



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE TOMATE
(*Solanum lycopersicum* L.) CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE
TREHALOSA**

TESIS

**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTÉCNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta:

SILVIA YAZARETH ROMERO ESCOBEDO



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



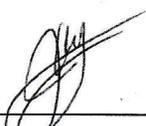
Chapingo, México, junio de 2017

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE TOMATE
(Solanum lycopersicum L.) CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE
TREHALOSA

Tesis realizada por **SILVIA YAZARETH ROMERO ESCOBEDO** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

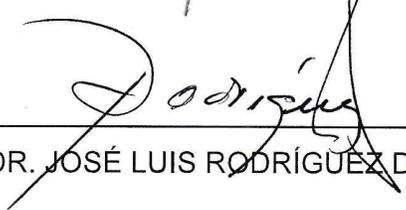
DIRECTOR: _____


DR. JOSÉ ÓSCAR MASCORRO GALLARDO

ASESOR: _____


DR. JUAN ENRIQUE RODRÍGUEZ PÉREZ

ASESOR: _____


DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| ÍNDICE DE CUADROS | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| DEDICATORIA | x |
| AGRADECIMIENTOS | xi |
| DATOS BIOGRÁFICOS | xii |
| RESUMEN GENERAL | 1 |
| GENERAL ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 3 |
| OBJETIVOS | 5 |
| Objetivo General | 5 |
| Objetivos Particulares | 5 |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 6 |
| Importancia del cultivo de Tomate | 6 |
| Propagación <i>in vitro</i> de Tomate | 7 |
| Organogénesis directa | 8 |
| Enraizamiento | 9 |
| Aclimatación | 10 |
| Ingeniería Genética en Tomate..... | 11 |
| Aplicaciones de la Ingeniería Genética en Tomate..... | 13 |
| Generalidades de la Trehalosa | 15 |
| Genes TPS en plantas..... | 18 |
| LITERATURA CITADA | 20 |
| REGENERACIÓN DE TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) POR ORGANOGENÉISIS DIRECTA | 25 |

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 27 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 28 |
| Material Vegetal | 28 |
| Regeneración por Organogénesis Directa de Tomate | 28 |
| Enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de tomate | 30 |
| Aclimatación de plantas de tomate generadas por cultivo <i>in vitro</i> | 31 |
| Análisis estadístico..... | 31 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 32 |
| Regeneración por Organogénesis Directa de Tomate | 32 |
| CONCLUSIÓN | 41 |
| LITERATURA CITADA | 42 |
| PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) QUE ACUMULAN TREHALOSA..... | 45 |
| INTRODUCCIÓN | 47 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 49 |
| Genotipo..... | 49 |
| Material Biológico | 49 |
| Ensayos de resistencia para el establecimiento de dosis de selección..... | 50 |
| Transformación | 51 |
| Caracterización de Plantas Transformadas..... | 53 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 55 |
| Ensayos de resistencia | 55 |
| Ensayo de expresión estable del gen GUS | 56 |
| Obtención de plantas que acumulan trehalosa | 58 |
| CONCLUSIÓN | 61 |
| LITERATURA CITADA | 62 |
| APÉNDICES | 65 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----------|
| Cuadro 1. Composición química (%) de frutos de tomate (Blancard, 2011). | 6 |
| Cuadro 2. Métodos de transformación genética en plantas..... | 12 |
| Cuadro 3. Ingeniería Genética en Tomate (Gerszberg <i>et al.</i> , 2014). | 13 |
| Cuadro 4. Cantidad de Reguladores de Crecimiento en los diferentes medios | 29 |
| Cuadro 5 Composición de los medios de enraizamiento evaluados..... | 30 |
| Cuadro 6. Porcentaje de formación de raíz de cinco medios de cultivo..... | 37 |
| Cuadro 7. Concentraciones de agentes selectivos para la evaluación de resistencia en explantes de hoja de tomate..... | 50 |
| Cuadro 8. Eficiencia de transformación de tomate de cuatro construcciones... | 58 |
| Cuadro 9. Cuadrados medios del análisis de varianza para organogénesis. ... | 65 |
| Cuadro 10. Cuadrados medios del análisis de varianza para enraizamiento. .. | 65 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Biosíntesis de trehalosa. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> produce trehalosa en el citosol a través de la acción secuencial de las proteínas Tps1p y Tps2p. (Singer & Lindquist, 1998). | 16 |
| Figura 2. (A) Las altas temperaturas causan desnaturalización de proteínas, al asociarse forman agregados. (B) Síntesis de trehalosa durante el choque térmico estabiliza las proteínas y suprime la agregación de las ya desnaturalizadas. (C) Degradación rápida de trehalosa después del choque térmico. Durante la recuperación, las chaperonas moleculares promueven la reactivación de sustratos desnaturalizados no agregados. (D) La persistencia de altos niveles de trehalosa interfiere con la reactivación de sustratos desnaturalizados, explicando la necesidad de degradar trehalosa. (Singer & Lindquist, 1998)..... | 17 |
| Figura 3. Efecto del origen del explante en el A) Número de brotes, B) Longitud de brote y C) Expansión del explante; 1 plántula proveniente de invernadero, 2 plántula proveniente de cultivo <i>in vitro</i> ; diferente letra en las medias muestran diferencias estadísticas (Tukey $\alpha < 0.05$). | 33 |
| Figura 4. Brotes del genotipo L3 de tomate obtenidos por organogénesis 28 DDE; 1: Origen de explante de plántula proveniente de invernadero; 2: Origen de explante de plántula <i>in vitro</i> ; MR: Medio de Regeneración..... | 34 |
| Figura 5. Efecto del medio de regeneración en el A) Número de brotes, B) Longitud de brote y C) Expansión del explante; 1 plántula proveniente de invernadero, 2 plántula proveniente de cultivo <i>in vitro</i> ; diferente letra en las medias muestran diferencias estadísticas (Tukey $\alpha < 0.05$). | 35 |
| Figura 6. Efecto del tratamiento (origen del explante x composición del medio de cultivo) en el A) Número de brotes, B) Longitud de brote y C) Expansión del explante; 1 plántula proveniente de invernadero, 2 plántula proveniente de cultivo | |

| | |
|--|----|
| <i>in vitro</i> ; diferente letra en las medias muestran diferencias estadísticas (Tukey $\alpha < 0.05$). | 36 |
| Figura 7. Efecto del medio de enraizamiento en el, número (A) y longitud (B) de raíces; diferente letra en las medias muestran diferencias estadísticas (Tukey $\alpha < 0.05$). | 38 |
| Figura 8. Desarrollo de raíz de brotes de tomate en diferentes medios a los 28 DDE. | 39 |
| Figura 9. Proceso de regeneración por organogénesis directa a partir de explantes de hoja de tomate L3; A: desarrollo de callo y brotes a 14 DDE; B: desarrollo de callo y brotes a 28 DDE; C: Brote en ME, se observa desarrollo de parte aérea y raíz a 21 DDE; D: Planta completa de tomate a 28 DDE en ME; E: Planta de tomate aclimatada con desarrollo normal a los 30 DDE en sustrato y solución nutritiva. | 40 |
| Figura 10. Expresión del gen GUS en explantes de tomate L3 a 28 DDE en medio selectivo con 20 mg·L ⁻¹ de kanamicina. | 57 |
| Figura 11. Proceso de transformación genética por agroinfección en tomate L3. A: Co-cultivo de explantes de hoja de tomate; B: Regeneración por organogénesis directa de brotes resistentes al agente selectivo 28 DDE; C: Enraizamiento de brotes resistentes al agente selectivo; D: Aclimatación de plantas resistentes al agente selectivo; E: Posibles plantas transformadas adaptadas en invernadero; F: Etapa de floración de las plantas adaptadas en invernadero; G: Fructificación de las posibles plantas transformadas. | 59 |
| Figura 12. Fragmento amplificado (<i>nptII</i>), de plantas transformadas de tomate | 60 |
| Figura 13. Vector 35SGUS-INT con el gen <i>uidA</i> con el promotor CaMV35S y un intrón de 190 pb (Vancanneyt <i>et al.</i> , 1990) | 66 |
| Figura 14. Vector pBin19 con el gen de selección <i>nptII</i> y los genes <i>Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS</i> , donde RD29 es el promotor inducible y B) <i>35S::ScTPS1TPS2::NOS</i> , donde 35S es el promotor constitutivo..... | 67 |
| Figura 15. Vector pTF101.1 con el gen de selección <i>bar</i> y los genes <i>Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS</i> , donde RD29 es el promotor inducible y B) <i>35S::ScTPS1TPS2::NOS</i> , donde 35S es el promotor constitutivo..... | 68 |

Figura 16. Explantes de hoja de Tomate L3 cultivados durante 21 días en medio de regeneración con Kanamicina; T0: Testigo; T1: 10 mg·L⁻¹; T2: 20 mg·L⁻¹; T3: 30 mg·L⁻¹; T4: 40 mg·L⁻¹; T5: 50 mg·L⁻¹; T6: 60 mg·L⁻¹; T7: 80 mg·L⁻¹; T8: 100 mg·L⁻¹..... 69

Figura 17. Explantes de hoja de Tomate L3 cultivados durante 21 días en medio de regeneración adicionado con Fosfotricina; T0: Testigo; T1: 0.1 mg·L⁻¹; T2: 0.2 mg·L⁻¹; T3: 0.3 mg·L⁻¹; T4: 0.4 mg·L⁻¹; T5: 0.5 mg·L⁻¹; T6: 0.6 mg·L⁻¹; T7: 0.7 mg·L⁻¹; T8: 0.8 mg·L⁻¹; T9: 0.9 mg·L⁻¹; T10: 1.0 mg·L⁻¹; T11: 1.5 mg·L⁻¹ 70

Figura 18. Explantes de hoja de Tomate L3 cultivados durante 21 días en medio de regeneración adicionado con Sorbitol; T0: Testigo; T1: 100 mM de Sorbitol; T2: 200 mM de Sorbitol; T3: 300 mM de Sorbitol; T4: 400 mM de Sorbitol; T5: 500 mM de Sorbitol; T6: 600 mM de Sorbitol; T7: 700 mM de Sorbitol; T8: 800 mM de Sorbitol..... 71

Figura 19. Cróquis de localización de plantas posiblemente transformadas en el invernadero. Nomenclatura: Gen de selección, gen de interés, número de evento. 74

APÉNDICES

| | |
|---|-----------|
| Apéndice 1. Análisis de varianza de la regeneración de tomate. | 65 |
| Apéndice 2. Construcciones utilizadas en la transformación genética de tomate. | 66 |
| Apéndice 3. Ensayos de resistencia para el establecimiento de dosis de selección. | 69 |
| Apéndice 4. Aislamiento de ADN genómico de tejido vegetal. | 72 |
| Apéndice 5. Distribución de plantas en el invernadero. | 74 |

A Dios

*A mis padres,
por enseñarme a caminar la vida sin miedo.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Instituto de Horticultura por la facilidades otorgadas.

