillas obtenidas del Banco de Germoplasma del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. De cada variedad se obtuvieron dos gramos de semillas para la realización de los experimentos.

Para realizar las pruebas de germinación se utilizaron 300 semillas por variedad en seis repeticiones por tratamiento. Las semillas se desinfectaron sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 15 % durante quince minutos,

posteriormente en alcohol al 70 % durante un min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Se sembraron 50 semillas por placa en la cámara de flujo laminar (seis placas por tratamiento) y luego se las rotuló y selló. El primer estudio consistió en determinar la germinación de las semillas en incubadora. Las semillas se sembraron sobre papel toalla estéril humedecido con agua destilada estéril. Las cajas se colocaron en germinadoras a una temperatura de 28 °C y en un fotoperiodo 16/8. Para el estudio de la germinación *in vitro* las semillas se sembraron en medio con las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), (MS) al 100 %, suplementado con mio-inositol 100 mgL<sup>-1</sup>, tiamina 0.4 mgL<sup>-1</sup>, sacarosa 3 % y agar 7 gL<sup>-1</sup>. En ambos estudios se determinó el porcentaje de germinación de las semillas a los siete y catorce días.

### **4.3. Caracterización molecular**

#### **4.3.1. Extracción y purificación del DNA**

Para la obtención de plántulas se sembraron seis cajas petri de cada variedad con 100 semillas por caja y se colocaron en cámaras de incubación a 28 °C por cinco días. La extracción de DNA se realizó con el método descrito por Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones. A partir de la plántula completa, se tomaron 0.3 mg de tejido fresco para macerarlo en nitrógeno líquido; el tejido pulverizado se pasó a tubos de 1.5 ml, conteniendo 700 µl de amortiguador de extracción precalentado a 65 °C con el que se mezcló hasta homogenizar; se incubó a 65 °C por diez minutos, con inversión ocasional de

los tubos; se adicionó 200 µl de acetato de potasio 5 M, se agitó por inversión hasta homogenizar y se colocaron en un baño de hielo por 60 minutos, después se centrifugó a 12,000xg durante 20 minutos a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante a un tubo con 600 µl de isopropanol frío. Se mezcló por inversión y se dejó a -20 °C durante 60 minutos para la precipitación del DNA; en seguida se centrifugó por 5 minutos a 10,000xg a temperatura ambiente. Después se decantó el sobrenadante con cuidado de no eliminar la pastilla de DNA, el precipitado fue disuelto en 700 µl de solución para diluir, se dejó reposar durante la noche a 4 °C para la adecuada disolución del precipitado.

Una vez disuelto el DNA se añadieron 4 µl de ARNasa y se incubó a 37 °C por una hora, para la reprecipitación del DNA se agregaron 75 µl de acetato de sodio 3 M y 500 µl de isopropanol frío; se mezcló por inversión y se dejó a -20 °C por dos horas. Después se centrifugó por cinco minutos a 10,000xg a temperatura ambiente y el sobrenadante se eliminó cuidando la pastilla. El precipitado se lavó con 300 µl de etanol al 70 % (grado reactivo), se centrifugó a 8000xg durante cinco minutos, eliminando el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Posteriormente se disolvió en 50 µl de TE y se almacenó a 4 °C. En el Cuadro 2, se hace referencia a los reactivos y sus concentraciones empleados en la extracción de DNA.

Cuadro 2. Soluciones y reactivos utilizados para la extracción de DNA

| Reactivos                         | Concentración                                                                        |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Amortiguador de extracción</b> | Tris HCl 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, SDS 1.3 % (pH 8.0) |
| <b>Acetato de potasio</b>         | 5 M                                                                                  |
| <b>Solución para disolver DNA</b> | Tris HCl 50 mM, EDTA 10 mM (pH 8.0)                                                  |
| <b>ARNasa</b>                     | 10 mgmL <sup>-1</sup> en Tris-HCl 10 mM, CaCl 2 mM, glicerol 50 % (pH 7.0)           |
| <b>Acetato de sodio</b>           | 3 M                                                                                  |
| <b>Etanol</b>                     | 70 % (grado reactivo)                                                                |
| <b>Isopropanol frio</b>           |                                                                                      |
| <b>TE</b>                         | Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8.0)                                                   |

#### 4.3.2. Cuantificación, calidad y pureza del DNA

La cuantificación de DNA se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Una vez obtenidas las concentraciones de las extracciones se realizó un “bulk” por variedad. Para preparar el bulk se tomaron 500 ng de DNA de cada una de las diez extracciones por variedad y se mezclaron quedando al final un total de 5 µg, lo cual se diluyó hasta 500 µL con agua grado biología molecular para obtener una concentración final de 10 ngµL<sup>-1</sup>.

Una vez realizados los “bulks”, se verificó su integridad y calidad en un gel de agarosa al 0.8 %, se preparó en un matraz Erlenmeyer y se disolvió en

amortiguador TAE 1X, se calentó con ayuda de un horno de microondas cuidando que no llegara a punto de ebullición para evitar derrames, se agitó vigorosamente y se repitió la operación hasta que la agarosa se disolvió bien, se dejó enfriar a aproximadamente 50 °C y luego se vació en el portageles con el peine, cuidando que no se formaran burbujas. Se dejó solidificar el medio, se acomodó el portagel con los pozos hacia el lado negativo en la cámara de electroforesis y se agregó el amortiguador TAE 0.25 X hasta cubrir el gel.

A partir de lo “bulks” se cargaron 100 ng de cada variedad. Para ello, sobre un pedazo de papel parafilm, se mezclaron 2 µL de amortiguador de carga y 10 µL de DNA y la mezcla se colocó en los pozos del gel, anotando el orden. Una vez cargadas las muestras se tapó la cámara de electroforesis y se conectó a la fuente de poder. La electroforesis se llevó a cabo a 200 V, una vez concluida se procedió a la tinción del gel (Cuadro 3). El gel se escurrió bien y se sumergió por 20 min en una solución de bromuro de etidio 0.5 µgmL<sup>-1</sup>, usando guantes de nitrilo, cuidando de no salpicar y no contaminar el portageles. Transcurrido el tiempo y con ayuda de una espátula se colocó el gel en el transiluminador del documentador DigiDoc-It® Imaging System, UVP y se tomó la foto.

Cuadro 3. Soluciones utilizadas para teñir geles de agarosa

| SOLUCIONES            | REACTIVOS                                                                                         |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amortiguador TAE      | Tris-base 40 mM (pH 7.8), acetato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM (pH 8.0)                              |
| Amortiguador de carga | 0.2 % azul de bromo fenol, 0.2 % xileno cianol, 25 % glicerol, 5 mM EDTA, 50 Mm Tris-HCl (pH 8.0) |
| Bromuro de etidio     | 0.5 µgµl <sup>-1</sup> en TAE 1X                                                                  |

#### 4.3.3. Obtención de los patrones ISSRs

En un ensayo previo se probaron 60 iniciadores tipo ISSRs existentes en el laboratorio, de los cuales se eligieron los que presentaron mayor número de bandas.

El “bulk” (10 ngµL<sup>-1</sup>) se utilizó para hacer las reacciones de PCR con los iniciadores seleccionados. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se preparó la mezcla de reacción para un volumen total de 25 µL de acuerdo al Cuadro 4.

Cuadro 4. Mezcla de reacción PCR para obtención de los patrones ISSRs.

| REACTIVOS                 | [INICIAL]                  | [FINAL]        | 1x REACCION<br>(1x, 25 $\mu$ L) |
|---------------------------|----------------------------|----------------|---------------------------------|
| <b>Agua</b>               | --                         | --             | 5.2 $\mu$ L                     |
| <b>dNTPs</b>              | 500 $\mu$ M c/u            | 200 $\mu$ M    | 10 $\mu$ L                      |
| <b>Amortiguador</b>       | 10x                        | 1x             | 2.5 $\mu$ L                     |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>   | 50mM                       | 3.0mM          | 1.5 $\mu$ L                     |
| <b>Iniciadores</b>        | 10ng $\mu$ L <sup>-1</sup> | 30ng           | 3 $\mu$ L                       |
| <b>DNA <i>Taq</i> pol</b> | 5 U· $\mu$ L <sup>-1</sup> | 1.5 U/reacción | 0.3                             |
| <b>DNA</b>                | 10ng $\mu$ L <sup>-1</sup> | 25ng           | 2.5                             |

Se preparó una mezcla de reacción madre, adicionando cada uno de los componentes con excepción del DNA. Al agregar la DNA *Taq* polimerasa, se mezcló y repartió la mezcla en microtubos Eppendorf de 0.2 mL, marcados previamente, Se adicionó 22.5  $\mu$ L de la mezcla y después el DNA correspondiente. La mezcla se agitó y se colocó en un termociclador TECHNE TC412 con el programa descrito en el Cuadro 5. Se llevó a cabo la amplificación del DNA de las doce variedades, así como una muestra no relacionada (en este experimento se utilizó germoplasma de chile) y un blanco.

Cuadro 5. Programa del termociclador para amplificación de ISSRs.

|                              | <b>T°C</b> | <b>Tiempo</b> | <b>Ciclos</b> |
|------------------------------|------------|---------------|---------------|
| <b>Pre desnaturalización</b> | 93         | 1min          | 1             |
| <b>Desnaturalización</b>     | 93         | 20seg         |               |
| <b>Alineamiento</b>          | *          | 1min          | 40            |
| <b>Extensión</b>             | 72         | 20seg         |               |
| <b>Extensión final</b>       | 72         | 6min          | 1             |
| <b>Enfriamiento</b>          | 10         | ∞             | -             |

\*Dependió de la temperatura de alineamiento de cada iniciador.

Una vez terminada la reacción los tubos se conservaron a 4 °C. El cargado del gel se llevó a cabo de la siguiente manera. En un parafilm se mezclaron 10 µL de cada muestra y 2 µL de amortiguador de carga, se fueron depositando en los pozos del gel anotando el orden de las muestras; en el primer y último pozo del gel se cargaron 4 µL de marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen No. 15615-016). Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa ultrapura Invitrogen (Cat. No. 16500-500) al 2 % sumergidos en TAE 1x a 200 V, durante aproximadamente dos horas; transcurrido el tiempo los geles se tiñeron con bromuro de etidio por 20 minutos, se fotodocumentaron y de cada variedad se registró el patrón de bandeo.

#### **4.4. Criopreservación**

Para desarrollar el protocolo de criopreservación se adecuaron las condiciones de germinación y multiplicación de las plantas *in vitro*. Las plantas utilizadas en el experimento fueron obtenidas a partir de semillas de *Physalis ixocarpa*, las cuales se obtuvieron de la empresa “Johnny Seeds” (USA).

##### **4.4.1. Pruebas de germinación**

Para determinar las condiciones y viabilidad de las semillas se realizó una prueba de germinación. Las semillas se desinfectaron sumergiéndolas en cloro comercial al 25 % durante quince minutos y en condiciones asépticas se realizaron tres lavados con agua desionizada estéril. En cajas petri con medio basal MS 100 % (suplementado con vitaminas B5, 3 % de sacarosa y 2.2 gL<sup>-1</sup> de phytagel) se sembraron 50 semillas por caja en cuatro repeticiones. Se mantuvieron en obscuridad por tres días y luego se transfirieron a la luz. La germinación se tomó a los siete y catorce días.

##### **4.4.2. Medios de multiplicación *in vitro***

Para la multiplicación de las plantas se sembraron semillas en medio basal líquido (MS 100 % + vitaminas B5 + 3 % de sacarosa), en tubos de ensaye con 15 ml de medio y un soporte de papel filtro. Se colocaron tres semillas por tubo, teniendo 40 tubos.