Al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo por su valiosa dirección, por la confianza depositada en mi y por su apoyo en la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, por su comprensión, tiempo, paciencia, sus acertados consejos y por su total apoyo en el desarrollo de la tesis.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por sus aportes y facilidades otorgadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Con infinito amor a mis padres Bonifacio Romero y Silvia Escobedo, por ser el pilar fundamental en mi vida, por contribuir con sus constantes consejos al logro de mis metas y objetivos.

A mis hermanos en especial a Gicela y Missael por brindarme siempre su apoyo incondicional y por ser mi fuente de inspiración.

Al M.C. Roberto Cid por su invaluable amistad y compañía, por compartirme sus conocimientos y hacer de ésta una experiencia muy especial.

A todos mis compañeros y amigos.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

| | |
|---------------------|---------------------------------|
| Nombre | Silvia Yazareth Romero Escobedo |
| Fecha de nacimiento | Septiembre 02 1991 |
| Lugar de nacimiento | San Gabriel Chilac, Puebla. |
| CURP | ROES910902MPLMSL03 |
| Cédula profesional | 09258686 |

Desarrollo académico

| | |
|--------------|--|
| Licenciatura | Agrónomo en Horticultura Protegida, Universidad Autónoma Chapingo, 2014. |
|--------------|--|

RESUMEN GENERAL

Transformación genética de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con genes de biosíntesis de trehalosa

La transformación de plantas cultivadas como el tomate con genes de biosíntesis de trehalosa permite obtener plantas tolerantes a sequía, frío y patógenos. El objetivo en esta investigación fue desarrollar los protocolos de: 1) regeneración por organogénesis directa a partir de explantes de hoja y 2) transformación por agroinfección con la finalidad de incorporar genes de biosíntesis de trehalosa, ambos para una línea experimental (L3) de tomate. Después de 30 días, se obtuvieron 7 brotes por explante de lámina foliar provenientes de plántulas cultivadas *in vitro*, en medio de cultivo MS suplementado con vitaminas Gamborg (MSG) más $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA y $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIA (MR). Los brotes se enraizaron en medio MSG más $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB (ME) y se obtuvo una eficiencia del 100 % en la aclimatación. Para la transformación se utilizó la cepa de *Agrobacterium* C58C1 con vectores que contienen genes de selección para resistencia a kanamicina (pBIN19) ó fosfotricina (pTF101.1) con los genes quiméricos *35S::ScTPS1TPS2::NOS* ó *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS*. La densidad del cultivo fue de $A_{600} = 0.1$ en medio de infección con $100 \mu\text{M}$ de acetosiringona. El cocultivo fue de 48 horas en MR no selectivo y la selección se realizó en MR selectivo con $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de kanamicina ó $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfotricina. Se obtuvieron 50 plantas resistentes a kanamicina y 59 a fosfotricina. En las primeras se identificaron mediante PCR, 9 plantas con el gen *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS* y 2 con *35S::ScTPS1TPS2::NOS*, con una eficiencia de transformación promedio de 2.75 %.

PALABRAS CLAVE: *A. tumefaciens*, organogénesis, regeneración, *Solanum lycopersicum*, transformación, trehalosa.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Silvia Yazareth Romero Escobedo

Director de tesis: Dr. José Óscar Mascorro Gallardo

GENERAL ABSTRACT

Genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with trehalose biosynthesis genes

Transformation of cultivated plants such as tomato with trehalose biosynthesis genes allows obtaining plants tolerant to drought, cold and pathogens. The aim of this research was to develop protocols for: 1) regeneration by direct organogenesis from leaf explants and 2) transformation by agroinfection in order to incorporate trehalose biosynthesis genes, both for a tomato experimental line (L3). After 30 days, 7 shoots per explant of foliar leaf from *in vitro* cultured seedlings were obtained in MS culture medium supplemented with Gamborg vitamins (MSG) plus 1.0 mg·L⁻¹ BA and 0.2 mg·L⁻¹ AIA (MR). Shoots were rooted in MSG medium with 0.2 mg·L⁻¹ AIB (ME) and 100 % acclimatization efficiency was obtained. To promote transformation the C58C1 *Agrobacterium* strain was used with vectors containing selection genes for resistance to kanamycin (pBIN19) or phosphinothricin (pTF101.1) with the chimeric genes 35S::ScTPS1TPS2::NOS or Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS. Culture density was A600 = 0.1 in infection medium with 100 µM acetosyringone. Co-culture was 48 hours in non-selective MR and selection was performed in selective MR with 20 mg·L⁻¹ kanamycin or 0.3 mg·L⁻¹ phosphonitricin. 50 plants resistant to kanamycin and 59 to phosphonitricin were obtained in this research. In the first group, 9 plants were identified with the Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS gene and 2 with the 35S::ScTPS1TPS2::NOS gene by PCR, with an average transformation efficiency of 2.75 %.

Keywords: *A. tumefaciens*, organogenesis, *Solanum lycopersicum*, regeneration, transformation, trehalose.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Silvia Yazareth Romero Escobedo

Advisor: Dr. José Óscar Mascorro Gallardo

INTRODUCCIÓN GENERAL

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es el segundo cultivo hortícola de importancia mundial, sólo superado por la papa y gracias a sus características, se adapta a casi todas las regiones climáticas del mundo (FAOSTAT, 2016).

En México el 70 % de la agricultura protegida está dedicada a la producción de esta hortaliza, pues son en estos sistemas en que se alcanzan los requerimientos de calidad para exportación, sin embargo, la producción está afectada por varios factores bióticos, causados por la acción de otros seres vivos (animales, plantas, bacterias, hongos, etc.) y abióticos que incluyen múltiples factores de estrés tales como alta o baja temperatura, luz excesiva, sequía, anegamiento, lesiones, exposición al ozono, la radiación UV, choque osmótico y salinidad (Pandey *et al.*, 2011), que se traducen en pérdidas para el agricultor.

Ante este tipo de factores adversos, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos, los cuales protegen a las plantas a través de diferentes procesos. Una respuesta común de los organismos al estrés abiótico es la acumulación de azúcares y de otros solutos. Estos compuestos sirven como osmoprotectores y, en algunos casos, estabilizan biomoléculas bajo condiciones de estrés (Hare *et al.*, 1998).

La trehalosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa que se ha encontrado en bacterias (*E.coli*), levaduras (*S. cerevisiae*) y plantas (*S. lepidophylla*), de acuerdo a varias investigaciones, es sintetizada por las enzimas trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) y trehalosa 6 fosfato fosfatasa (TPP) (Cabib & Leloir, 1958 citado por Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005).

La trehalosa causa un efecto protector sobre las enzimas y membranas celulares, evitando su desnaturalización, durante la presencia de sequías extremas (Crowe *et al.*, 1984; citado por Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005). Adicionalmente, el intermediario trehalosa 6-fosfato y/o la trehalosa misma, inducen genes que contribuyen en la adaptación a diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico (Schluepmann *et al.*, 2004).

Gracias a la tecnología de ADN recombinante se ha logrado obtener las regiones codificadoras de ambas enzimas, realizar una fusión traduccional (TPS – TPP) e insertar este gen bifuncional en el genoma de especies vegetales de importancia agronómica (Seo *et al.*, 2000; Garg *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2007). Siendo el tomate una de ellas, la modificación de plantas con dicho gen, abre la posibilidad de obtener materiales resistentes a estrés abiótico y de la misma forma expandir la agricultura a territorios con condiciones poco favorables.

OBJETIVOS

Objetivo General

Adecuar una metodología para la integración del gen bifuncional *ScTPS1-TPS2* en el genoma del tomate.

Objetivos Particulares

Establecer el protocolo de regeneración *in vitro* para tomate.

Adecuar el protocolo de transformación genética de tomate mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Identificar y conservar genéticamente los eventos transformados.

Caracterización preliminar de los eventos obtenidos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del cultivo de Tomate

El tomate, originario de América del Sur y domesticado en México, en los últimos años ha sido objeto de múltiples investigaciones debido a su gran valor nutricional (Cuadro 1), aunado al descubrimiento de actividades antioxidantes del licopeno útiles en la prevención de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Palomo *et al.*, 2010), lo que ha impactado económicamente, pues la producción a nivel mundial ha incrementado considerablemente en las últimas décadas (Blancard, 2011).

Cuadro 1. Composición química (%) de frutos de tomate (Blancard, 2011).

| | | |
|---|----|-----------|
| Agua | | 95 |
| Azúcares (Glucosa, fructosa) | 55 | |
| Ácidos (cítrico, málico) | 12 | |
| Sales minerales | 7 | |
| Pigmentos carotenoides* , compuestos volátiles, vitaminas** | 5 | 5 |
| Materias secas insolubles (celulosa, materias pécticas) | 21 | |

* Pigmentos amarillo naranja (betacaroteno = provitamina A) o rojo (licopeno).