Después de siete y veintiún días de la germinación se realizaron pruebas para la inducción de embriogénesis somática u organogénesis en distintos explantes. Para las plántulas de siete días se utilizaron los hipocotilos y cotiledones, mientras que para las plántulas de 21 días se incluyó el cultivo de raíces y hojas. Cada explante fue cortado de aproximadamente 0.5 cm y colocado en diferentes medios suplementados con thidiazuron (TDZ) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos suplementados con thidiazuron (TDZ).

| Tratamiento | Composición                                                |
|-------------|------------------------------------------------------------|
| <b>T1</b>   | Basal (MS 100% + vitaminas B5 + 2.2µM BA + 3% de sacarosa) |
| <b>T2</b>   | Basal + 1µM TDZ                                            |
| <b>T3</b>   | Basal + 10 µM TDZ                                          |
| <b>T4</b>   | Basal + 20 µM TDZ                                          |

Después de un mes todos los explantes fueron resebrados en medio fresco para seguir promoviendo la respuesta. Cuando se observó organogénesis o embriogénesis el tejido se trasplantó a un medio basal suplementado con 2.2 µM de 6-benzilaminopurina (BA) para la inducción de tallos. Los tallos resultantes se trasplantaron en cajas magenta con

tratamientos de BA para la inducción de la múltiple formación de tallos. Los tratamientos fueron: T1 control (MS 100 % + vitaminas B5 + 3 % de sacarosa), T2 basal + 2.2  $\mu$ M BA y T3 basal + 4.4  $\mu$ M BA. En cada caja se colocaron seis tallos con tres repeticiones, la variable a evaluada fue el número de brotes por planta. Los brotes resultantes de los tratamientos se trasplantaron en cajas con medio basal (MS 100 % + vitaminas B5 + 3 % de sacarosa) para homogenizar el crecimiento.

#### **4.4.3. Encapsulación-vitrificación**

Los brotes de aproximadamente 20 días, obtenidos a partir de los medios de multiplicación, se utilizaron para las pruebas de criopreservación. Se cortaron las yemas apicales y axilares (aproximadamente 5 mm de largo) y se colocaron en cajas petri con medio basal suplementado según el tratamiento.

Para el iniciador experimento se utilizó MS 100 % + 0.3 M sacarosa, donde dos cajas se colocaron en un acondicionamiento frío (0 °C) por 24 horas. Transcurrido el preacondicionamiento y con ayuda de un estereoscopio se disectaron las yemas apicales y axilares (2 mm aproximadamente), las cuales se colocaron en una solución de alginato de sodio 3 % + vitaminas B5 utilizando el método de gota, el cual consiste en absorber y se dejar caer la gota de alginato con el tejido en una solución cloruro de calcio 75 mM + 3 % sacarosa, lo que induce la polimerización y forma las cápsulas. Se mantuvieron

en agitación en una solución de cloruro calcio y 20 minutos después de que se formó la última cápsula. Pasado el tiempo se drenó el cloruro de calcio y quince cápsulas se sembraron en medio MS 100 % + vitaminas B5 + 2.2  $\mu$ M BA + 3 % de sacarosa como control, el resto de las cápsulas se prepararon para la crioprotección.

Las cápsulas se sumergieron 20 minutos en la solución de carga (LS, 2 M glicerol, 0.4 M sacarosa y MS 100 %), después se drenaron y se pasaron al medio de deshidratación PVS2 (30 % glicerol, 15 % etilenglicol, 15 % DMSO y 0.4 M sacarosa) por diez minutos y se drenaron. Posteriormente se colocaron en crioviales con 2 ml de la solución PVS2 y se separaron dos tubos para el tratamiento sin nitrógeno líquido, los demás crioviales se sumergieron por diez minutos en nitrógeno líquido (NL), pasado el tiempo se pasaron a un proceso de temperado en el cual los viales se sumergieron un minuto en agua a 45 °C y después se transfieren otro minuto en agua a 25 °C.

Las cápsulas se sumergieron en una solución de MS 100 % + 1.2 M sacarosa para lavar el exceso de PVS2 y reactivar el tejido. Se realizaron tres lavados con la solución, dejando las cápsulas quince minutos en el último lavado, después se removi6 el exceso de solución pasando las cápsulas por un papel filtro y se sembraron en medio basal + 2.2  $\mu$ M de BA. Las cajas petri se dejaron en oscuridad por tres días y luego se transfirieron a la luz (16 horas luz por 8 de oscuridad) a 25 °C.

Para el segundo y tercer experimento se incluyeron tratamientos con antioxidantes (Cuadro 7), con dos tiempos de acondicionamiento en frío, cinco y siete días. Las yemas disectadas de los tratamientos de multiplicación se colocaron en medios MS 100 % + vitaminas B5 + 3 % sacarosa + 2.2  $\mu$ M de BA + antioxidante según el tratamiento.

Cuadro 7. Tratamientos para la criopreservación con antioxidantes

| <b>Antioxidante</b>    | <b>Concentración</b> |
|------------------------|----------------------|
| <b>Control</b>         | Sin antioxidante     |
| <b>Melatonina</b>      | 0.1 $\mu$ M          |
|                        | 0.5 $\mu$ M          |
| <b>Glutación</b>       | 0.1mM                |
|                        | 0.3mM                |
| <b>Ácido Ascórbico</b> | 1mM                  |
|                        | 5mM                  |

Las cajas petri se colocaron en las condiciones de acondicionamiento frío por el periodo a evaluar (cinco y siete días). Transcurrido el acondicionamiento se siguió el mismo procedimiento que para el primer experimento, separando las cápsulas para el tratamiento sin vitrificación e identificando las cápsulas en los tratamientos con y sin ser sumergidos en NL. Las cápsulas se colocaron en

sus respectivos medios de regeneración según el antioxidante en el que fueron preacondicionadas.

#### **4.4.4. Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados en dos enfoques: en el primero se compararon los 30 tratamientos y en el segundo se hizo un análisis factorial. En el análisis por tratamientos para la proporción de plantas recuperadas se realizó la comparación de proporciones binomiales bajo la hipótesis de igualdad de proporciones (Infante y Zárate, 1984).

En el análisis factorial se estudió la duración de la aclimatación (cinco y siete días), el tratamiento con nitrógeno líquido (con inmersión y sin ella), el antioxidante usado en la aclimatación (Melatonina, Glutación, Ácido Ascórbico y sin antioxidante), y la concentración de antioxidante utilizada. Los datos de proporción de plantas recuperadas se transformaron mediante la fórmula:

$$PPRT = \arcsen(\sqrt{PPR \cdot 100}) \cdot \frac{180}{\pi}$$

Donde:

PPRT = Proporción de plantas recuperadas transformada

PPR = Proporción de plantas recuperadas

Con los datos transformados se hizo un análisis de varianza y las pruebas de comparación de medias (Tukey,  $P = 0.05$ ) correspondientes, considerando el modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + D_i + N_j + A_k + C_{l(k)} + DN_{ij} + DA_{ik} + NA_{jk} + DNA_{ijk} + \epsilon_{ijklm}$$

Donde:

$Y_{ijklm}$  = Valor de la variable PPRT en cada una de las observaciones.

$\mu$  = Media común a todas las observaciones.

$D_i$  = Efecto del i-ésimo nivel del factor duración de la aclimatación.

$N_j$  = Efecto del j-ésimo nivel del factor nitrógeno líquido.

$A_k$  = Efecto del k-ésimo nivel del factor antioxidante.

$C_{l(k)}$  = Efecto del l-ésimo nivel del factor concentración, anidado en el factor antioxidante.

$DN_{ij}$  = Interacción de los factores duración de la aclimatación y nitrógeno líquido.

$DA_{ik}$  = Interacción de los factores duración de la aclimatación y antioxidante.

$NA_{jk}$  = Interacción de los factores nitrógeno líquido y antioxidante.

$DNA_{ijk}$  = Interacción de los factores duración de la aclimatación, nitrógeno líquido y antioxidante.

$\epsilon_{ijklm}$  = Error aleatorio en cada una de las observaciones.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Pruebas de germinación

A los tres días en la mayoría de las variedades se empezaba a observar la emergencia de la radícula. A los siete días se contó el número de semillas germinadas, eliminándolas y volviendo a sellar la caja para realizar el conteo de las semillas germinadas a los catorce días.

Todas las variedades presentaron un alto porcentaje de germinación en ambos tratamientos (Figura 1 ), por arriba del 55 % a los catorce días, excepto la variedad Tamazula que solo alcanzó el 31 % en la germinadora y el 52 % *in vitro*. En contraste, la variedad Potrero alcanzó 91 % en la germinadoras y 90 % en la germinación *in vitro*.

En muchos casos la germinación en las germinadoras fue mayor que en *in vitro*, lo que se puede deber a que la germinación *in vitro* se realizó seis meses después y las semillas utilizadas se conservaron en condiciones no óptimas, por lo que estas se van deteriorando. El deterioro de la semilla durante el almacenamiento reduce su capacidad germinativa y esto se da por el contenido de humedad, probablemente el factor más importante que determina su longevidad (Pérez *et al.*, 2012). Si las semillas no se almacenan en un lugar

con baja humedad relativa y bajas temperatura el CH aumenta y por lo tanto la respiración aumenta, lo que acelera el envejecimiento de las mismas.

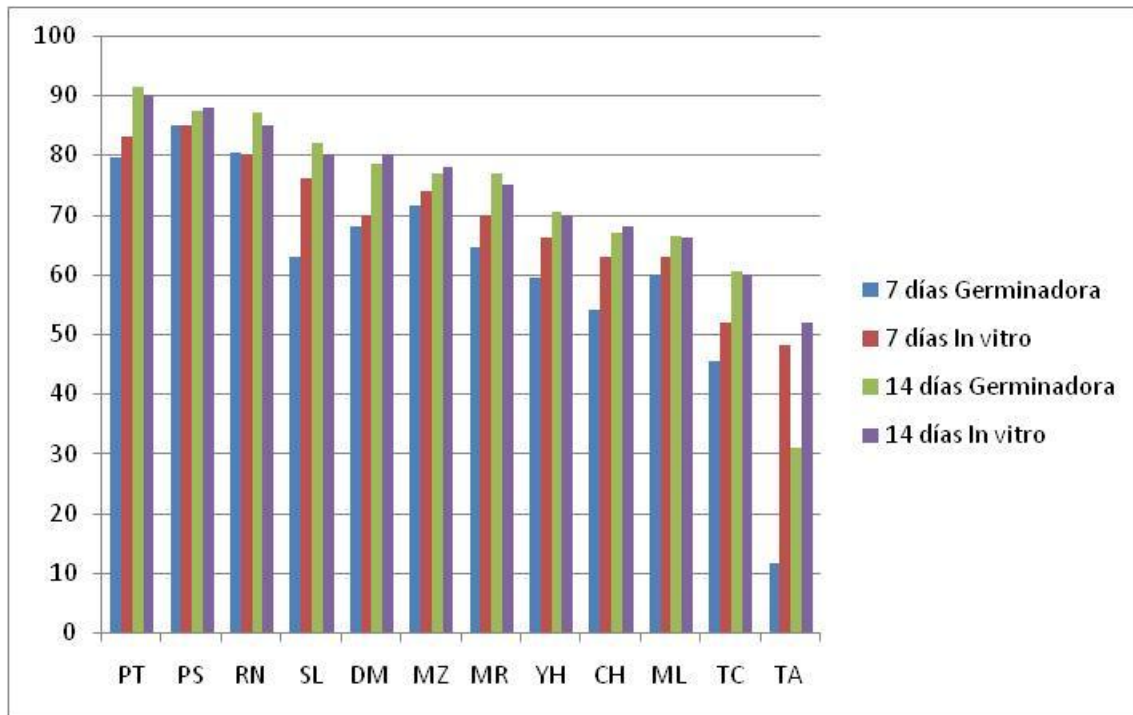


Figura 1. Gráfica del porcentaje de germinación de las doce variedades de referencia de *Physalis ixocarpa* en germinadoras y cultivos *in vitro*, a los siete y catorce días. PT = Potrero, PS = Puebla SM3, RN = Rendidora, SL = Salamanca, DM = Diamante, MZ = Manzano Tepetlixpa, MR = Morado R, YH = Yema de Huevo, CH = CHF1 Chapingo, ML = Milpero Tetela, TC = Tecozautla 04, TA = Tamazula SM3.

## **5.2. Caracterización molecular**

### **5.2.1. Cuantificación, calidad y pureza del DNA**

Después de la extracción del DNA se procedió a la cuantificación de las 120 muestras para verificar la cantidad de DNA en  $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ . El NanoDrop muestra directamente las concentraciones de las muestras y se observó una buena cantidad de DNA en todas las extracciones ( $150\text{--}497 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ ), lo cual es aceptable para llevar a cabo las reacciones de PCR necesarias.

Conociendo la concentración de DNA por muestra se procedió a realizar los “bulks”, esto con el propósito de asegurar tener la mayor cantidad de información genética de cada variedad, debido a la variación genética presente dentro de las variedades.

Después de realizados los “bulks” se preparó el gel de calidad con la finalidad de observar la presencia y el estado del DNA. En la Figura 2 se presenta el gel de agarosa de las doce muestras, donde se observa una banda compacta y de alto peso molecular, lo cual indica que el DNA no está degradado y es adecuado para las reacciones de PCR.