** Vitaminas C (18 a 25 mg·100 g⁻¹ de fruto fresco), B, K, E.

En 2013 la producción mundial fue de 164.5 millones de toneladas, en una superficie de 4.7 millones de hectáreas, lo que representó 15 % de la producción mundial de hortalizas. Los principales productores de la hortaliza son China, India, USA, Turquía y Egipto, destacando el primero, cuya cosecha representa casi una de cada tres toneladas distribuidas en el mundo; su valor en el mercado fue de 57 mil millones de dólares (FAOSTAT, 2016).

En el caso de México, ocupa el décimo lugar en producción, con poco más de tres millones de toneladas producidas en 2015 y el segundo lugar en

exportaciones con el 21.5 % de participación, superando los 1600 millones de dólares de valor en el mercado (SAGARPA, 2016).

Además de la especie cultivada comercialmente, se conocen alrededor de 12 especies silvestres de tomate. Estas especies han desarrollado resistencias a diferentes patógenos y condiciones abióticas adversas, siendo esta biodiversidad una fuente poco aprovechada para el enriquecimiento de las bases genéticas del cultivo para mejorar la productividad, calidad y/o la adaptación (Gur & Zamir, 2004).

Como resultado de las nuevas exigencias agrícolas e industriales y de problemas en su producción, en los últimos años se ha dado un constante reemplazo de variedades de tomate por otras con mejores características, lo que ha hecho difícil conocer la totalidad de variedades en uso actualmente (Escalona *et al.*, 2009).

Biotecnológicamente, el tomate ha cobrado importancia por poseer características que facilitan su estudio, es considerada una planta modelo para desarrollo de fruto; su genoma completo fue secuenciado en el año 2012 (variedad Heinz 1706), encontrándose aproximadamente 35,000 genes en 900 millones de pares de bases (The Tomato Genome Consortium *et al.*, 2012). Hasta la fecha se ha secuenciado el genoma de 360 accesiones de tomate en busca de información acerca de su evolución y domesticación (Lin *et al.*, 2014).

Propagación *in vitro* de Tomate

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas diseñadas para el crecimiento y la multiplicación de células, tejidos y órganos usando soluciones nutritivas en un ambiente aséptico y controlado (Street, 1977; Calva & Pérez, 2005; Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

Esta herramienta biotecnológica permite la regeneración de plantas genéticamente idénticas a partir del cultivo de células somáticas *in vitro* (Paliwal, 2001). Las células vegetales somáticas son más susceptibles de ser reprogramadas que las células aisladas de tejidos animales. En condiciones adecuadas, incluso las células vegetales más especializadas pueden inducirse a expresar genes que sólo se expresan al inicio del proceso de morfogénesis. Como resultado de tal cambio en el patrón de expresión génica, pueden formarse nuevos tipos celulares, diferentes del original (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

El fenómeno es conocido como totipotencia celular y se define como la capacidad de las células de dividirse, producir células diferenciadas características de los órganos y regenerarse en una planta entera (Iliev *et al.*, 2010), sin embargo, esto solo está presente en las células producidas durante las primeras rondas de división; una vez que las células se han comprometido a formar estructuras especializadas, la totipotencia tiende a desaparecer (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

El cultivo de tejidos y células vegetales es utilizado para la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva de variedades de interés comercial, la selección y variación somaclonal en la mejora genética y es una técnica necesaria para llevar a cabo la transformación genética de plantas (Paliwal, 2001).

Organogénesis directa

Existen dos vías para regenerar plántulas *in vitro*: la embriogénesis somática (directa o indirecta) y la organogénesis, las cuales dependen de la respuesta de las plantas a las fitohormonas adicionadas al medio de cultivo (Duclercq *et al.*, 2011).

Para la ingeniería genética la vía de la organogénesis directa es la más útil ya que minimiza la variación somaclonal al no depender de la formación previa de un callo desdiferenciado y por tanto la mayoría de las investigaciones se basan en ésta, encontrándose el uso de diferentes tipos de medios (MS o B5), fitohormonas (AIA, ANA, 2,4-D, ZT, 6-BAP, etc.), origen del explante y condiciones de establecimiento (Gerszberg *et al.*, 2014).

De acuerdo a Davey y Anthony (2010), la inducción de brotes generalmente se obtiene empleando citocininas (BAP: 0.01 – 5.0 mg·L⁻¹; 2-iP: 0.01 – 10.0 mg·L⁻¹; zeatina: 2.0 – 15.0 mg·L⁻¹; TDZ: 0.01 – 10.0 mg·L⁻¹; sulfato de adenina: 40.0 – 120.0 mg·L⁻¹) en combinación con bajas concentraciones de auxinas (ANA, AIA o AIB de 0.01 – 0.1 mg·L⁻¹). La relación y cantidad de fitohormonas son específicas para cada genotipo debido a la gran diversidad de la especie, lo que ha dificultado la estandarización en los métodos de regeneración de planta *in vitro* (Namitha & Negi, 2013).

Enraizamiento

Las plantas micropropagadas que se originan a través de la embriogénesis somática o de una vía organogénica, requieren de un sistema de raíces completamente desarrollado antes del trasplante *ex vitro* para soportar el estrés ambiental externo. El enraizamiento de los brotes puede tener lugar *in vitro*, o tras el trasplante como parte del proceso de aclimatación (Davey & Anthony, 2010).

La formación adventicia de raíces varía y depende del genotipo y de los métodos culturales. La relación entre la auxina y las citoquininas en el medio puede determinar el tipo de respuesta morfogénica. Normalmente, se requieren niveles elevados de auxina para promover el enraizamiento (George *et al.*, 2008).

La utilización exógena de auxinas naturales como ácido 3-indolacético (AIA) o sintéticas como ácido naftalenacético (ANA) y ácido 3-indolbutírico (AIB), permite manejar esta fase estimulando células indiferenciadas que promueven la iniciación del enraizamiento o emergencia de raíces adventicias (Woodward & Bartel 2005; Flores *et al.*, 2009; Uribe *et al.*, 2012). Así como reducir los componentes del medio de cultivo a la mitad, el manejo de la oscuridad durante el cultivo y la inoculación con hongos micorrízicos (Davey & Anthony, 2010).

Aclimatación

Esta última etapa es fundamental en un sistema de micropropagación *in vitro* porque dependen de ella la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas, pues presentan un comportamiento diferente a las cultivadas tradicionalmente al sufrir cambios morfológicos y fisiológicos que ocasionan pérdidas al momento del trasplante (Medina *et al.*, 2004).

Por esta razón, es necesaria la aplicación de técnicas de adaptación al pasar de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*, como exponer a las plantas a condiciones de semi – estrés por un periodo corto de tiempo (George *et al.*, 2008), generalmente las plantas se trasplantan en recipientes plásticos con suelo o sustrato inerte (turba, perlita, vermiculita o una mezcla de las mismas), cubriendo los brotes con plástico transparente para mantener la humedad del suelo y del aire (Davey & Anthony, 2010). La aclimatación permitirá que la planta alcance un crecimiento autotrófico en ambientes de cultivo convencionales (Preece & Sutter 1991, Medina *et al.*, 2004).

Durante esta etapa, se modifican las características anatómicas de los brotes, la cutícula de las hojas y las paredes celulares del tejido de soporte se hacen más gruesas debido al agrandamiento de las células de parénquima en empalizada (Fabbri *et al.*, 1986). En cuanto a las raíces, el sistema vascular se vuelve más prominente (Jambor *et al.*, 2001; George *et al.*, 2008). En la primera hoja

desarrollada de una planta recién aclimatada cultivada *in vitro*, el parénquima se encuentra más desarrollado, contiene menos filas de células y aire, sin embargo las hojas que se forman completamente después de la aclimatación se vuelven similares a las de las plantas cultivadas convencionalmente (George *et al.*, 2008).

Ingeniería Genética en Tomate

La Ingeniería Genética tiene como objetivo la producción de genotipos que expresan características de interés, mediante la integración de segmentos de ADN foráneo (especies vegetales, hongos, virus, bacterias o animales) en el genoma original (Díaz & Chaparro-Giraldo, 2012).

En la actualidad se utilizan diferentes sistemas de transformación, de acuerdo a Díaz y Chaparro-Giraldo (2012) se clasifican en métodos directos e indirectos, de acuerdo con el mecanismo utilizado para transferir el material genético, los directos se basan en el uso de procedimientos de naturaleza química, fisicoquímica y mecánica; los indirectos se basan en la utilización de vectores biológicos que utilizan sus características naturales de patogenicidad en plantas (Cuadro 2).

En tomate se ha optado por utilizar métodos indirectos, principalmente por *Agrobacterium tumefaciens* (Gerszberg *et al.*, 2014), la primera transformación de este tipo fue reportada en 1986 (McCormick *et al.*, 1986) y desde entonces, se han desarrollado varios protocolos de transformación para diferentes cultivares de tomate, ya que el éxito de la transformación genética de plantas por esta vía depende del tipo de cepa, la concentración de acetosiringona, el tiempo de la infección, la temperatura y el tiempo de co-cultivo, entre otras cosas (Ramírez *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Métodos de transformación genética en plantas

| | |
|---------------------------|---|
| Métodos Directos | <p>Liposomas</p> <p>Biobalística</p> <p>Electroporación</p> <p>Sonicación</p> <p>Mediante compuestos químicos</p> <p>Fibra de Carburo de Silicona</p> <p>Microinyección</p> <p>Microláser</p> <p>Protoplastos</p> <p>Polinización</p> |
| Métodos Indirectos | <p>Mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i></p> <p>Vectores virales</p> |
| Métodos Combinados | <p>Transformación de polen mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i></p> <p>Transformación por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediante Biobalística</p> <p>Uso de Fibras de carburo de Silicona para la transformación mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.</p> |

(Adaptado de Danilova, 2007 y Diaz & Chaparro-Giraldo, 2012)

Aplicaciones de la Ingeniería Genética en Tomate

A través de varios años de investigación, se han logrado producir “cultivos mejorados” en ciertas características de interés organoléptico y nutricional así como para resistir condiciones ambientales desfavorables, tales como las malas condiciones del suelo, las sequías y temperaturas extremas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Ingeniería Genética en Tomate (Gerszberg *et al.*, 2014).