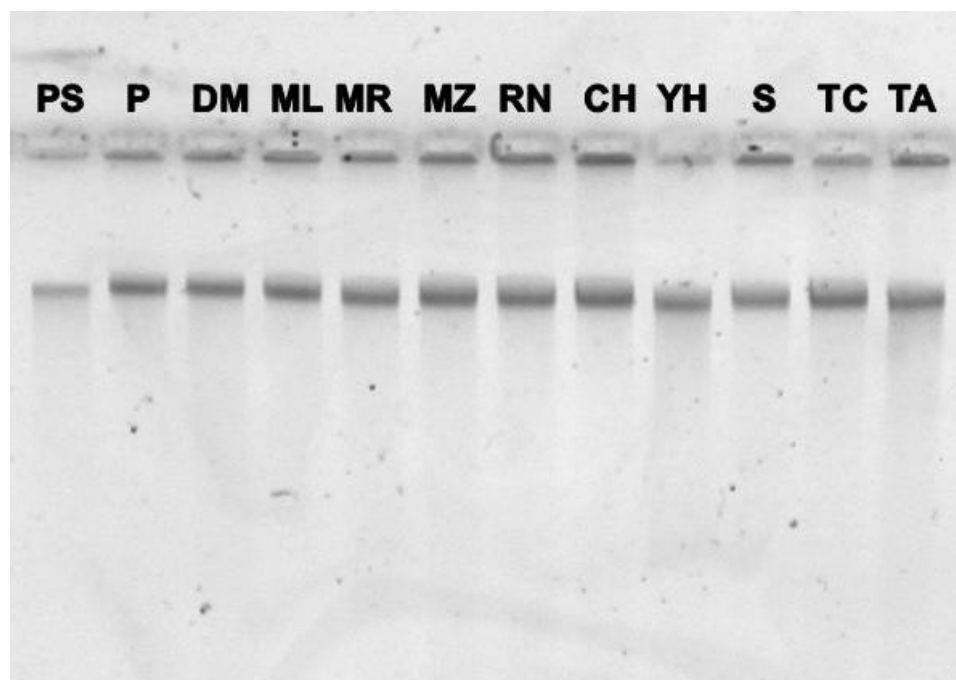


Figura 2. Gel de calidad de doce variedades de referencia de *Physalis ixocarpa*. P = Potrero, PS = Puebla SM3, RN = Rendidora, S = Salamanca, DM = Diamante, MZ = Manzano Tepetlixpa, MR = Morado R, YH = Yema de Huevo, CH = CHF1 Chapingo, ML = Milpero Tetela, TC = Tecozautla 04, TA = Tamazula SM3.

### 5.2.2. Prueba de iniciadores

En una muestra de DNA de *Physalis ixocarpa* tomada al azar se probaron los 60 iniciadores existentes en el laboratorio y de acuerdo al bandeo presentado se eligieron los 22 iniciadores que presentaron el mayor número de bandas (Figura 3).

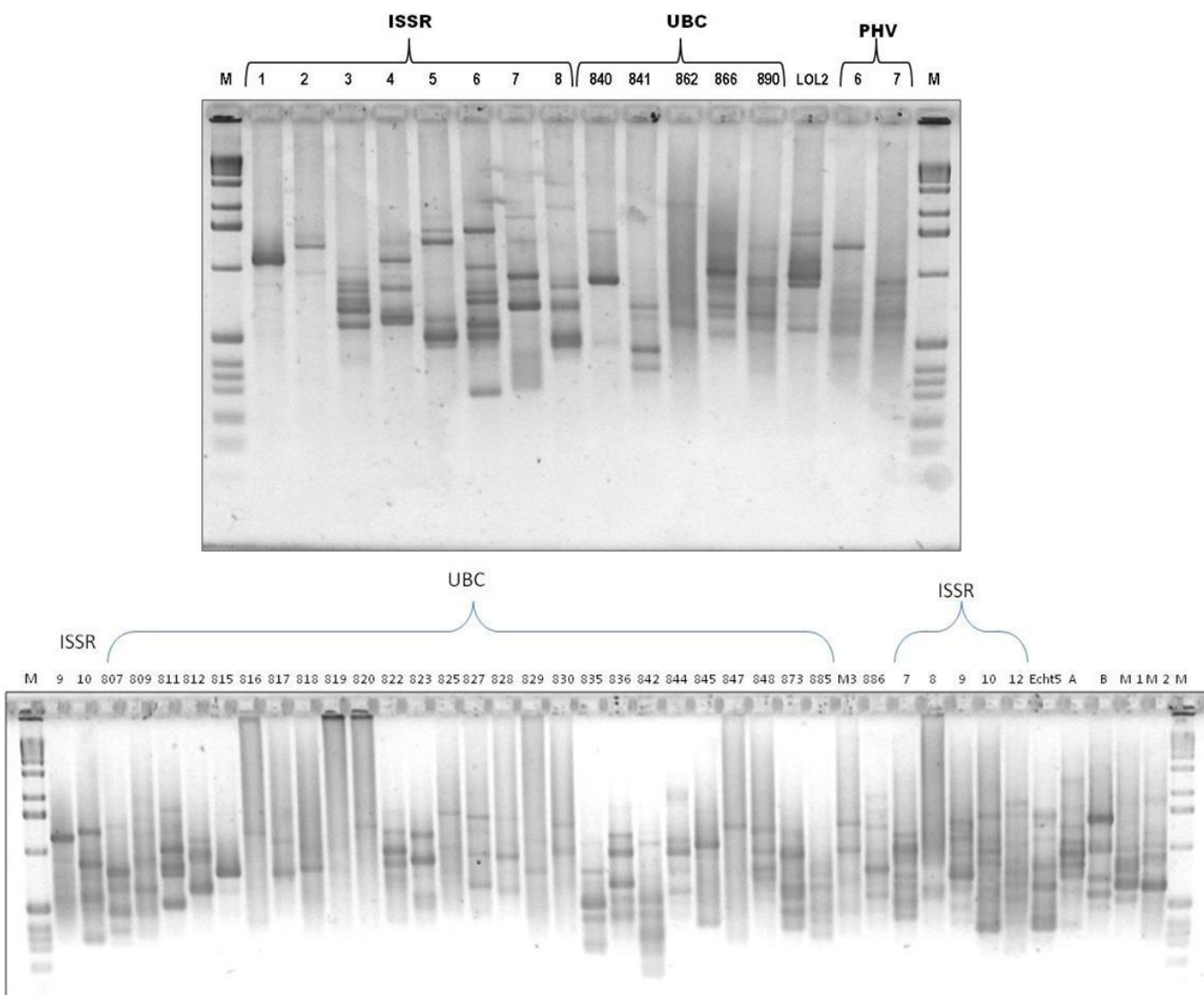


Figura 3. Prueba de 60 iniciadores ISSR en una muestra de *Physalis ixocarpa*  
M = marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen No. 15615-016).

Las secuencias (5'-3') y temperaturas de alineamiento de los iniciadores seleccionados se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Secuencia (5'-3') y temperatura de alineamiento de iniciadores ISSR utilizados para la obtención de huellas genómicas de tomate de cáscara.

| <b>Iniciador</b> | <b>Secuencia</b>        | <b>Ta °C</b> | <b>Iniciador</b> | <b>Secuencia</b>        | <b>Ta °C</b> |
|------------------|-------------------------|--------------|------------------|-------------------------|--------------|
| <b>ISSR 1</b>    | (CA) <sub>8</sub> AAGG  | 62           | <b>UBC 823</b>   | (TC) <sub>8</sub> C     | 52           |
| <b>ISSR 2</b>    | (CA) <sub>8</sub> AAGCT | 62           | <b>UBC 835</b>   | (AG) <sub>8</sub> CTC   | 54           |
| <b>ISSR 3</b>    | (GA) <sub>8</sub> CTC   | 58           | <b>UBC 836</b>   | (AG) <sub>8</sub> CTA   | 52           |
| <b>ISSR 4</b>    | (AG) <sub>8</sub> CTC   | 58           | <b>UBC 841</b>   | (GA) <sub>8</sub> CTC   | 58           |
| <b>ISSR 5</b>    | (AC) <sub>8</sub> CTA   | 56           | <b>UBC 844</b>   | (CT) <sub>8</sub> AC    | 56           |
| <b>ISSR 6</b>    | (AC) <sub>8</sub> CTG   | 58           | <b>UBC 848</b>   | (CA) <sub>8</sub> AGG   | 56           |
| <b>ISSR 7</b>    | (AG) <sub>8</sub> CTG   | 58           | <b>UBC 873</b>   | (GACA) <sub>4</sub>     | 48           |
| <b>ISSR 8</b>    | (AC) <sub>8</sub> CTT   | 56           | <b>PI01</b>      | (CA) <sub>6</sub> AGCT  | 48           |
| <b>ISSR 10</b>   | (GA) <sub>8</sub> T     | 50           | <b>PI02</b>      | (CA) <sub>6</sub> AGG   | 48           |
| <b>UBC 811</b>   | (GA) <sub>8</sub> C     | 52           | <b>PI03</b>      | AGCT(GACA) <sub>3</sub> | 48           |
| <b>UBC 822</b>   | (TC) <sub>8</sub> A     | 50           | <b>PI04</b>      | (CT) <sub>8</sub> AGC   | 58           |

### 5.2.3. Obtención de los patrones ISSR

Los resultados obtenidos al analizar las doce variedades de tomate con los 22 iniciadores seleccionados se presentan en el Cuadro 9.

En total se obtuvieron 208 bandas, 172 de las cuales fueron polimórficas, lo cual representó un porcentaje de polimorfismo general del 83 %. El número de bandas polimórficas obtenidas por iniciador osciló de una (UBC848) a 16 (ISSR2), con un promedio de 8 bandas polimórficas por iniciador. Los

iniciadores más informativos para la diferenciación intervartietal fueron PI04, ISSR2, ISSR3, ISSR7, UBC841, UBC848 y UBC873

Los resultados obtenidos en el presente estudio contrastan con los reportados por Vargas-Ponce *et al.* (2010), quienes con seis iniciadores ISSR en ocho accesiones de diferentes especies del género *Physalis* obtuvieron 101 bandas 100 % polimórficas, con un promedio de 10 a 21 bandas por iniciador. El menor porcentaje de polimorfismo y menor número de productos amplificados por iniciador encontrados en este trabajo pudo deberse a la menor diversidad genética esperada al trabajar con doce variedades de la misma especie (*Physalis ixocarpa* Brot. Ex. Hom.).

Cuadro 9. Productos de amplificación obtenidos con 22 iniciadores ISSR en doce variedades de referencia de la guía UPOV-SNICS de *Physalis ixocarpa*.

| <b>Iniciador</b> | <b>Bandas Totales</b> | <b>Bandas Monomórficas</b> | <b>Bandas Polimórficas</b> | <b>% de polimorfismo</b> |
|------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>PI01</b>      | 7                     | 2                          | 5                          | 71.43                    |
| <b>PI02</b>      | 7                     | 4                          | 3                          | 42.86                    |
| <b>PI03</b>      | 10                    | 4                          | 6                          | 60.00                    |
| <b>PI04</b>      | 11                    | 0                          | 11                         | 100.00                   |
| <b>ISSR 1</b>    | 16                    | 1                          | 15                         | 93.75                    |
| <b>ISSR 2</b>    | 16                    | 0                          | 16                         | 100.00                   |
| <b>ISSR 3</b>    | 8                     | 0                          | 8                          | 100.00                   |
| <b>ISSR 4</b>    | 8                     | 4                          | 4                          | 50.00                    |
| <b>ISSR 5</b>    | 10                    | 3                          | 7                          | 70.00                    |
| <b>ISSR 6</b>    | 13                    | 2                          | 11                         | 84.62                    |
| <b>ISSR 7</b>    | 7                     | 0                          | 7                          | 100.00                   |
| <b>ISSR 8</b>    | 9                     | 1                          | 8                          | 88.89                    |
| <b>ISSR 10</b>   | 9                     | 2                          | 7                          | 77.78                    |
| <b>UBC 811</b>   | 10                    | 3                          | 7                          | 70.00                    |
| <b>UBC 822</b>   | 10                    | 0                          | 10                         | 100.00                   |
| <b>UBC 823</b>   | 4                     | 1                          | 3                          | 75.00                    |
| <b>UBC 835</b>   | 11                    | 3                          | 8                          | 72.73                    |
| <b>UBC 836</b>   | 8                     | 2                          | 6                          | 75.00                    |
| <b>UBC 841</b>   | 13                    | 0                          | 13                         | 100.00                   |
| <b>UBC 844</b>   | 8                     | 0                          | 8                          | 100.00                   |
| <b>UBC 848</b>   | 5                     | 4                          | 1                          | 20.00                    |
| <b>UBC 873</b>   | 8                     | 0                          | 8                          | 100.00                   |
| <b>Total</b>     | <b>208</b>            | <b>36</b>                  | <b>172</b>                 | <b>82.69</b>             |

El uso de técnicas de DNA para huellas genéticas ha demostrado ser un instrumento útil, rápido y de enfoque preciso para el estudio de las variaciones inter e intra-específicas de las plantas (Shan *et al.*, 2002), pues ayuda a realizar una discriminación adecuada y aislar genotipos. Con este propósito, en la Cuadro 10 se presentan los perfiles moleculares de las doce variedades estudiadas, donde se puede observar que la variedad con mayor polimorfismo promedio fue la Manzano y la de menor fue la Puebla SM3.