| Característica | Gen | Referencia |
|--------------------------------------|---|---|
| Sabor y aroma | Thaumatococin, <i>GES</i> , <i>LeAADC1A</i> , <i>LeAADC2</i> | Bartoszewski <i>et al.</i> (2003); Davidovich-Rikanati <i>et al.</i> (2007); Mathieu <i>et al.</i> (2009); Tieman <i>et al.</i> (2006) |
| Tamaño | <i>fw2.2</i> | Cong & Tanksley (2006); Liu <i>et al.</i> (2003) |
| Firmeza | B-galactosidasa, (expansina), <i>EXP1A</i> | Brummell <i>et al.</i> (1999); Smith <i>et al.</i> (2002) |
| Partenocarpia | <i>Arf8</i> ; <i>IAA9</i> ; <i>SIARF7</i> , <i>SI-IAA27</i> | Bassa <i>et al.</i> (2012); de Jong <i>et al.</i> (2011); Goetz <i>et al.</i> (2007); Wang <i>et al.</i> (2005) |
| Contenido de Sólidos Solubles | <i>Ln5</i> (invertasa 5) | Zanor <i>et al.</i> (2009) |
| Contenido de carotenoides | <i>Dxs</i> , <i>CrtB</i> , <i>CrtR-b2</i> (carotene beta hydroxylase), <i>CrtI</i> , <i>CrtY</i> , <i>PSY-1</i> , <i>Cyc-B</i> , <i>LCY-B</i> , <i>CHY-B</i> , <i>CRY-2</i> , <i>DET-1</i> , <i>COP1LIKE</i> , <i>CUL4</i> (Cullin4), <i>FIBRILLIN</i> , <i>spermidine synthase</i> | Apel & Bock (2009); D'Ambrosio <i>et al.</i> (2011); Davuluri <i>et al.</i> (2005); Dharmapuria <i>et al.</i> (2002); Enfissi <i>et al.</i> (2005); Fraser <i>et al.</i> (2002), (2007); Giliberto <i>et al.</i> (2005); Liu <i>et al.</i> (2004); Neily <i>et al.</i> (2011); Simkin <i>et al.</i> (2007); Wurbs <i>et al.</i> (2007); Wang <i>et al.</i> (2008) |
| Contenido de Flavonoides | <i>CHI</i> , <i>CHS</i> , <i>CHI</i> , <i>F3H</i> , <i>FLS</i> , <i>STS</i> , <i>CHR</i> , <i>FNSII</i> , <i>MYB12</i> , <i>S1MYB12</i> , <i>Del</i> , <i>Ros</i> , <i>ANT1</i> , <i>AN2</i> | Adato <i>et al.</i> (2009); Ballester <i>et al.</i> (2010); Bassolino <i>et al.</i> (2013); Butelli <i>et al.</i> (2008); Colliver <i>et al.</i> (2002); Maligeppagol <i>et al.</i> (2013); Muir <i>et al.</i> (2001); Schijlen <i>et al.</i> (2006); Schreiber <i>et al.</i> (2012) |

| | | |
|-------------------------------------|---|--|
| Ácidos Carboxílicos | <i>SlAco3b</i> | Morgan <i>et al.</i> (2013) |
| Contenido de Ácido Ascórbico | <i>GalLDH, GME, GCHI, ADCS</i> | de la Garza <i>et al.</i> (2004), (2007); García <i>et al.</i> (2009); Gilbert <i>et al.</i> (2009); Zhang <i>et al.</i> (2011); Waller <i>et al.</i> (2010) |
| Estrés Abiótico | <i>GlyI, GlyII, cAPX, SpMPK1, SpMPK2, SpMPK3, Osmotin, HMA4 (P1B-ATPase), SAMDC, mtlD, codA, AVP1, PgNHX1, BcZAT12, TaNHX2, tas14, PtADC, MdVHA-B</i> | Álvarez-Viveros <i>et al.</i> (2013); Barabasz <i>et al.</i> (2012); Bhaskaran & Savithramma (2011); Chen <i>et al.</i> (2009a); Goel <i>et al.</i> (2011); Hu <i>et al.</i> (2012); Khare <i>et al.</i> (2010); Li <i>et al.</i> (2013); Mishra <i>et al.</i> (2012); Muñoz-Mayor <i>et al.</i> (2012); Park <i>et al.</i> (2005); Patade <i>et al.</i> (2013); Rai <i>et al.</i> (2013); Wang <i>et al.</i> (2006), (2011); Yarra <i>et al.</i> (2012) |
| Estrés biótico | <i>AFP, amiR-AV1-3, hCAP18/LL-37, Bs2, CHI, alfAFP, ech42, Cry2Ab, LF, Cry1Ac</i> | Chen <i>et al.</i> (2009b); El-Siddig <i>et al.</i> (2011); Herbette <i>et al.</i> (2011); Horvath <i>et al.</i> (2012); Jung (2013); Lee <i>et al.</i> (2002); Ma <i>et al.</i> (2011); Rashid and Bal (2011); Saker <i>et al.</i> (2008), (2011); Shah <i>et al.</i> (2010); Vu <i>et al.</i> (2013) |
| Proteínas Farmacéuticas | <i>PfCP-2.9, BACE1, IL-12; F1-V, sDSP, hlgA_2A1, Ta1, miraculin, hFIX, AGAP, Hiv-1 Tat, HBsAg</i> | Alvarez <i>et al.</i> (2006); Alvarez & Cardineau (2010); Baesi <i>et al.</i> (2011); Biswas <i>et al.</i> (2012); Chen <i>et al.</i> (2009a); Cueno <i>et al.</i> (2010); Elías-López <i>et al.</i> (2008); Hirai <i>et al.</i> (2010); Juárez <i>et al.</i> (2012); Kantor <i>et al.</i> (2013); Kato <i>et al.</i> (2011); Kim <i>et al.</i> (2012); Kurokawa <i>et al.</i> (2013); Lai <i>et al.</i> (2009); Li <i>et al.</i> (2011); Lou <i>et al.</i> (2007); Ramirez <i>et al.</i> (2007); Soria-Guerra <i>et al.</i> (2007), Zhang <i>et al.</i> (2011); Youm <i>et al.</i> (2008) |

Generalidades de la Trehalosa

La trehalosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa (Thevelein, 1995), es altamente soluble, pero químicamente no reactivo debido a su naturaleza no reductora, por lo que es compatible con el metabolismo celular incluso a altas concentraciones (Lunn *et al.*, 2014). Juega un importante papel fisiológico como un protector al estrés abiótico, así como para el almacenamiento de carbono y el transporte en un gran número de organismos incluyendo bacterias, levaduras e invertebrados (Elbein *et al.*, 2003).

La biosíntesis de trehalosa en plantas consta de dos pasos enzimáticos (Figura 1), en el primero la sintetasa de trehalosa-6-fosfato (TPS) cataliza la transferencia de glucosa a partir de UDP-glucosa a glucosa 6-fosfato (G6P) para producir trehalosa-6-fosfato (T-6-P). Posteriormente, T-6-P es desfosforilado en trehalosa por la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) (Cabib & Leloir, 1958; Vandesteene *et al.*, 2012). Ambas enzimas están codificadas por los genes TPS1 y TPS2, respectivamente. En sentido opuesto, la hidrólisis de la trehalosa en sus dos moléculas de glucosa es llevada a cabo por la trehalasa (Müller *et al.*, 2001).

De 1984 (Crowe *et al.*, 1984) a la fecha se han publicado distintos informes que demuestran los efectos protectores de la trehalosa contra diversos tratamientos de estrés (Soto, *et al.*, 1999) como el calor (De Virgilio *et al.*, 1993; Nwaka *et al.*, 1995), deshidratación (Gadd, *et al.*, 1987), la congelación (Hino *et al.*, 1990), y el estrés hiperosmótico (Hazel *et al.*, 1997).

La trehalosa causa un efecto protector sobre las enzimas y membranas celulares, evitando su desnaturalización, durante la presencia de sequías extremas (Crowe *et al.*, 1998). Las proteínas mantienen su actividad en presencia de trehalosa, ya que ésta reemplaza al agua encapsulándola y protegiendo así su estructura terciaria y su actividad, en cuanto a las membranas, interactúa con éstas favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando así la

fusión, la separación de fases y el rompimiento de las membranas (Lins *et al.*, 2004; Mascorro-Gallardo, 2005).

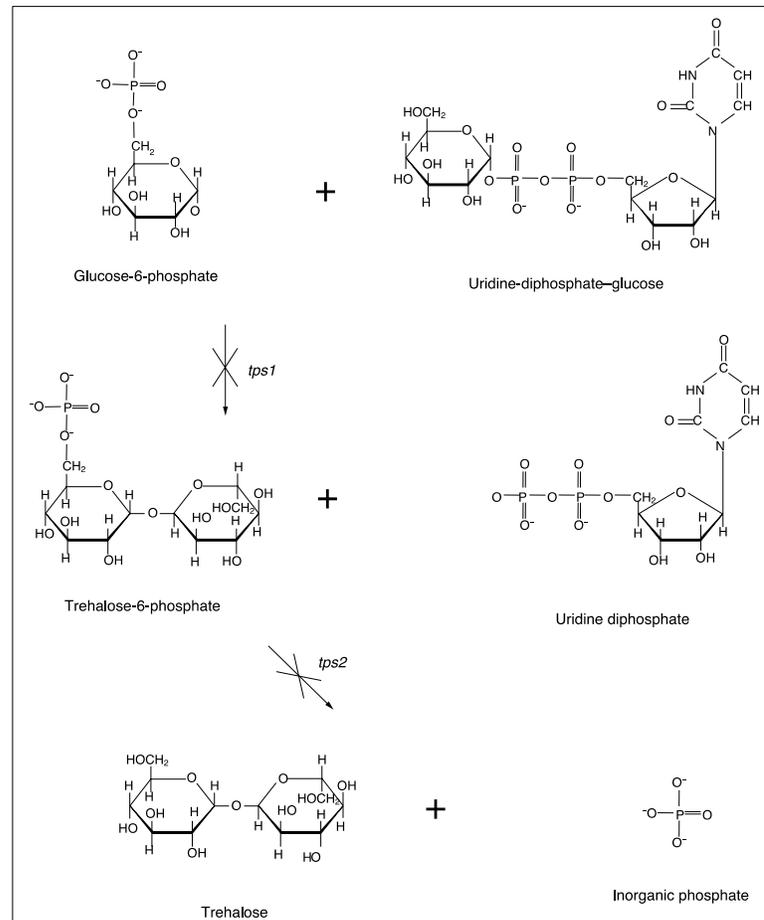


Figura 1. Biosíntesis de trehalosa. *Saccharomyces cerevisiae* produce trehalosa en el citosol a través de la acción secuencial de las proteínas Tps1p y Tps2p. (Singer & Lindquist, 1998).