Cuadro. 10. Perfiles moleculares de las doce variedades de referencia de *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.

|      | PS      | P      | DM     | ML     | MR     | MZ     | RN     | CH     | YH     | SL     | TC     | TA     |
|------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| PI01 | 1772.3* | 2656.5 | 2656.5 | 2656.5 | 2656.5 | 2656.5 | 2656.5 | 2656.5 | 2656.5 | 2656.5 | 1719.9 | 1719.9 |
|      | 1099.8  | 1719.9 | 1678.9 | 2189.8 | 1678.9 | 2243.3 | 1678.9 | 1678.9 | 2298.2 | 2243.3 | 1061.0 | 1113.5 |
|      | 913.5   | 1287.2 | 1086.9 | 1719.9 | 896.0  | 1719.9 | 896.0  | 1113.5 | 1678.9 | 1719.9 | 874.6  | 896.0  |
|      | 738.9   | 1086.9 | 896.0  | 1287.2 |        | 1086.9 |        | 917.9  | 1086.9 | 1086.9 |        | 738.5  |
|      | 458.5   | 896.0  |        | 1086.9 |        | 896.0  |        |        | 896.0  | 896.0  |        |        |
| PI02 |         |        |        | 896.0  |        |        |        |        |        |        |        |        |
|      | 1359.6  | 1683.3 | 1644.6 | 1644.6 | 1683.3 | 1890.8 | 1847.3 | 1847.3 | 1644.6 | 1606.8 | 1606.8 | 1644.6 |
|      | 1029.2  | 1334   | 1334   | 1334   | 1365.4 | 1683.3 | 1644.6 | 1644.6 | 1365.4 | 1303.4 | 1303.4 | 1303.4 |
|      | 843.7   | 1215.6 | 1187.6 | 1215.6 | 1187.6 | 1334   | 1334   | 1334   | 986    | 1187.6 | 986    | 986    |
|      | 710.1   | 1009.2 | 986    | 1009.2 | 1009.2 | 1215.6 | 1009.2 | 1187.6 | 837.9  | 986    | 818.7  | 799.9  |
|      | 597.7   | 818.7  | 818.7  | 837.9  | 818.7  | 1009.2 | 837.9  | 1009.2 | 695.7  | 781.5  | 679.7  | 679.7  |
|      | 537.6   | 728.8  | 695.7  | 712.1  | 712.1  | 799.9  | 695.7  | 818.7  |        | 712.1  |        |        |
|      | 452.5   |        |        |        |        | 695.7  |        | 712.1  |        |        |        |        |
| PI03 | 338.1   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|      | 1099.8  | 1665.3 | 1626.3 | 2123.9 | 1588.2 | 2123.9 | 1626.3 | 2061.1 | 1588.2 | 1626.3 | 1588.2 | 2123.9 |
|      | 866.3   | 1410.8 | 1061.7 | 1965.7 | 1036.9 | 1874.7 | 1410.8 | 1588.2 | 1410.8 | 1345.5 | 965.7  | 1626.3 |
|      | 673.5   | 1061.7 | 661.1  | 1626.3 | 661.1  | 1588.2 | 1061.7 | 1410.8 | 1036.9 | 818.2  | 661.1  | 1377.8 |
|      | 597.7   | 661.1  |        | 1410.8 |        | 1223.9 | 818.2  | 1087.2 | 818.2  | 677    |        | 1036.9 |
| PI04 | 509.8   |        |        | 780.3  |        | 988.9  | 677    | 661.1  | 677    |        |        | 661.1  |
|      |         |        |        | 661.1  |        | 661.1  |        |        |        |        |        |        |
|      | 1099.8  | 1898   | 2123.8 | 2844.9 | 1658.5 | 3461.2 | 3664.8 | 2477.7 | 2053.7 | 2102.4 | 2102.4 | 1586.6 |
|      | 729.2   | 705.7  | 1814.5 | 2600.2 | 1385.4 | 2659.4 | 2719.8 | 1662.8 | 1513.9 |        | 1742.6 | 1254.9 |
|      | 516.6   |        | 1550.3 | 2076.6 | 1057.8 | 2221.5 | 2172.1 | 1197.4 | 1284.7 |        | 1411   | 969.6  |
|      |         |        | 1324.5 | 1585.5 | 945.3  | 2030.4 | 1855.8 | 925.2  | 1040.3 |        | 1090.2 | 682.2  |
|      |         |        | 705.7  | 1385.4 | 674.7  | 1515.8 | 1295   | 651    | 903.8  |        | 803.8  | 145.5  |

|       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|       |        |        |        | 690    |        | 1266.2 | 789.7  | 484    |        |        | 138.9  |        |
|       |        |        |        |        |        |        | 538.8  |        |        |        |        |        |
|       | 978.9  | 1105.8 | 1185.1 | 1924.7 | 1080.5 | 1880.7 | 1880.7 | 1837.8 | 1754.9 | 1754.9 | 1837.8 | 1795.9 |
|       | 400.3  | 877.8  | 1105.8 | 1675.7 | 800.3  | 1637.4 | 1675.7 | 1675.7 | 1212.8 | 1185.1 | 1637.4 | 1299.8 |
|       | 340.4  | 782.1  | 940.7  | 1563.5 | 680.9  | 1105.8 | 1425.6 | 1185.1 | 1055.9 | 1055.9 | 1330.1 | 1158.1 |
| ISSR1 |        | 540.5  | 838.2  | 1080.5 | 553.1  | 857.7  | 1158.1 | 1055.9 | 665.3  | 877.8  | 1158.1 | 1055.9 |
|       |        | 429    | 729.7  | 940.7  | 391.2  | 620.8  | 1055.9 | 838.2  | 340.6  | 592.8  | 1055.9 | 857.7  |
|       |        |        | 566    | 782.1  |        | 391.2  | 819    | 492.8  |        | 528.2  | 696.8  | 696.8  |
|       |        |        | 481.6  |        |        |        | 680.9  | 382.3  |        | 391.2  | 566    | 553.1  |
|       |        |        | 400.3  |        |        |        | 391.2  |        |        |        | 373.5  | 382.3  |
|       |        | 1392.2 | 707.9  | 1425   | 1757.8 | 3817.5 | 1799.3 | 2349.2 | 1493.1 | 2897.4 | 1493.1 | 1717.3 |
|       |        | 1155.2 | 615.5  | 1210.4 | 1425   | 1458.6 | 1564.3 | 1493.1 | 1298.1 | 1929.7 | 1155.2 | 1564.3 |
|       |        | 1028.1 | 510.7  | 1102.6 | 1077.2 | 1182.5 | 1052.3 | 1128.6 | 1182.5 | 1528.3 | 958.6  | 1210.4 |
| ISSR2 |        | 833.4  |        | 1004.4 | 560.6  | 1077.2 | 853.1  | 691.6  | 1052.3 | 1238.9 | 833.4  |        |
|       |        | 560.6  |        | 833.4  | 465.2  | 741.7  | 724.6  | 573.9  | 936.5  | 1128.6 | 724.6  |        |
|       |        |        |        | 587.4  |        | 587.4  | 587.4  |        | 777.1  | 853.1  | 630    |        |
|       |        |        |        |        |        |        |        |        | 547.7  |        |        |        |
|       | 1144.4 | 1212.5 | 2177.1 | 1212.5 | 1212.5 | 1304.6 | 2124.6 | 1438.2 | 1510.1 | 1212.5 | 1369.8 | 1336.8 |
|       | 889.6  | 904.9  | 1473.8 | 950.1  | 927.3  | 1183.3 | 1547.4 | 1183.3 | 1242.5 | 997.6  | 1127   | 1154.8 |
|       | 700.8  | 569.4  | 1183.3 | 744.5  | 841.1  | 950.1  | 1212.5 | 904.9  | 973.6  | 861.8  | 820.8  | 950.1  |
| ISSR3 | 613.8  |        | 841.1  | 555.6  | 744.5  | 820.8  | 973.6  | 542.3  | 781.7  | 709.1  | 569.4  | 762.9  |
|       | 523.5  |        | 709.1  |        | 569.4  | 555.6  | 861.8  | 457.2  | 659.1  | 555.6  |        | 569.4  |
|       | 452.5  |        | 569.4  |        | 480    | 424.9  | 692    |        | 529.2  | 468.4  |        | 468.4  |
|       | 376.1  |        | 457.2  |        |        |        | 542.3  |        | 468.4  |        |        |        |
|       |        |        |        |        |        |        | 468.4  |        |        |        |        |        |
|       | 1359.6 | 1791.7 | 1881.2 | 1835.9 | 1438.8 | 1927.7 | 1975.2 | 1975.2 | 1975.2 | 1975.2 | 2073.9 | 2120.8 |
| ISSR4 | 1114.4 | 1404.2 | 1404.2 | 1438.8 | 1155.4 | 1510.7 | 1474.3 | 1548   | 1548   | 1586.1 | 1586.1 | 1625.3 |
|       | 963.2  | 1183.9 | 1155.4 | 1155.4 | 862.4  | 1183.9 | 1213.1 | 1243   | 1273.7 | 1273.7 | 1305.1 | 1337.3 |

|       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|       | 821.6  | 974.2  | 998.2  | 998.2  | 727.1  | 905.5  | 883.7  | 1073.9 | 1073.9 | 950.7  | 927.8  | 974.2  |
|       | 700.8  | 841.6  | 821.3  | 862.4  | 628.2  | 745    | 763.4  | 905.5  | 883.7  | 821.3  | 801.6  | 628.2  |
|       | 530.5  | 763.4  | 745    | 542.7  | 556.1  | 542.7  | 556.1  | 782.3  | 745    | 583.9  | 598.3  |        |
|       |        | 529.6  | 542.7  |        |        |        |        | 569.8  | 598.3  |        |        |        |
|       | 1183.1 | 2498.7 | 2498.7 | 2498.7 | 2498.7 | 2498.7 | 2498.7 | 2498.7 | 2498.7 | 2591.3 | 2591.3 | 2498.7 |
|       | 950.6  | 1472.4 | 1472.4 | 1437   | 1508.6 | 1437   | 1472.4 | 1508.6 | 1472.4 | 1508.6 | 1472.4 | 2128.5 |
|       | 628.9  | 1099.9 | 974    | 974    | 1183.1 | 998    | 998    | 1272.6 | 998    | 1303.9 | 1154.7 | 1472.4 |
| ISSR5 |        | 974    | 782.6  | 821.6  | 998    | 821.6  | 821.6  | 998    | 821.6  | 1154.7 | 974    | 1154.7 |
|       |        | 763.8  | 644.3  | 644.3  | 801.9  | 660.2  | 660.2  | 821.6  | 660.2  | 998    | 821.6  | 998    |
|       |        | 644.3  |        | 517.7  | 644.3  |        | 505.3  | 660.2  |        | 660.2  | 644.3  | 821.6  |
|       |        |        |        |        |        |        | 517.7  |        |        |        |        | 660.2  |
|       | 1893.7 | 2268.2 | 2351.9 | 2351.9 | 2268.2 | 2351.9 | 2351.9 | 2268.2 | 1697.6 | 2187.5 | 2268.2 | 2351.9 |
|       | 1594   | 1697.6 | 1697.6 | 1697.6 | 1697.6 | 1697.6 | 1637.2 | 1637.2 | 1270.5 | 1637.2 | 1697.6 | 1637.2 |
|       | 1433.6 | 1270.5 | 1270.5 | 1270.5 | 1317.4 | 1225.3 | 1366   | 1317.4 | 793.4  | 1270.5 | 1270.5 | 1225.3 |
|       | 1029.2 | 1022.4 | 1099.2 | 1022.4 | 986    | 1022.4 | 765.2  | 1022.4 | 474.7  | 765.2  | 1099.2 | 950.9  |
| ISSR6 | 889.6  | 917.1  | 884.5  | 765.2  | 765.2  | 765.2  | 483    | 765.2  | 433.3  | 513.7  | 853    | 686.4  |
|       | 655.8  | 765.2  | 738    | 507.9  | 513.7  | 487.1  | 445.7  | 507.9  | 375.3  | 491.3  | 765.2  | 478.9  |
|       | 490    | 491.3  | 507.9  | 462.3  | 466.4  | 445.7  | 383.6  | 449.9  |        | 400.1  | 507.9  | 400.1  |
|       | 429.1  | 445.7  | 474.7  | 412.6  |        | 387.7  |        | 408.4  |        |        | 478.9  |        |
|       | 366    | 404.3  | 437.4  |        |        |        |        |        |        |        | 404.3  |        |
|       | 324.9  |        | 367    |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|       | 1460.6 | 1745.2 | 685.6  | 1745.2 | 1000.7 | 1706.8 | 1745.2 | 1706.8 | 1397.1 | 1397.1 | 1397.1 | 1366.3 |
|       | 1000.7 | 1460.6 | 469.7  | 1493.5 | 801.1  | 1460.6 | 1397.1 | 1428.5 | 957.2  | 1000.7 | 670.5  | 1093.8 |
| ISSR7 | 783.5  | 1069.8 | 402    | 1222.5 |        | 1169.3 | 1118.4 | 1143.6 | 429.7  | 685.6  | 449.3  | 502.1  |
|       | 685.6  | 819.1  |        | 1000.7 |        | 1000.7 | 525    | 978.7  |        | 548.8  |        |        |
|       | 525    |        |        | 801.1  |        | 701    |        | 685.6  |        | 491.1  |        |        |
|       |        |        |        | 685.6  |        | 480.3  |        | 491.1  |        |        |        |        |
| ISSR8 | 2128.5 | 1624.3 | 1624.3 | 1941.2 | 1709.2 | 2042.6 | 1666.2 | 1666.2 | 1709.2 | 1753.3 | 1753.3 | 1753.3 |
|       | 816.9  | 1504.9 | 1504.9 | 1624.3 | 1504.9 | 1624.3 | 976.3  | 927.8  | 1001.4 | 1624.3 | 1583.5 | 1001.4 |

|        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|        | 572    | 859.6  | 859.6  | 881.7  | 1053.7 | 904.5  | 881.7  | 756.8  | 617.4  | 1027.3 | 904.5  | 529.9  |
|        | 432.3  | 491    | 516.6  | 491    | 859.6  | 737.8  | 543.6  | 543.6  | 516.6  | 881.7  | 529.9  |        |
|        |        |        |        |        | 586.8  | 529.9  |        |        |        | 601.9  |        |        |
|        |        |        |        |        | 478.6  |        |        |        |        | 516.6  |        |        |
|        | 938.4  | 1319.4 | 1350.4 | 1382   | 1382   | 1350.4 | 1382   | 1382   | 1382   | 1382   | 1414.4 | 1783.2 |
|        | 770.5  | 1022.6 | 1022.6 | 1175.1 | 1046.6 | 1046.6 | 1230.9 | 1230.9 | 1096.2 | 1096.2 | 1121.9 | 1481.5 |
|        | 597.9  | 849.6  | 869.5  | 1022.6 | 889.9  | 910.8  | 910.8  | 910.8  | 932.1  | 932.1  | 932.1  | 976.3  |
| ISSR10 | 512.1  | 510.3  | 522.3  | 910.8  | 586.5  | 774.4  | 739.4  | 534.6  | 369    | 756.7  | 573    | 792.6  |
|        | 350.1  | 352.3  | 344.2  | 722.4  | 498.7  | 600.2  | 643.4  | 360.5  |        | 614.3  |        | 614.3  |
|        |        |        |        | 534.6  | 360.5  | 360.5  | 522.3  |        |        | 369    |        | 395.5  |
|        |        |        |        |        |        |        | 360.5  |        |        |        |        |        |
|        | 1143   | 1486   | 1451.7 | 1451.7 | 1966.6 | 1557   | 1451.7 | 1418.2 | 1071.6 | 1418.2 | 1451.7 | 1966.6 |
|        | 938.4  | 1071.6 | 1096.9 | 1096.9 | 1261.9 | 1096.9 | 1096.9 | 1096.9 | 809.7  | 1176.5 | 1022.7 | 1670   |
|        | 792.5  | 848.4  | 809.7  | 809.7  | 1022.7 | 828.8  | 809.7  | 809.7  | 484.4  | 1022.7 | 809.7  | 1451.7 |
| UBC811 | 737.5  | 507.5  | 507.5  | 507.5  | 809.7  | 641.1  | 507.5  | 484.4  |        | 809.7  | 484.4  | 1122.8 |
|        | 549.5  |        |        |        | 507.5  | 495.8  |        |        |        | 495.8  |        | 809.7  |
|        | 519.5  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | 626.3  |
|        | 370.4  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | 484.4  |
|        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | 318.1  |
|        | 1095.7 | 1702.4 | 1956.3 | 2002.2 | 1742.3 | 2114.3 | 2192.6 | 2192.6 | 2192.6 |        | 2192.6 | 2002.2 |
|        | 826.7  | 1382   | 1742.3 | 1825   | 1148.2 | 739.4  | 1825   | 1867.7 | 1230.9 |        | 1588.1 | 1481.5 |
| UBC822 | 589.6  | 1096.2 | 1096.2 | 1414.4 | 600.2  | 586.5  | 1447.6 | 1121.9 | 658.5  |        | 1230.9 | 1319.4 |
|        |        | 830.2  | 600.2  | 910.8  |        | 476.1  | 1096.2 | 910.8  | 487.2  |        | 1096.2 | 1121.9 |
|        |        | 586.5  | 433.9  | 600.2  |        |        | 889.9  | 658.5  |        |        | 954    | 830.2  |
|        |        | 433.9  |        |        |        |        | 658.5  |        |        |        | 658.5  | 673.9  |
|        | 1168.7 | 1771.9 | 1740   | 2629.2 | 1740   | 2671   | 3512.7 | 1618.1 | 1618.1 | 1837.6 | 1804.4 | 1804.4 |
| UBC823 | 965.3  | 1504.9 | 1504.9 | 1771.9 | 1147.9 | 1589   | 1589   | 1211.6 | 1233.6 | 1589   | 1647.8 | 1647.8 |
|        | 718.1  | 1147.9 | 1168.7 | 1618.1 |        | 1326   | 1190   |        |        | 1233.6 | 1233.6 | 1256.1 |

|        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|        | 549.5  |        |        | 1147.9 |        | 1168.7 |        |        |        |        |        |        |
|        | 457.5  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| UBC835 | 784.9  | 3393.3 | 3131.1 | 3393.3 | 1862.6 | 3000   | 2868.9 | 2868.9 | 3000   | 2868.9 | 3000   | 2868.9 |
|        | 577.3  | 1826.6 | 1780.4 | 1488.3 | 1826.6 | 1862.6 | 1922.5 | 1862.6 | 1910.6 | 1922.5 | 1691.5 | 1922.5 |
|        | 482.6  | 1450.7 | 1488.3 | 805.2  | 708.5  | 1780.4 | 1780.4 | 1780.4 | 1735.4 | 1735.4 | 1450.7 | 1735.4 |
|        | 337.3  | 826.1  | 963.2  | 708.5  | 577.3  | 1378.3 | 1488.3 | 1450.7 | 1450.7 | 1414.1 | 805.2  | 1414.1 |
|        | 261.1  | 708.5  | 805.2  | 548.5  | 482.6  | 826.1  | 963.2  | 963.2  | 805.2  | 826.1  | 690.6  | 805.2  |
|        |        | 495.1  | 708.5  | 482.6  | 328.7  | 708.5  | 826.1  | 784.9  | 708.5  | 726.8  | 470.4  | 690.6  |
|        |        | 413.9  | 548.5  | 320.4  |        | 562.7  | 726.8  | 690.6  | 562.7  | 470.4  | 422    | 548.5  |
|        |        | 320.4  | 482.6  |        |        | 482.6  | 577.3  | 548.5  | 470.4  | 320.4  | 312.3  | 470.4  |
|        |        |        | 424.6  |        |        | 413.9  | 482.6  | 482.6  | 304.4  |        |        | 312.3  |
|        |        |        | 320.4  |        |        | 320.4  | 422    | 422    |        |        |        |        |
|        |        |        |        |        |        |        | 320.4  | 320.4  |        |        |        |        |
| UBC836 | 778.4  | 1537.2 | 1537.2 | 1537.2 | 1571.3 | 1571.3 | 1503.8 | 1318.2 | 1318.2 | 1606.2 | 2254.1 | 1571.3 |
|        | 682.3  | 1234.2 | 1289.6 | 1289.6 | 1289.6 | 1318.2 | 1347.5 | 1035.4 | 1035.4 | 1181.2 | 1347.5 | 1347.5 |
|        | 490.9  | 1130.5 | 1105.9 | 1058.4 | 1155.6 | 1013   | 1058.4 | 697.5  | 712.9  | 1058.4 | 1155.6 | 1081.9 |
|        | 361    | 1013   | 991    | 697.5  | 1013   | 682.3  | 697.5  | 459.6  | 469.8  | 697.5  | 1058.4 | 728.8  |
|        |        | 667.5  | 682.3  | 459.6  | 682.3  | 449.6  | 459.6  |        |        | 469.8  | 697.5  | 512.9  |
|        |        | 449.6  | 439.9  |        | 469.8  |        |        |        |        |        | 469.8  |        |
| UBC841 | 858.2  | 2441.6 | 2497.7 | 2497.7 | 2229.4 | 2441.6 | 2555.2 | 2441.6 | 877.9  | 939.9  | 2613.9 | 2179.3 |
|        | 443.9  | 2082.5 | 2179.3 | 2179.3 | 1352.1 | 2179.3 | 2130.3 | 918.8  | 715.5  | 748.8  | 939.9  | 939.9  |
|        | 345.7  | 898.1  | 1415   | 1383.2 | 1127.3 | 1352.1 | 1415   | 715.5  | 570    | 464.6  | 748.8  | 732    |
|        |        | 699.4  | 898.1  | 898.1  | 898.1  | 1153.2 | 939.9  | 454.1  |        | 370.1  | 464.6  | 464.6  |
|        |        | 454.1  | 668.3  | 668.3  | 699.4  | 918.8  | 715.5  | 361.8  |        |        | 370.1  | 370.1  |
|        |        | 353.7  | 434    | 454.1  | 434    | 699.4  | 454.1  | 294.9  |        |        |        |        |
|        |        |        | 345.7  | 345.7  | 353.7  | 443.9  | 353.7  |        |        |        |        |        |
|        |        |        |        |        |        | 361.8  |        |        |        |        |        |        |
| UBC844 | 2323.7 | 1207.6 | 1234.8 | 1207.6 | 1291.2 | 2018.3 | 2120.8 | 1973.8 | 1129.3 | 1104.4 | 1056.1 | 1056.1 |

|        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|        | 1233.6 | 863.8  | 1032.8 | 1056.1 | 1104.4 | 1104.4 | 1320.4 | 1207.6 | 755.5  | 772.5  | 772.5  | 755.5  |
|        | 1049.3 |        | 844.7  | 844.7  | 826.1  | 826.1  | 1080   | 1010   |        |        | 516.8  |        |
|        | 917    |        |        | 577.9  |        | 552.6  | 826.1  | 807.8  |        |        |        |        |
|        | 749.1  |        |        |        |        |        | 604.3  | 552.6  |        |        |        |        |
|        | 499.9  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|        | 1392.8 | 1974.1 | 1320.8 | 1292.5 | 1264.8 | 1712.7 | 1349.7 | 1320.8 | 1379.2 | 1379.2 | 1440.3 | 1349.7 |
|        | 1049.3 | 1320.8 | 1040.8 | 1018.5 | 1040.8 | 1349.7 | 1040.8 | 1063.6 | 1110.7 | 1110.7 | 1349.7 | 1110.7 |
| UBC848 | 834.4  | 1040.8 | 802.7  | 820.2  | 838.2  | 1063.6 | 838.2  | 838.2  | 856.5  | 856.5  | 1110.7 | 894.4  |
|        | 729.1  | 802.7  |        |        | 704.9  | 820.2  |        | 768.6  | 768.6  | 785.5  | 856.5  | 785.5  |
|        |        |        |        |        |        | 736.1  |        |        |        |        | 785.5  |        |
|        | 1615.2 | 2119.3 | 2222.8 | 2170.4 | 2119.3 | 2170.4 | 1751.5 | 2170.4 | 2069.4 | 2119.3 | 2276.4 |        |
|        | 1289.4 | 1630.7 | 2020.7 | 1973.1 | 2020.7 | 2069.4 | 1347.7 | 2069.4 | 1670   | 1710.3 | 2170.4 |        |
|        | 1015.7 | 1315.9 | 1630.7 | 1670   | 1670   | 1518.2 | 1036.9 | 1670   | 1347.7 |        | 1751.5 |        |
| UBC873 | 664.6  | 965.4  | 1284.9 | 1315.9 | 1347.7 | 1284.9 | 857    | 1284.9 | 1036.9 |        | 1012.5 |        |
|        | 559.4  | 797.8  | 1012.5 | 1012.5 | 1012.5 | 1036.9 | 675.3  | 1036.9 | 836.8  |        | 675.3  |        |
|        |        | 613.9  | 817.1  | 836.8  | 836.8  | 836.8  |        | 836.8  | 708.2  |        |        |        |
|        |        |        | 675.3  | 659.4  | 691.5  | 675.3  |        | 691.5  |        |        |        |        |