La exposición a temperaturas extremas desencadena respuestas fisiológicas y bioquímicas en las plantas, incluyendo la regulación de transcritos y proteínas, cambios en el contenido de metabolitos primarios y secundarios, azúcares, lípidos y la modificación de la composición y estructura de la membrana (Sanghera *et al.*, 2011; Lunn *et al.*, 2014).

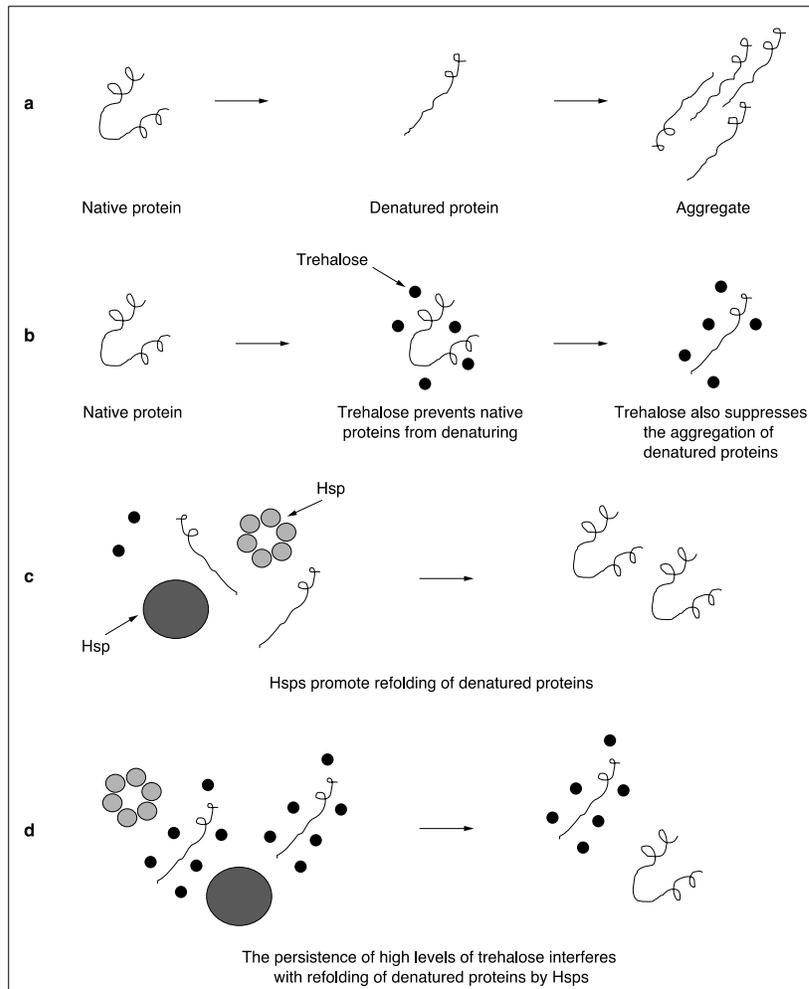


Figura 2. (A) Las altas temperaturas causan desnaturalización de proteínas, al asociarse forman agregados. (B) Síntesis de trehalosa durante el choque térmico estabiliza las proteínas y suprime la agregación de las ya desnaturalizadas. (C) Degradación rápida de trehalosa después del choque térmico. Durante la recuperación, las chaperonas moleculares promueven la reactivación de sustratos desnaturalizados no agregados. (D) La persistencia de altos niveles de trehalosa interfiere con la reactivación de sustratos desnaturalizados, explicando la necesidad de degradar trehalosa. (Singer & Lindquist, 1998).

La función de la trehalosa contra el choque térmico se debe a la interacción con las proteínas Hsps (Heat Shock Proteins) (Figura 2). La trehalosa impide que las proteínas nativas se desnaturalicen a altas temperaturas. Aquellas proteínas desplegadas están ligadas a Hsp, suprimen su agregación y promueven su replegamiento adecuado. La trehalosa también puede estabilizar esos sustratos y, de este modo, reducir la agregación cuando la maquinaria de reparación de proteínas está abrumada. Sin embargo, la estabilización de las proteínas desnaturalizadas por la trehalosa puede interferir con su posterior reactivación y, a menos que la trehalosa se degrade rápidamente después del choque térmico, el disacárido puede impedir la capacidad de Hsps para resolver rápidamente el daño inducido por calor a las proteínas celulares (Singer & Lindquist, 1998).

Asimismo, se ha estudiado recientemente el papel de la trehalosa en las interacciones de las plantas con bacterias, hongos, insectos y plantas parásitas, en la que se considera la participación del metabolismo de la trehalosa y la señalización. Hay tres aspectos en las interacciones planta-patógeno: (i) El metabolismo de la trehalosa del patógeno bacteriano o fúngico, (ii) la comunicación entre el patógeno y la planta, y (iii) el metabolismo de trehalosa en la planta.

El suministro de trehalosa exógenamente puede actuar como señal de ataque de patógenos, induciendo las respuestas de defensa de la planta así como cambios en la expresión de factores de transcripción relacionados con el estrés y genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno. Sin embargo, la producción de trehalosa también es característica de muchos microbios beneficiosos, lo que complica su utilización como señalizador (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 2010; Lunn *et al.*, 2014).

Genes TPS en plantas

Hasta hace algún tiempo se pensaba que la mayoría de las especies vegetales no acumulaban trehalosa, con excepción de *Selaginella lepidophylla*, que es altamente tolerante a la desecación. Se han descubierto 20 y 21 genes

homólogos para la biosíntesis de trehalosa en *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* respectivamente (Avonce *et al.*, 2010), lo que apunta a que el metabolismo de la trehalosa desempeña un papel esencial y omnipresente en la vida de las plantas superiores (Lunn *et al.*, 2014).

La ingeniería metabólica para el incremento en la acumulación de trehalosa en plantas ha sido el foco de la atención reciente en algunas plantas modelo. Sin embargo, dio lugar a efectos pleiotrópicos indeseables, incluyendo crecimiento aberrante y alteración del metabolismo bajo condiciones normales del crecimiento (Godijn *et al.*, 1997).

Para resolver este problema Seo *et al.* (2000) realizaron una caracterización de una enzima bifuncional sintética, que llevaron a la fusión de un gen trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa (TPSP) que incluye regiones de codificación de *E. coli* otsA y del otsB. Esta unión tiene la ventaja de necesitar un solo evento de transformación y de generar alta eficacia catalítica neta para la formación del trehalosa.

Con esta misma enzima Garg *et al.* (2002), obtuvieron plantas transgénicas de arroz, las cuales acumularon trehalosa en cantidades de hasta 1 mg·g⁻¹ de peso fresco y les confirió tolerancia a sequía, salinidad y frío sin alteraciones negativas en la morfología y el desarrollo.

En el año 2007 Miranda *et al.*, desarrollaron la fusión traduccional quimérica trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la sobreexpresaron en *Arabidopsis thaliana*, estas plantas fueron capaces de resistir choques térmicos, estrés osmótico, salino y congelamiento. Dicha construcción se utilizó en el presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- Avonce, N., Wuyts, J., Verschooten, K., Vandesteene, L. and Van Dijck, P. (2010). The Cytophaga hutchinsonii ChTPSP: first characterized bifunctional TPS-TPP protein as putative ancestor of all eukaryotic trehalose biosynthesis proteins. *Molecular biology and evolution*, 27(2), 359–369.
- Blancard, D. (2011). *Enfermedades del tomate*. Mundi-Prensa Libros. 679 p.
- Cabib, E. & Leloir, L. F. (1958). The biosynthesis of trehalose phosphate. *J Journal of Biological Chemistry*, 231(1), 259–275.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1–16.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223(4637), 701–703.
- Davey, M. R., & Anthony, P. (2010). *Plant Cell Culture: Essential Methods*. *Plant Cell Culture: Essential Methods*. <https://doi.org/10.1002/9780470686522>
- De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T., & Wiemken, A. (1993). Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *European Journal of Biochemistry*, 212(2), 315–323.
- Díaz-Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49–61.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., & Sangwan, R. S. (2011). De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends in plant science*, 16(11), 597–606.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., & Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R–27R.
- Escalona, C. V., Alvarado, V. P., Monardes, M. H., Urbina, Z. C., & Martin, B. A. (2009). Manual de cultivo del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Facultad de Agronomía. Universidad de Chile. 60 p.

- Fabbri, A., Sutter, E., & Dunston, S. K. (1986). Anatomical changes in persistent leaves of tissuecultured strawberry plants after removal from culture. *Scientia horticultrae*, 28(4), 331–337.
- FAOSTAT. FAO Statistics Division (2016). (consultado en <http://www.fao.org/statistics/es/>, noviembre de 2016)
- Fernandez, O., Bethencourt, L., Quero, A., Sangwan, R. S., & Cllement, C. (2010). Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. *Trends in plant science*, 15(7), 409–417.
- Flores Ortiz, C. M., Cabañas-Cabrera, A., Peñalosa Castro, I., Quintanar Zúñiga, R. E., Vázquez Medrano, J., & Urzúa Meza, M. A. (2009). Auxinas endógenas, AIA-oxidasa y enraizamiento en *Vigna radiola* L. Wilczek inducido por auxina exógena libre y conjugada. *Revista fitotecnia mexicana*, 32(1), 61–66.
- Gadd, G. M., Chalmers, K., & Reed, R. H. (1987). The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 48(1-2), 249–254.
- Garg, A. K., Kim, J. K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Do Choi, Y., Kochian, L. V., & Wu, R. J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 15898–15903.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). The anatomy and morphology of tissue cultured plants. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 465-477). Springer Netherlands.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 881–902.
- Goddijn, O. J., Verwoerd, T. C., Voogd, E., Krutwagen, R. W., de Graaf, P. T., van Dunn, K., Poels, J., Ponstein, A. S., Damm, B. & Pen, J. (1997).) Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiology* .113: 181 – 190.
- Gur, A., & Zamir, D. (2004). Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biol*, 2(10), e245.
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, cell & environment*, 21(6), 535-553.
- Hazel, C. B., Klein, T. M., Anis, M., Wilde, H. D., & Parrott, W. A. (1998). Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures. *Plant Cell Reports*, 17(10), 765–772.

- Iliev I., A. Gajdosová, G. Libiaková and M. Jain. (2010). Plant micropropagation. In: Davey M. R. and Anthony, P. (eds.). *Plant cell culture essential methods*. Wiley-Blackwell. pp. 1-23.
- Jámbor, B. E., Kissimon, J., Fábrián, M., Mészáros, A., Sinkó, Z., Gazdag, G. Y., & Nagy, T. (2001). In vitro rooting and anatomical study of leaves and roots of in vitro and ex vitro plants of *Prunus x davidopersica* 'Piroska'. *Int J Hortic Sci*, 7, 1-5.
- Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., & Huang, Z. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature genetics*, 46(11), 1220-1226.
- Lins, R. D.; Pereira, C. S.; Hunenberger, P. H. (2004). Trehalose – protein interaction in aqueous solution. *Proteins* 55: 177 – 188.
- Loyola-Vargas, V. M., & Vázquez-Flota, F. (Eds.). (2006). *Plant cell culture protocols* (Vol. 318). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Lunn, J.E. (2007) Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Funct. Plant Biol.* 34, 550–563.
- Lunn, J. E., Delorge, I., Figueroa, C. M., Van Dijck, P., & Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 544-567.
- Mascorro-Gallardo, O., Avonce, N., & Iturriaga, G. (2005). Biotecnología de la trehalosa en las plantas. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 11(2), 193-202.
- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., & Fraley, R. (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 5, 81-84.
- Medina, L. F., Díaz, L. P., Latife, J., Digonzelli, P. A., & Sosa, S. B. (2000). *Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz*. Red RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias. Agosto, 115-128.
- Müller, J., Aeschbacher, R.A., Wingler, A., Boller, T. and Wiemken, A. (2001) Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125, 1086–1093.
- Namitha, K. K., & Negi, P. S. (2013). Morphogenetic Potential of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. 'Arka Ahuti' to Plant Growth Regulators. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(2), 220-225.
- Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M., & Holzer, H. (1995). Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 360(3), 286-290.
- Paliwal, R. L. (2001). Uso de herramientas especiales para el mejoramiento del maíz. *El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*, (28), 233.
- Palomo, I., Moore-Carrasco, R., Carrasco, G., Villalobos, P., & Guzmán, L. (2010). El consumo de tomates previene el desarrollo de enfermedades

cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. *Idesia (Arica)*, 28(3), 121-129.

- Pandey, S. K., Nookaraju, A., Upadhyaya, C. P., Gururani, M. A., Venkatesh, J., Kim, D. H., & Park, S. W. (2011). An update on biotechnological approaches for improving abiotic stress tolerance in tomato. *Crop science*, 51(6), 2303-2324.
- Preece, J.E. & Sutter E.G. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. pp. 71-93 in Debergh P.C. and Zimmerman R.H. (eds.) Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. ISBN 0-7923-0818-2.
- Ramírez, H., Lentini, Z., & Vallejo Cabrera, F. A. (2009). Evaluation and selection of a protocol for in vitro regeneration of tomato variety Unapal – Arreboles. *Acta Agronómica*, 58(1), 29-33.
- Sanghera, G.S., Wani, S.H., Hussain, W. and Singh, N.B. (2011) Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Curr. Genomics*, 12, 30–43.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M. and Smeekens, S. (2004). Trehalose mediated growth inhibition of Arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol.* 135, 879–890.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2010). Monografía de cultivos: Tomate. Disponible en www.sagarpa.gob.mx
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2016. Atlas agroalimentario. SIAP. Primera edición.
- Seo, H. S., Koo, Y. J., Lim, J. Y., Song, J. T., Kim, C. H., Kim, J. K., ... & Do Choi, Y. (2000). Characterization of a bifunctional enzyme fusion of trehalose-6-phosphate synthetase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2484-2490.
- Singer, M. A., & Lindquist, S. (1998). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends in biotechnology*, 16(11), 460-468.
- Soto, T., J. Fernández, J. Vicente-soler, J. Cansado and M. Gacto. (1999). Accumulation of Trehalosa by Overexpression of tps 1, coding resistente to múltiple stresses in the fussion yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied and Enviromental Microbiology*. 65, 5: 2020-2024
- Street, H.E. (1977). Laboratory organization. pp. 11-30 in Street H.E. (ed.) *Plant Tissue and Cell Culture*. Bot. Monographs Vol.11, Blackwell Scientific Public-ations. Oxford, London.

- The Tomato Genome Consortium (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635–641. doi:10.1038/nature11119
- Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (1995). Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast?. *Trends in biochemical sciences*, 20(1), 3-10.
- Uribe, M. E., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F., & Cartes, P. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana. Botánica*, 69(1), 105-112.
- Vandesteene, L., López-Galvis, L., Vanneste, K., Feil, R., Maere, S., Lammens, W. & Van Dijck, P. (2012). Expansive evolution of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene family in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 160(2), 884-896.
- Woodward, A.W. & Bartel B. (2005) A receptor for auxin. *The Plant Cell* 17, 2425-2429.

REGENERACIÓN DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA

Romero-Escobedo, S. Y.; Mascorro-Gallardo, J. O.; Rodríguez-Pérez, J. E.; y Rodríguez-De-la-O, J. L.

RESUMEN

La regeneración de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) mediante cultivo *in vitro*, ha permitido propagar variedades de alto valor, plantas libres de enfermedades y aplicar la transgénesis. El objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* por organogénesis directa de una línea de tomate sobresaliente (L3) desarrollada en la UACH. En la primera fase se probaron explantes de hoja de plántulas provenientes de invernadero o cultivada *in vitro*, así como tres medios de cultivo [sales MS 100 % suplementadas con vitaminas Gamborg, ácido cítrico [(150 mg·L⁻¹) ácido ascórbico (100 mg·L⁻¹), sacarosa (3 %), agar (7 g·L⁻¹) y pH de 5.7], diferenciados por la concentraciones de hormonas. Los análisis estadísticos identificaron como el mejor tratamiento a explantes provenientes de plántulas *in vitro* con 1.0 mg·L⁻¹ BA + 0.2 mg·L⁻¹ AIA, ya que desarrolló callos de tamaño pequeño, con mayor número (7) y longitud de brotes (1.92 cm) en 30 días. Para el enraizamiento de brotes se evaluaron cinco medios basados en sales MS, donde variaron la concentración de éstas y de sacarosa, así como el tipo y contenido de hormonas. El mejor tratamiento fue el de 0.2 mg·L⁻¹ de AIB, ya que tuvo un buen desarrollo y permitió el desarrollo de la parte aérea, además de obtener 100 % de aclimatación. Esta se llevó a cabo en invernadero (en macetas con turba y solución nutritiva). El proceso hasta la adaptación *ex vitro* se efectuó en 60 días.

Palabras clave: cultivo tejidos, *in vitro*, propagación, tomate.

REGENERATION OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) BY DIRECT ORGANOGENESIS

Romero-Escobedo, S. Y.; Mascorro-Gallardo, J. O.; Rodríguez-Pérez, J. E.; y Rodríguez-De-la-O, J. L.

ABSTRACT

The regeneration of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) by *in vitro* culture, has allowed to propagation of high value varieties, disease free plants and the application of transgenesis. The objective of the present investigation was to develop an *in vitro* propagation protocol by direct organogenesis of an outstanding tomato inbreed (L3) developed in the UACH. In the first phase leaf explants from either greenhouse or *in vitro* cultivated seedlings were tested, as well as three culture media [MS salts 100% supplemented with Gamborg vitamins, citric acid [(150 mg·L⁻¹) ascorbic acid (100 mg·L⁻¹), sucrose (3 %), agar (7 g·L⁻¹) and pH 5.7), with different hormone concentrations. Statistical analyzes identified as the best treatment for *in vitro* seedlings, with 1.0 mg·L⁻¹ BA + 0.2 mg·L⁻¹ AIA, as it developed small size calluses with a higher number (7) and length (1.92 cm) of shoots in 30 days. For rooting the shoots, five media based on MS salts were evaluated, where the sucrose concentration were varied as well as type and content of hormones. The best treatment was 0.2 mg·L⁻¹ of AIB, since it had good radical development and allowed the development of the aerial part, besides obtaining 100%. This was carried out in greenhouse in pots with peat moss and nutrient solution. The process up to *ex vitro* adaptation was carried in 60 days.

Keywords: *in vitro*, propagation, tomato, tissue culture.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), originario de América del Sur y domesticado en México (SAGARPA, 2010), es actualmente el segundo cultivo de importancia mundial después de la papa y representa el 15 % de la producción mundial de hortalizas con 164.5 millones de toneladas (FAOSTAT, 2016), México ocupa el décimo lugar en producción y el segundo en exportaciones (SAGARPA, 2016).