P = Potrero, PS = Puebla SM3, RN = Rendidora, S = Salamanca, DM = Diamante, MZ = Manzano Tepetlaxpa, MR = Morado R, YH = Yema de Huevo, CH = CHF1 Chapingo, ML = Milpero Tetela, TC = Tecozautla 04, TA = Tamazula SM3. \* = Pesos moleculares (pb) de las bandas obtenidas en cada una de las variedades con cada iniciador.

### **5.3. Criopreservación**

#### **5.3.1. Pruebas de germinación**

Debido a que las semillas se obtuvieron de una empresa proveedora de semillas y no se sabe el tiempo de almacenamiento que estas tenían se realizó una prueba de germinación para determinar su viabilidad.

Al transferir a la luz el tercer día de establecida la prueba de germinación, se observó que las semillas ya habían empezado a germinar . Al séptimo día el porcentaje de germinación era de 90 %, mismo que aumentó a 96 % a los 14 días. El porcentaje de germinación obtenido fue muy alto (96 %), teniendo en cuenta que en promedio las variedades de referencia usadas en el presente estudio tuvieron un 70 % de germinación en charolas, diferencia que se debe al tiempo y las condiciones de almacenamiento (Pérez, 2008).

#### **5.3.2. Medios de multiplicación**

La mayoría de los explantes mostraron respuesta a los tratamientos con TDZ. Los explantes más jóvenes (siete días de germinados) tuvieron una mejor respuesta a los tratamientos y en menos tiempo que los explantes más viejos. La respuesta en el tejido fue la formación de callo generalizado, iniciando de los extremos cortados del explante y algunos presentaron organogénesis.

De los diferentes explantes de tejido el que mayor respuesta tuvo fueron los cotiledones, pues en todos los explantes se observó la formación generalizada de callo y también algo de organogénesis en los tratamientos dos, tres y cuatro (Figura 4).



Figura 4. Respuestas de los diferentes explantes en los medios suplementados con TDZ. A) Explantes de cotiledón de siete días de edad mostrando la formación generalizada de callosidad del tratamiento 2. B) Explante de cotiledón de catorce días de edad presentando organogénesis del tratamiento 4. C) Raíz de 21 días de edad con formación generalizada de callo, presentando áreas verdes del tratamiento 4.

Los tejidos que mostraron organogénesis se trasplantaron a un medio fresco suplementado con BA para la inducir de formación de tallos. Los tallos obtenidos de estos tratamientos se sembraron en cajas con diferentes tratamientos de BA para inducir la formación múltiple de tallos. El mejor tratamiento para la obtención de tallos uniformes y normales fue el medio suplementado con BA al 2.2  $\mu$ M.

Las plantas de 20 días de trasplantadas a los medios se midieron y se contaron sus brotes. Para el control se obtuvieron tallos de 15 cm de largo que presentaron un tallo principal, sin brotes secundarios, por lo que su tasa de multiplicación fue uno.

Para el tratamiento 2 (2.2  $\mu$ M de BA) se obtuvieron plantas con una altura promedio de 9 cm y una tasa de multiplicación de ocho, mientras que en el tercer tratamiento (4.4 $\mu$ M de BA) se obtuvieron plantas con una altura promedio de 5 cm y una tasa de multiplicación de doce.

Para el tercer tratamiento se observó una gran cantidad de brotes pero muchos de estos no eran normales, pues presentaban tallos engrosados o crecimiento anormal de hojas, por lo que solamente los que se podían utilizar para el trasplante por sus características de tamaño y vigor eran aproximadamente doce. En la Figura 5 D se puede observar el crecimiento anormal de las plantas y los múltiples brotes diminutos que presentan.

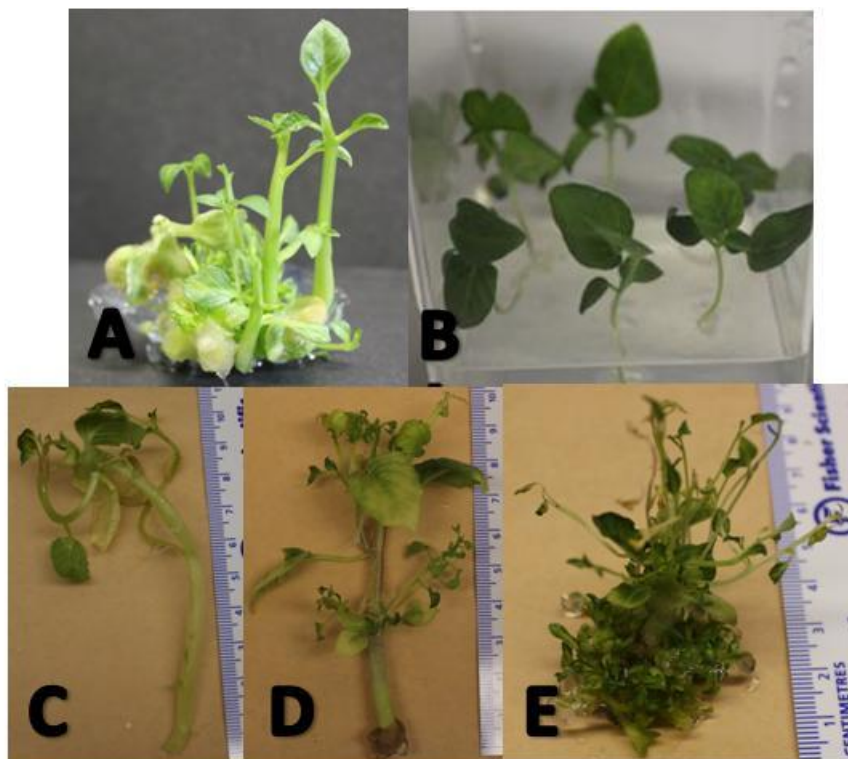


Figura 5. Tratamientos de multiplicación de plantas con medios suplementados con BA. A) Tallos obtenidos de los explantes suplementados con BA de los tratamientos que presentaron organogénesis. B) Siembra de los tallos obtenidos por inducción de BA. B) Plantas con un solo tallo obtenidas del medio control. C) Planta con múltiples tallos de los medio suplementados con 2.2  $\mu$ M de BA. D) Plantas con crecimiento anormal de tallos en los medio suplementados con 4.4  $\mu$ M de BA.

De tallos normales obtenidos de la multiplicación se cortaron los ápices y yemas axilares y se trasplantaron a medios MS suplementados con crioprotectores según el tratamiento.

### **5.3.3. Pruebas de encapsulación-vitrificación**

Para estas pruebas se tomó una caja preacondicionada por 24 horas en frío, se extrajeron las yemas y se sembraron en un medio basal para comprobar que tenían potencial de regeneración después del acondicionamiento en frío. Se obtuvo un 100 % de regeneración de las plantas por lo cual se procedió con las siguientes pruebas.

En la siguiente prueba se realizó la criopreservación sin ayuda de antioxidantes o preaclimatación con medios ricos en sacarosa, para determinar que tan sensible es la planta a las condiciones que se somete y si es capaz de regenerarse. Se siguieron todos los pasos del protocolo, pero se consideró un tratamiento sin sumergir en el nitrógeno líquido (NL). Después de quince días de sembradas las plantas se observó un 68 % de regeneración de las plantas que no se sumergieron en NL y solo un 8 % de las que sumergieron en nitrógeno líquido (Figura 6). Debido a la baja tasa de regeneración de las yemas para el protocolo de criopreservación se ajustaron las cantidades y los tiempos de exposición añadiendo tratamientos con antioxidantes.

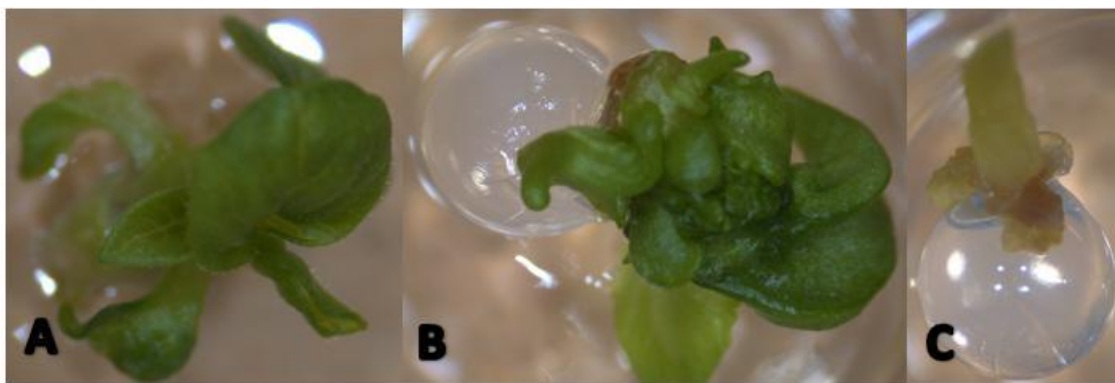


Figura 6. Respuestas a las pruebas de criopreservación. A) Regeneración de las yemas que con se sometieron a criopreservación. B) Crecimiento de la yema que fue sometida al tratamiento sin NL. C) Respuesta de las cápsulas sometidas al protocolo con NL.

#### 5.3.4. Análisis estadístico

Las yemas preacondicionadas en frío por cinco y siete días se cortaron con ayuda de un estereoscopio para que el tamaño del tejido fuera de aproximadamente 3x3 mm, luego se colocaron en la solución de alginato de sodio 3 % complementada con vitaminas B5, se siguió el protocolo con los ajustes necesarios.

También se tomó en cuenta el tratamiento sin NL para determinar el efecto de las soluciones en el tejido y si éste es capaz de regenerarse antes de someterse a las temperaturas ultra bajas. Las cápsulas fueron transferidas a los mismos medios en que fueron preacondicionadas, dejando una repetición en medio basal.

En la comparación de proporciones binomiales destacan los tratamientos uno y 16 (Cuadro 10). Estos corresponden a los testigos con cinco y siete días de aclimatación, respectivamente, los cuales permanecieron en medio MS durante todo el proceso y fueron encapsulados en alginato de sodio. Dentro del grupo de tratamientos en los que si se realizó el encapsulado, los tratamientos cuatro, cinco, siete y nueve superaron al resto, y además fueron estadísticamente iguales al tratamiento 16 (Cuadro 11). Cabe destacar que el tratamiento cuatro es el único de los cuatro que fue sometido a inmersión en nitrógeno líquido, lo cual implica que es el mejor tratamiento para la criopreservación.

Cuadro 11. Comparación de proporciones binomiales para proporción de plantas recuperadas.

| No | Tratamiento                                                               | PPR         |
|----|---------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 1  | Cinco días de aclimatación                                                | 0.8000 a    |
| 2  | Cinco días de aclimatación + Nitrógeno líquido                            | 0.1000 def  |
| 3  | Cinco días de aclimatación sin Nitrógeno líquido                          | 0.1667 cde  |
| 4  | Cinco días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Melatonina 0.1 $\mu$ M   | 0.2667 bcd  |
| 5  | Cinco días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Melatonina 0.1 $\mu$ M | 0.3750 bc   |
| 6  | Cinco días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Melatonina 0.5 $\mu$ M   | 0.1667 cde  |
| 7  | Cinco días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Melatonina 0.5 $\mu$ M | 0.3125 bcd  |
| 8  | Cinco días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Glutación 0.1 mM         | 0.1000 def  |
| 9  | Cinco días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Glutación 0.1 mM       | 0.2500 bcde |
| 10 | Cinco días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Glutación 0.3 mM         | 0.0333 ef   |
| 11 | Cinco días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Glutación 0.3 mM       | 0.1250 cdef |
| 12 | Cinco días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Ácido Ascórbico 1 mM     | 0.1333 cdef |
| 13 | Cinco días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Ácido Ascórbico 1 mM   | 0.1875 cde  |
| 14 | Cinco días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Ácido Ascórbico 5 mM     | 0.0667 ef   |
| 15 | Cinco días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Ácido Ascórbico 5 mM   | 0.1250 def  |
| 16 | Siete días de aclimatación                                                | 0.5333 ab   |
| 17 | Siete días de aclimatación + Nitrógeno líquido                            | 0.0400 ef   |
| 18 | Siete días de aclimatación sin Nitrógeno líquido                          | 0.0833 def  |
| 19 | Siete días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Melatonina 0.1 $\mu$ M   | 0.1000 def  |
| 20 | Siete días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Melatonina 0.1 $\mu$ M | 0.1875 cde  |
| 21 | Siete días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Melatonina 0.5 $\mu$ M   | 0.0667 ef   |
| 22 | Siete días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Melatonina 0.5 $\mu$ M | 0.1250 def  |
| 23 | Siete días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Glutación 0.1 mM         | 0.0000 f    |
| 24 | Siete días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Glutación 0.1 mM       | 0.0625 ef   |
| 25 | Siete días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Glutación 0.3 mM         | 0.0000 f    |
| 26 | Siete días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Glutación 0.3 mM       | 0.0000 f    |
| 27 | Siete días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Ácido Ascórbico 1 mM     | 0.0333 ef   |
| 28 | Siete días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Ácido Ascórbico 1 mM   | 0.0000 f    |
| 29 | Siete días de aclimatación + Nitrógeno líquido + Ácido Ascórbico 5 mM     | 0.0000 f    |
| 30 | Siete días de aclimatación sin Nitrógeno líquido + Ácido Ascórbico 5 mM   | 0.0000 f    |

En el análisis de varianza se encontraron efectos significativos para los factores duración de la aclimatación, tratamiento con nitrógeno líquido, uso de antioxidantes y concentración de antioxidantes. Ninguna de las interacciones consideradas en el modelo resultó significativa (Cuadro 12).

Cuadro 12. Cuadrados medios del análisis de varianza para la variable proporción de plantas recuperadas transformada.

| Fuente de Variación | Grados de Libertad | Cuadrado Medio |
|---------------------|--------------------|----------------|
| D                   | 1                  | 3377.6640*     |
| N                   | 1                  | 746.4205*      |
| A                   | 3                  | 950.3734*      |
| C(A)                | 3                  | 225.3269*      |
| D*N                 | 1                  | 69.6666        |
| D*A                 | 3                  | 39.5238        |
| N*A                 | 3                  | 66.2503        |
| D*N*A               | 3                  | 24.8757        |
| Error               | 57                 | 69.2202        |
| Total               | 75                 |                |

D: duración de la aclimatación; N: tratamiento con nitrógeno líquido; A: uso de antioxidantes; C(A): concentración de antioxidantes, anidado en el factor uso de antioxidantes; D\*N:interacción de los factores duración de la aclimatación y nitrógeno líquido; D\*A: interacción de los factores duración de la aclimatación y antioxidante; N\*A: interacción de los factores nitrógeno líquido y antioxidante;

D\*N\*A: interacción de los factores duración de la aclimatación, nitrógeno líquido y antioxidante. \*: Significativo ( $P = 0.05$ ).

En la prueba de comparación de medias para los niveles del factor duración de la aclimatación (Tukey,  $P = 0.05$ ) se encontró que con un periodo de cinco días se obtiene mayor proporción de plantas recuperadas que con siete días (Cuadro 13). Este resultado contrasta con el obtenido por Kaczmarczyk (2008), quien encontró que cuando se aclimatan las yemas axilares de papa por siete días antes de la criopreservación, por el método de encapsulación-vitrificación, se mejora el porcentaje de generación en un 30 %.

Para el factor tratamiento con nitrógeno líquido, en la prueba de comparación de medias (Tukey,  $P = 0.05$ ) se observó que la proporción de plantas recuperadas es más alta cuando no se realiza la inmersión en nitrógeno líquido (Cuadro 13).

Entre los niveles del factor antioxidantes destaca la melatonina, que en la prueba de comparación de medias (Tukey,  $P = 0.05$ ) superó al resto de los niveles estudiados (Cuadro 13). Este resultado concuerda con lo encontrado por Uchendu (2013) donde encontró que el uso de melatonina, como pretratamiento durante la aclimatación en frío de yemas de olmo americano, ayuda a tener un mayor porcentaje de regeneración. No encontró diferencias significativas entre 0.1 y 0.5  $\mu\text{M}$  de melatonina, pero con su uso encontró un

aumento del 20 % en el porcentaje de regeneración, mientras que en el presente trabajo se mejoro el porcentaje de regeneración en un 15 % con el uso de melatonina, en comparación con el control.

Zi-Cheng (2004) encontró que el uso de glutatión (0.3 mM) en los medios del pretratamiento de yemas axilares y meristemos de cultivares de naranja aumentó un 30 % el porcentaje de regeneración de las plantas, mientras que en concentraciones mayores se reduce el índice de regeneración. De igual manera, en el presente estudio se observó que con una mayor cantidad de glutatión se reduce el porcentaje de regeneración de las plantas, pero en este caso la regeneración fue inferior al control, mostrando que probablemente la concentración de glutatión usada en tomate de cáscara es superior a la tolerancia de dicha especie.

Uchendu (2010) encontró que el ácido ascorbico (0.6 mM) mejoró de manera significativa el porcentaje de regeneración (20 %) de meristemos de grosella al suplementarse los medios de pretratamiento. En el presente trabajo se observó que en ambas concentraciones el porcentaje de regeneración fue más bajo que el control. Sin embargo, la concentración mayor (5 mM) presentó un mayor porcentaje (5 %) de regeneración que la concentración baja (1 %). Después de una semana de sembradas las cápsulas se observó que el medio se licuó, lo que se debió a la alta concentración de ác. ascórbico que acidificó el medio y posterior a este evento los explantes murieron.

Cuadro 13. Pruebas de comparación de medias para los factores.

| Factor                            | PPRT   | PPR                   |
|-----------------------------------|--------|-----------------------|
| Duración de la aclimatación       |        |                       |
| Cinco días                        | 21.196 | 0.1307 a <sup>z</sup> |
| Siete días                        | 7.669  | 0.0178 b              |
| DMSH                              | 3.822  |                       |
| Tratamiento con Nitrógeno Líquido |        |                       |
| Sin inmersión                     | 18.317 | 0.0988 a              |
| Con inmersión                     | 11.899 | 0.0425 b              |
| DMSH                              | 3.910  |                       |
| Uso de antioxidantes              |        |                       |
| Melatonina                        | 24.091 | 0.1666 a              |
| Glutación                         | 9.716  | 0.0285 b              |
| Ácido Ascórbico                   | 9.457  | 0.0270 b              |
| Sin antioxidantes                 | 14.473 | 0.0625 b              |
| DMSH                              | 7.144  |                       |

PPRT: proporción de plantas recuperadas trasformada; PPR: proporción de plantas recuperadas; DMSH: diferencia mínima significativa honesta; <sup>z</sup>Valores con la misma letra dentro de factores no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Al comparar las concentraciones evaluadas para cada uno de los antioxidantes utilizados en el estudio se encontró que con la concentración alta de Glutación (0.3 mM) se obtuvo una mayor proporción de plantas recuperadas que con la concentración baja (0.1 mM). El mismo comportamiento se observó para el Ácido Ascórbico, donde la concentración más alta (5 mM) superó a la más baja (1 mM). No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de melatonina evaluadas (Cuadro 14).

Cuadro 14. Pruebas de comparación de medias para las concentraciones de antioxidantes.

| Concentración   | PPRT    | PPR      |
|-----------------|---------|----------|
| Melatonina      |         |          |
| 0.5 $\mu$ M     | 26.4214 | 0.1980 a |
| 0.1 $\mu$ M     | 21.7606 | 0.1374 a |
| Glutación       |         |          |
| 0.3 mM          | 13.4476 | 0.0541 a |
| 0.1 mM          | 5.9845  | 0.0109 b |
| Ácido Ascórbico |         |          |
| 5 mM            | 13.2575 | 0.0526 a |
| 1 mM            | 5.6565  | 0.0097 b |
| DMSH            | 7.367   |          |

PPRT: proporción de plantas recuperadas trasformada; PPR: proporción de plantas recuperadas; DMSH: diferencia mínima significativa honesta; <sup>2</sup>Valores con la misma letra dentro de factores no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Del análisis factorial se desprende que la mejor combinación de factores sería cinco días de aclimatación, sin nitrógeno líquido y con melatonina. Lo anterior se puede corroborar en la comparación de proporciones binomiales

(Cuadro 11), donde los tratamientos cinco y siete, que corresponden a dicha combinación, son los más sobresalientes dentro de los encapsulados. En este mismo análisis se puede observar que el tratamiento cuatro es mejor de los sometidos a inmersión en nitrógeno líquido. Considerando los resultados del análisis factorial, la superioridad de este tratamiento se debe a que el efecto positivo de la melatonina compensó el efecto adverso de la inmersión en nitrógeno.

## VII. CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos en el presente trabajo es posible establecer las bases para generar una estrategia de uso, conservación y mejoramiento para estos materiales.

Se identificaron 22 iniciadores los cuales generaron un total de 208 bandas amplificadas, 83 % mostraron polimorfismo. Se obtuvo un promedio de ocho bandas polimórficas por iniciador, lo cual los hace propicios para una buena discriminación entre genotipos y obtener patrones para la caracterización molecular de las variedades de referencia.

La germinación *in vitro* de las semillas en el medio basal líquido es eficiente para obtener plantas sanas, de buen tamaño y vigor. El mejor método de multiplicación es un medio suplementado con 2.2  $\mu\text{M}$  de 6-bencilaminopurina, debido a que presenta brotes sencillos con características uniformes de tamaño y vigor. La tasa de multiplicación es satisfactoria porque de cada semilla sembrada se pueden obtener hasta ocho plantas con las mismas características.

El protocolo de criopreservación usado es viable para el tomate de cáscara, debido a que se presenta regeneración de los tejidos en un porcentaje aceptable. La máxima regeneración (0.2667) después de la encapsulación-vitrificación con PVS2, ocurrió en las yemas con cinco días de aclimatación en frío y pretratadas en medios con melatonina (0.1 $\mu$ M) como antioxidante.

## VII. LITERATURA CITADA

- ABDELNOUR, A. 1999. Crioconservación de plantas, estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 23(2): 205-214.
- ÁVILA, T.; IZQUIERDO, J. 2006. Management of the appropriate agricultural biotechnology for small producers: Bolivia case study. *Electronic Journal of Biotechnology* 9(1). doi: 10.2225/vol9-issue1-fulltext-4 Enero 2014. Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v9n1-4/218>
- ÁVILA, T.; DE LA BARRA, S.; COCA, N.; GUEVARA, N.; CÉSPEDES, J.; GUZMÁN, L. 2007. Multiplicación y conservación *in vitro* de pasifloras andinas. *In: Avances de investigación en recursos genéticos en el Cono Sur*. PROCISUR, Montevideo, Uruguay. 9 p.
- AZOFEIFA-DELGADO, Á. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-24.
- BENSON, E. 1999. *Plant Conservation Biotechnology*. CRC Press. Dundee, UK. pp. 83-95.
- CULLEY, T.; WOLFE, A. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity* 86: 545-556.
- DAY, J.; STACEY, G. 1995. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols: Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems*. Human Press, Totowa, NJ, USA. pp. 163 – 183.