La aplicación de técnicas biotecnológicas ha aumentado de manera significativa en esta especie, ejemplo de ello es la regeneración de plantas mediante cultivo *in vitro*, técnica que ha sido utilizada exitosamente para la propagación clonal de variedades de alto valor libres de virus y enfermedades, la hibridación somática, el almacenamiento de germoplasma y la transformación genética (Namita & Negi, 2013; Gerszberg *et al.*, 2014; Sherkar & Chavan, 2014).

El éxito de la regeneración por cultivo *in vitro* de plantas depende principalmente de tres factores: genotipo, tipo de explante y composición del medio de cultivo (Gerszberg *et al.*, 2014; Soundararajan, 2015). Se han realizado diversos estudios de este tipo en plantas de tomate (Cortina & Culiáñez-Macià, 2004; Plana *et al.*, 2005; Abu-El-Heba *et al.*, 2008; Yasmeeen, 2009; Ashakiran *et al.*, 2011; Namita & Negi, 2013; Sherkar & Chavan, 2014; Hattab *et al.*, 2015; Soundararajan, 2015), que muestran que el potencial morfogénico depende principalmente del genotipo y tipo de explante.

Por lo tanto el objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* por organogénesis directa de una línea homocigótica de tomate (L3) del Programa de Mejoramiento Genético de Tomate para Invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se empleó línea experimental L3 de tomate proveniente del Programa de Mejoramiento Genético de Tomate de la Universidad Autónoma Chapingo. Se trata de una línea homocogótica de alto rendimiento, de habito indeterminado y tipo de fruto saladette.

Regeneración por Organogénesis Directa de Tomate

Origen de explante

Se utilizó como explante tejido proveniente de lámina foliar de plantas de cuatro semanas de edad de dos orígenes. Plantas desarrolladas en invernadero (origen 1) y de cultivo *in vitro* (origen 2).

Origen 1: Plántula de invernadero. Las semillas fueron germinadas en charola de polipropileno, se empleó como sustrato turba estéril (120 °C, 1.5 lb² de presión, durante 20'). Las hojas se lavaron con una mezcla de detergente comercial, tween 20 y agua estéril. Se sumergieron en alcohol al 70 % durante 1 minuto y posteriormente, en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 minutos. En campana de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, finalmente se sumergieron en una solución de 150 mg·L⁻¹ de ácido cítrico mas 100 mg·L⁻¹ de ácido ascórbico, donde permanecieron hasta su disección y establecimiento en el medio de cultivo.

Origen 2: Plántula de cultivo *in vitro*. Las semillas se lavaron con una mezcla de: detergente comercial, tween 20 y agua estéril. Se sumergieron en alcohol al 70 % durante 3 minutos y posteriormente, en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 15 minutos. En una campana de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Se colocaron en medio de germinación estéril (120 °C, 1.5 lb² de presión, durante 20') que consistió de sales inorgánicas

Murashige-Skoog (1962) suplementado con vitaminas Gamborg's, ácido cítrico 150 mg·L⁻¹, ácido ascórbico 100 mg·L⁻¹, Sacarosa 3 %, pH a 5.7 ± 0.1 y agar 7 g·L⁻¹. Las plántulas se incubaron a una temperatura de 25 °C aproximadamente con un fotoperiodo de 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron formulados a partir de un estudio previo (Bastida, 2016), con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100 % suplementado con vitaminas Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968), 3 % de sacarosa, 150 mg·L⁻¹ de ácido cítrico y 100 mg·L⁻¹ de ácido ascórbico, diferenciadas en el contenido de reguladores de crecimiento (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cantidad de Reguladores de Crecimiento en los diferentes medios

| Medio de Regeneración | BAP (mg·L ⁻¹) | AIA (mg·L ⁻¹) | ANA (mg·L ⁻¹) | Fuente |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 0.9 | 0.0 | 0.02 | Bastida, 2016 |
| 2 | 2.5 | 1.0 | 0.0 | McCormick <i>et al.</i> , 1986 |
| 3 | 1.0 | 0.2 | 0.0 | McCormick <i>et al.</i> , 1986 |

Diseño de tratamientos

Se realizó un diseño de tratamientos factorial completo 3 (medios) x 2 (órigenes) que generaron seis tratamientos cada uno con 10 repeticiones. La unidad experimental fue un explante de 1 cm² y se establecieron en grupos de 5 en frascos (150 ml) con 20 ml de medio de cultivo. Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones.

Condiciones de establecimiento

Los explantes se obtuvieron del área central de las hojas más jóvenes de las plántulas de cuatro semanas de edad de ambos orígenes, seccionadas con bisturí estéril en segmentos de 1 cm² aproximadamente, se colocaron con el envés de la hoja en contacto con el medio y fueron incubados durante 4 semanas, con fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad, a 25 ± 2 °C.

Se realizaron evaluaciones a los 14, 21 y 28 días después del establecimiento (DDE) donde se registró la expansión del explante (TAM) mediante escala visual (1 = sin crecimiento, 2 = 1 cm, 3 = 2 cm y 4 = 3 cm), número de brotes formados por explante (NB) y longitud de brotes (LB, en cm) desde la base hasta su extremo distal.

Enraizamiento *in vitro* de brotes de tomate

Se formularon cinco medios de cultivo que se distinguieron por la concentración de sales MS, sacarosa, y el tipo y contenido de hormonas (Cuadro 5).

Cuadro 5 Composición de los medios de enraizamiento evaluados.

| M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|---|---|---|---|---|
| Sales MS | ¼ Sales MS | Sales MS | Sales MS | Sales MS |
| Vit. B5 de Gamborg |
| Sacarosa (3 %) | Sacarosa (2 %) | Sacarosa (3 %) | Sacarosa (3 %) | Sacarosa (3 %) |
| Ac. Cítrico (150 mg·L ⁻¹) |
| Ac. Ascorbico (100 mg·L ⁻¹) |
| ANA (1.0 mg·L ⁻¹) | ANA (0.1 mg·L ⁻¹) | AIB (0.1 mg·L ⁻¹) | AIB (0.2 mg·L ⁻¹) | AIB (0.3 mg·L ⁻¹) |

La unidad experimental fue un brote y al igual que en la fase anterior se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 20 repeticiones.

Se utilizaron brotes de 30 días de edad (3 cm aproximadamente), provenientes de plántulas *in vitro* y del medio con mayor éxito en la fase de inducción/regeneración. Éstos se establecieron en tubos de ensayo 16 x 120 mm con 15 ml de medio, y se incubaron durante 4 semanas, con fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad, a 25 ± 2 °C.

Se registraron en 7, 14, 21 y 28 días después del establecimiento (DDE): longitud de brotes (LB, en cm), el número de hojas (NH), número de raíces (NR), longitud de raíces (LR, en cm) y los días a la formación de raíces (DFR).

Aclimatación de plantas de tomate generadas por cultivo *in vitro*

La aclimatación de plantas regeneradas en la fase anterior se retiraron del medio de cultivo y se establecieron en un sustrato constituido por la mezcla de 80 % turba y 20 % de tezontle previamente esterilizada (120 °C, 1.5 lb² de presión, durante 20').

Previamente las raíces se sumergieron en agua con fungicida (Captan® 1 g·L⁻¹); se utilizaron bolsas de polietileno transparente para cubrir las plantas, las cuales permanecieron en condiciones de laboratorio con luz solar indirecta durante una semana; posteriormente se trasladaron a invernadero, la bolsa fue retirada completamente en la tercer semana posterior al trasplante. Los riegos se realizaron cada tres días con solución nutritiva Steiner al 50 %. En esta fase se registró sólo la frecuencia de plantas aclimatadas.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos a los 28 DDE en ambas fases de estudio (regeneración y enraizamiento) se sometieron a análisis de varianza y comparaciones de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los datos se representaron en gráficos de caja, mostrando la variación de acuerdo con los percentiles de las observaciones realizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Regeneración por Organogénesis Directa de Tomate

De acuerdo con el análisis de varianza (Apéndice 1), el origen del explante sólo causó modificaciones ($P \leq 0.001$) en la expansión de explante, y en el número y longitud de brotes. El medio de cultivo y la interacción de ambos factores, no afectaron estadísticamente a las variables evaluadas.

Origen del explante

La regeneración ocurre tanto a través de la embriogénesis somática como de la organogénesis del brote del tejido cortical subepidérmico (Newman *et al.*, 1996). El tiempo de inducción de respuesta morfogénica de explantes provenientes de plántulas desarrolladas *in vitro* fue menor, ya que se observó regeneración directa (organogénesis) a 7 DDE (datos no mostrados), los brotes regeneraron a partir de un grupo de células con apariencia similar al callo pero mucho más pequeñas, lo que se vio reflejado en una menor expansión del explante (Figura 3). Los brotes de explantes del origen 1 fueron visibles 12 DDE y su producción fue a través de una regeneración indirecta, en la que las células se conforman inicialmente en un callo somero antes de iniciar la generación de brotes, lo que causó mayor expansión del explante (Figura 4).

De acuerdo con las comparaciones de medias, los explantes de plántulas provenientes de cultivo *in vitro* tuvieron el mejor desempeño en comparación con aquellos de plántulas de invernadero, ya que generaron en promedio 5 brotes cada uno de 1.83 cm de longitud y expansión de explantes de 2.73 ($P < 0.0001$). El número máximo de brotes obtenidos fue 12 y 5 cm de longitud de brote; además, la variación de 50 % de los datos (intercuartiles 2 y 3) se concentró en un intervalo menor con valores más altos (Figura 3).