- DELLAPORTA, S.; WOOD, J.; HICKS, J. 1983. A plant minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Report 1:19-20.
- ENGELMANN, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. Euphytica 57: 227-243.
- ENGELMANN, F. 1996. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. Acta Horticulturae 447: 471-476.
- ENGELMANN, F. 1997. *In vitro* conservation methods, pp. 119-162. *In: Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use.* FORD-LLOYD, B. V.; NEWBERRY, H. J.; CALLOW, J. A. (eds.). CAB International, Wallingford, UK.
- ENGELMANN, F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and Prospects. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40(5): 427-433.
- FABRE, J.; DEREUDDRE, J. 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. CryoLetters 11: 413-126.
- FAO, 1992. Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492. La agricultura en Mesoamerica. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. Consultado: Enero 2014. Disponible en: [http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2\\_9.htm](http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2_9.htm)
- FAO. 2012. FAO Statistical Yearbook 2012, World food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Consultado: Enero 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.pdf>
- GONZÁLEZ, M. T.; ENGELMANN, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study of sugarcane. Cryoletters 27(3): 155-168.

- GROSSMANN, M.; SANTALÓ, J. 2001. Principios básicos de Criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 18(4): 22-24.
- HARDING, K. 1991. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow grow and cryopreservation. Euphytica 55: 141-146.
- HIRAI, D.; SAKAI, A. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. Potato Research 42: 153-160.
- INFANTE G., S.; ZÁRATE DE L., G.P. 1984. Métodos Estadísticos. Edit. Trillas. México. pp. 463 – 467, 513 – 515.
- JARAMILLO, S.; BAENA, M. 2000. Conservación *ex situ* de los Recursos Fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia. 128 p.
- KACZMARCZYK, A.; SHVACHKO, N.; LUPYSHEVA, Y.; MOHAMMAD-REZA, H.; KELLER, J. 2008. Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips. Plant Cell Rep 27(9): 1551-1558.
- KARP, A.; EDWARDS, K. J. 1998. DNA markers: a global overview, pp. 1-13. *In: DNA markers: protocols, applications and overviews*. CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. (eds.). Wiley, New York, USA.
- KUSHNARENKO, S.; ROMADANOVA, N.; REED, B. 2009. Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips. Cryoletters 30(1): 47-54.
- LOBO, A. M. 2006. Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual. Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria 7(2): 40-54.

- LÓPEZ M., R.; SANTIAGUILLO H., J. F.; PEÑA L., A.; CUEVAS S., J. A.; SAHAGÚN C., J. 1994. Evaluación de 60 colectas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en Chapingo, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 1(2): 131-134.
- LOYOLA, V.; ROBERT, M. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. CICY y CONACYT, México. pp. 21-26.
- MAZUR, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Cell Physiol. 247: 125-142.
- MEDINA, M. C. 2008. Estudios de Criopreservación mediante Encapsulación-Deshidratación y Vitricación, y Caracterización Molecular de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr). Tesis de Maestría en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 115 p.
- MERYMAN H., T.; WILLIAMS, R. J. 1985. Basic principles of *in vitro* cultured axillary shoot tips of *Vitis* by vitricación. Acta Horticulturae 538: 173-175.
- MONTALVO H., L. 1998. Caracterización molecular y morfológica de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 111 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol 15(3): 473-497.
- NIINO, T.; SAKAI, A.; YAKUWA, H.; NOJIRI, K. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitricación. Plant Cell 28(3): 261-266.
- NONNATUS, S.; SOLIS, R.; KAMIJIMA, O.; ISHII, T. 2001. RAPD, RFLP and SSLP analyses of phylogenetic relationships between cultivated and wild species of rice. Genes & Genetic Systems 76(2): 71–79.

- NUEZ V., F.; CARRILLO B., J. M.; DE RON, A. M. 2000. Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, Servicio de Publicación. Valencia, España. pp. 3-22.
- ORDUÑA M., O. E. 1989. Germinación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Tesis Profesional en Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. pp. 4-10.
- PANDEY K., K. 1957. Genetics of self-incompatibility in *Physalis ixocarpa* Brot. A new system. American Journal of Botany 44: 879-887.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees), pp. 61-78. *In: The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources*. RUANE, J.; SONNINO, A. (eds.). FAO, Rome, Italy.
- PEÑA L., A.; MÁRQUEZ S., F. 1990. Mejoramiento genético de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en México. Revista Chapingo Serie Horticultura 15(71-72): 84-88.
- PEÑA L., A.; MOLINA G., J. D.; CERVANTES S., T.; MÁRQUEZ S., F.; SAHAGÚN C., J.; ORTÍZ C., J. 1998. Heterosis intervarietal en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Chapingo Serie Horticultura 4(1): 31-37.
- PEÑA L., A.; MOLINA G., J.D.; SAHAGÚN C., J.; ORTÍZ C., J.; MÁRQUEZ S., F.; CERVANTES S., T.; SANTIAGUILLO H., J.F. 2008. Parámetros genéticos de la variedad CHF1 Chapingo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Chapingo Serie Horticultura. 14(1): 5-11.
- PEÑA L., A.; MAGAÑA L., N.; MONTES H., S.; SÁNCHEZ M., J.; SANTIAGUILLO H., J. F.; GRIMALDO J., O.; CONTRERAS R., A. 2011. Manual Gráfico para la Descripción Varietal de Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). UACH-SNICS. México. 87 p.

- PÉREZ A., J. P.; PEÑA L., A.; MULATO B., J. 1992. Caracterización de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en Chapingo, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 16(79-80): 128-137.
- PIÑERO, D.; CABALLERO-MELLADO, J.; CABRERA-TOLEDO, D.; CANTEROS, C.; CASAS, A.; CASTAÑEDA, A.; CASTILLO, A.; CERRITOS, R. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: Estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 437-494.
- RAO, N. K. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology 3(2): 136-145.
- REED, B. M.; SCHUMACHER, L.; WANG, N.; D'ACHINO, J.; BARKER, R. E. 2006. Cryopreservation of bermuda grass germplasm by encapsulation dehydration. Crop Science 46(1): 6-11.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. 1991. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs.) by a simple freezing method. Plant Science 74: 243-248.
- SANTIAGUILLO H., J. F.; PEÑA L., A.; MONTALVO H., D. 1998. Evaluación de variedades de tomate de cáscara en Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. Revista Chapingo Serie Horticultura 4(2): 83-88.
- SANTIAGUILLO H., J. F.; CEDILLO P., E.; CUEVAS S., J. A. 2010. Distribución geográfica del *Physalis spp.* En México. UACH-Prometeo Editores. México. 245 p.
- SANTIAGUILLO H., J. F.; VARGAS P., O.; GRIMALDO J., O.; MAGAÑA L., N.; CARO V., J. F.; PEÑA L., A.; SÁNCHEZ M., S. 2012. Diagnóstico del Tomate de Cáscara. Universidad Autónoma Chapingo. 46 p.

- SANTOS, Y. 2006. Estudio de la diversidad genética en una población de cocotero de Cuba. Tesis de Maestría en Ciencias en Biología Vegetal. Universidad de la Habana, Habana, Cuba. pp. 3-15.
- SANTOS H., L.; AGUIRRE L., E.; CAMPOS C., J. E.; MARTÍNEZ G., M. 2006. Conservación *in situ* de la flora mexicana: la orquídea *Laelia albina*, una reserva de la biosfera. Ciencia y desarrollo 7(2): 2-10.
- SARAY M., C.; RAMÍREZ L., J. 1977. El cultivo de tomate de cáscara en el Estado de Morelos. SAGARPA. México. pp. 3-11.
- SARAY M., C. R.; PALACIOS, A.; VILLANUEVA, E. 1978. Rendidora: una nueva variedad de tomate de cáscara. El Campo 54(1041): 17-21.
- SCHAFER M., A.; SHUMACHER H., M. 1997. Cryopreservation of potato cultivars design of a method for routine application in gene banks. Acta Horticulturae 447: 477-481.
- SEGUEL, B. I. 2001. Conservación de recursos fitogenéticos *ex situ*, pp. 79-90. *In: Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur.* BERRETA, A.; RIVAS, M. PROCISUR. Montevideo, Uruguay.
- SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP). 2012. Anuarios estadísticos de la producción agrícola. México, D. F. Consultado: Diciembre 2013. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- SERVICIO NACIONAL DE INSPECCIÓN Y CERTIFICACIÓN DE SEMILLAS (SNICS). 2012. Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México, D.F. Consultado: Noviembre 2013. Disponible en: [http://snics.sagarpa.gob.mx/Documents/CNVV\\_2012.pdf](http://snics.sagarpa.gob.mx/Documents/CNVV_2012.pdf)

- SIMBAQUEBA, J.; SÁNCHEZ, P.; SANCHEZ, E.; NÚÑEZ Z., V. M.; CHACON, M. I. 2011. Development and characterization of microsatellite markers for the cape gooseberry *Physalis peruviana*. PLoS ONE 6(10): 1-6.
- SIMPSON, J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. Bol. Soc. Bot. Méx. 60: 73-76.
- SOLÍS R., L. Y.; ANDRADE T., A. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? La ciencia y el hombre 28(1): 41-46.
- SUN, M. M.; WONG, K. C. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RADP and allozyme markers. American Journal of Botany 88(12): 2180–2188.
- TAKAGI, H. 2000. Recent development in cryopreservation of shoot apices of tropical species, pp.178-193. *In*: Cryopreservation of tropical plant germplasm. TAKAGI, H.; ENGELMANN, F. IPGR. Rome, Italy.
- TORIBIO, M.; CELESTINO, C.; GALLEGOS, J.; MARTÍNEZ, I. 2000. Induction of somatic embryogenesis in tissues from mature oak trees, pp 236-237. *In*: Development of integrated Systems for Large scale Propagation of Elite Plants using *in vitro* Techniques. European Communities, EUR.
- UCHENDU, E.; SHUKLA, M.; REED, M.; SAXENA, P. 2013. Melatonin enhances the recovery of cryopreserved shoot tips of American elm (*Ulmus Americana* L.). Journal of Pineal Research 55(4): 435-442.
- UCHENDU, E.; LEONARD, S.; TRABER, M.; REED, M. 2010. Vitamin C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. Plant Cell Rep 29(1): 25-35.
- VALADEZ M., E.; KAHL, G. 2000. Huellas de DNA en genomas de plantas. Mundi-Prensa-UACH. México. 168 p.

- VARGAS-PONCE, O.; PÉREZ-ÁLVAREZ, L. F.; ZAMORA-TAVARES, P.; RODRÍGUEZ, A. 2010. Assessing genetic diversity in mexican husk tomato species. *Plant Molecular Biology* 29: 733-738.
- VILLALOBOS, V. M.; ENGELMMAN, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. *Biotechnol* 11(4): 375-382.
- VILLATORO L., J. C. 1996. Cultivo *in vitro* de yemas axilares para la micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.) Var, Rendidora. Tesis Profesional en Ingeniero Agrónomo Especialista en fitotecnia. Universidad Autonoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 56-78.
- VILLATORO, E. 1998. La Medicina Tradicional en Guatemala: Aspectos Históricos. Centro de Estudios Folklóricos. CEFOL-DIGI-USAC. San Carlos, Guatemala. pp. 12-25.
- WEI, J.; HU, X.; YANG, J.; YANG, W. 2012. Identification of single-copy orthologous genes between *Physalis* and *Solanum lycopersicum* and analysis of genetic diversity in *Physalis* using molecular markers. *PLoS ONE* 7(11): 1-9.
- WESTENDORP, N.; ENCINA, C. L. 2004. Criopreservación de plantas. *Encuentros en la Biología* 98: 1134-8496.
- WITHERS, L. A. 1985. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts, pp. 243-267. *In: Cryopreservation of plant cells and organs*. KARTHA, K. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida.
- WOLFE, A.; LISTON, A. 1998. Contributions of PCR-based Methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology, pp. 43–86. *In: Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencieng*. SOLTIS, D.; SOLTIS, P.; DOYLE, J. (eds.). New York, USA.

- WOLFE, A.; XIANG, Q. Y.; KEPHAR, S. R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (*Scrophulariaceae*) using hypervariable inter simple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol. Ecol.* 7(9): 1107–1125.
- YE, C.; ZHANWANG, Y.; KONG, F.; SOUWEI, W.; WANG, B. 2005. R-ISSR as a new tool for genomic fingerprinting, mapping and gene tagging. *Plant Molecular Biology Reporter* 23(2): 167-177.
- ZI-CHENG, W.; XUI-XIN, D. 2004. Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *CryoLetters* 25(1): 43-50.