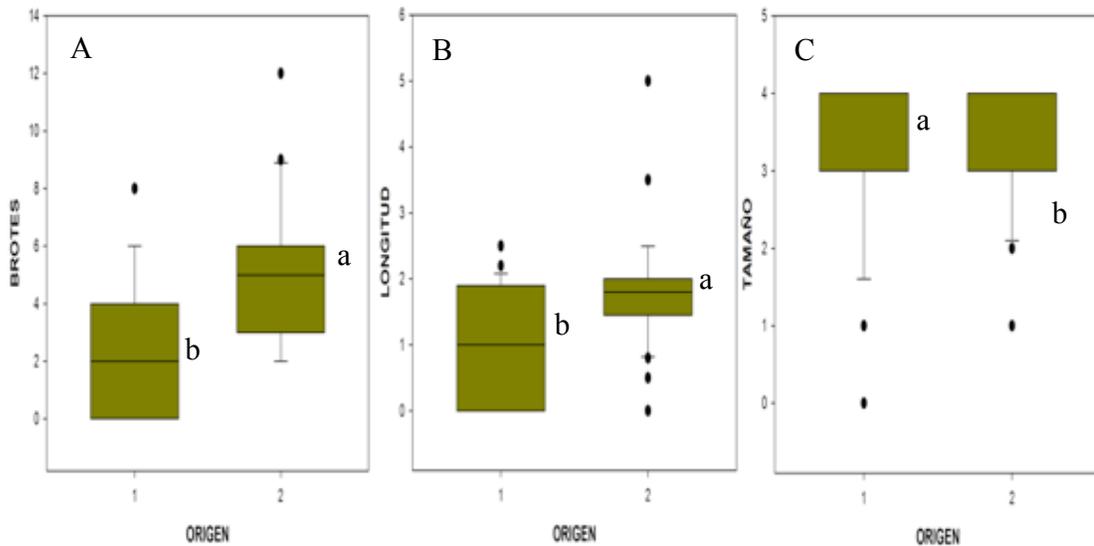


Figura 3. Efecto del origen del explante en el A) Número de brotes, B) Longitud de brote y C) Expansión del explante; 1 plántula proveniente de invernadero, 2 plántula proveniente de cultivo *in vitro*; diferente letra en las medias muestran diferencias estadísticas (Tukey $\alpha < 0.05$).

Los explantes provenientes de plantas asépticas (origen 2) generaron mayor regeneración de brotes adventicios debido a la menor interferencia en su desarrollo de agentes químicos, desinfectantes como el hipoclorito de sodio, que pueden causar efectos fitotóxicos en el material vegetal (Ramírez *et al.* 2009; Borges *et al.* 2009). Por otra parte, la manipulación de explantes provenientes de invernadero durante su desinfección, pudo aumentar el daño a los explantes, causando liberación de etileno, hormona que proporciona un estímulo a la formación de tejido no organizado (George *et al.*, 2008). Así mismo, mediante este mismo proceso, las heridas de los explantes pudieron incrementar la inducción del callo y la formación adventicia del brote (Zhang *et al.*, 2012).

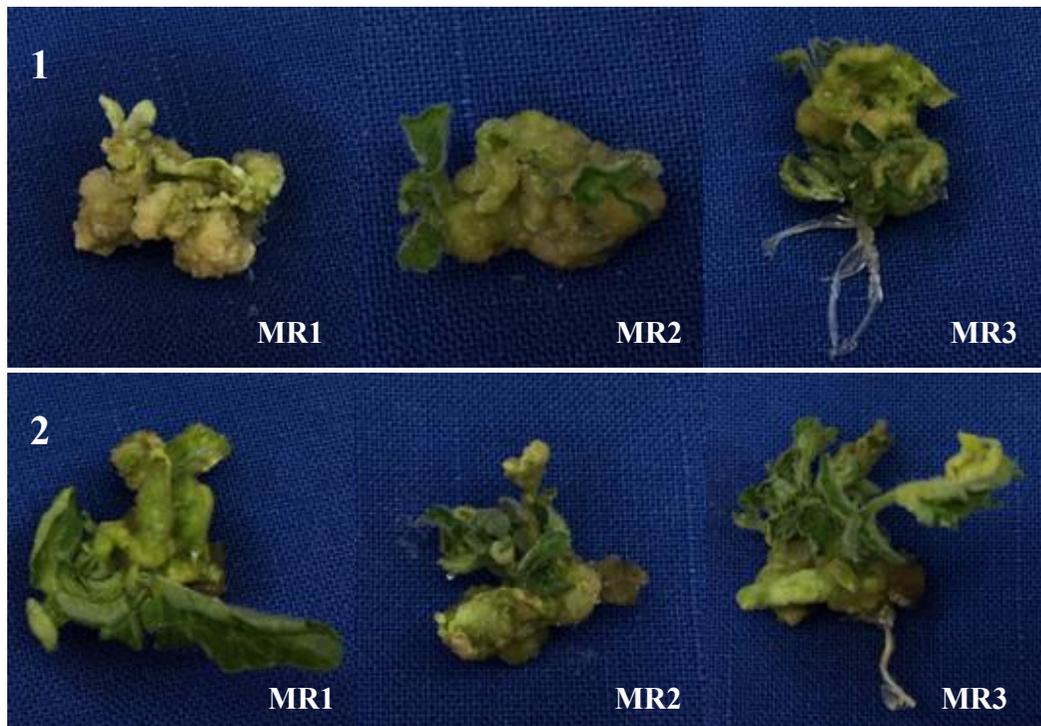


Figura 4. Brotes del genotipo L3 de tomate obtenidos por organogénesis 28 DDE; 1: Origen de explante de plántula proveniente de invernadero; 2: Origen de explante de plántula in vitro; MR: Medio de Regeneración.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo no mostraron diferencias estadísticas en NB y LB (Tukey $\alpha < 0.05$, Figura 5), ya que la composición de hormonas fue muy similar; en este sentido, la combinación de hormonas AIA + BAP favorecen la regeneración de brotes de diferentes explantes de tomate (Chandel & Katiyar, 2000; Mamidala & Nanna, 2011; Namita & Negi, 2013; Gerszberg *et al.*, 2014; Hattab *et al.*, 2015; Soundararajan, 2015). Sin embargo, la distribución de los datos en las gráficas de caja (Figura 5) mostró que el MR3 (1.0 mg·L⁻¹ de BAP más 0.2 mg·L⁻¹ de AIA), generó menor expansión de explante, NB y LB uniforme, además de que en 28 DDE se observó la presencia de raíz a diferencia de MR1 y MR2 (Figura 4),

resultados similares se observaron en los ensayos de McCormick (1986), pues esta concentración de hormonas fue la mejor en 7 de 15 genotipos evaluados.

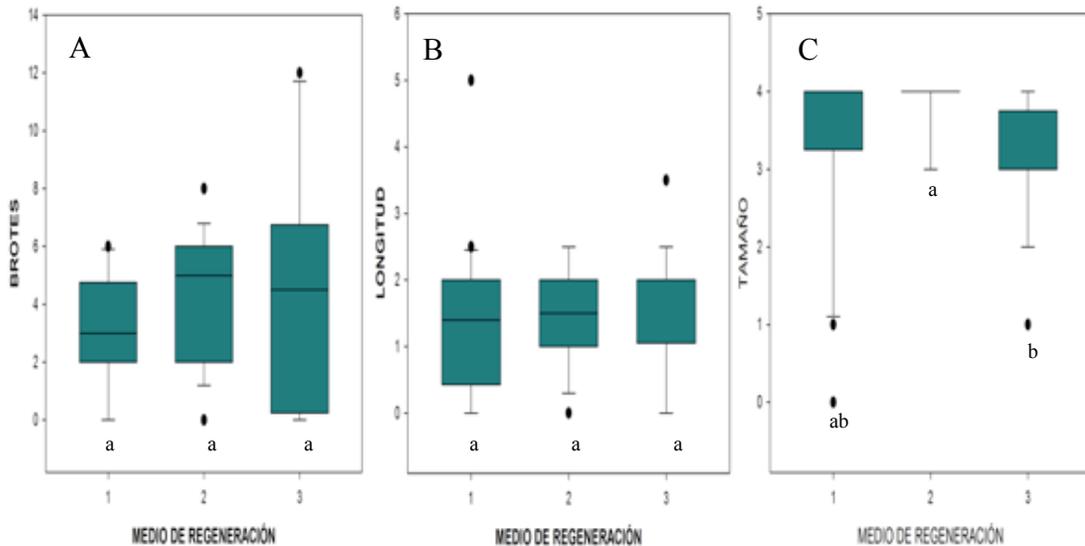


Figura 5. Efecto del medio de regeneración en el A) Número de brotes, B) Longitud de brote y C) Expansión del explante; 1 plántula proveniente de invernadero, 2 plántula proveniente de cultivo *in vitro*; diferente letra en las medias muestran diferencias estadísticas (Tukey $\alpha < 0.05$).

Estudios relacionados (Guan *et al.*, 2012; Khuong *et al.*, 2013) demuestran que la organogénesis y la embriogénesis somática ocurren simultáneamente durante la regeneración *in vitro* de explantes de lámina foliar utilizando concentraciones de $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP en combinación con $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de AIA, que a pesar de no tratarse de la misma concentración, representa una relación auxina/citocinina baja ($\text{AIA/BAP} = 0.1$), similar al MR3 ($\text{AIA/BAP} = 0.2$) y al MR1 ($\text{ANA/BAP} = 0.02$) en comparación con el MR2 ($\text{AIA/BAP} = 0.4$), esto coincide con lo obtenido por otros investigadores (Montoya-Henao, 1991; Ramirez *et al.*, 2009) que señalan que una baja relación auxina/citocinina favorece la regeneración de brotes y la formación de plántulas.

El MR2 tuvo la mayor expansión de explante (Figura 6), lo que indicó que la regeneración indirecta ocurrió a través de la formación de callos generados por la presencia de hormonas AIA y BAP (relación $\text{AIA/BAP} = 0.4$). Dichos efectos de

regeneración indirecta han sido observados en tomate (cv. S22) al emplear relaciones auxina/citocinina superiores a 0.3 (Godishala *et al.*, 2011).

En los tres medios de cultivo, los explantes provenientes de plántulas cultivadas *in vitro* generaron siempre las mejores respuestas en la expansión de callo, NB y LB. Sin embargo, el mejor resultado se obtuvo con el medio MR3 (1.0 mg·L⁻¹ de BAP y 0.2 mg·L⁻¹ de AIA) con promedios de 6.7 brotes por explante 1.92 cm de longitud de brote y expansión de explante de 2.73 (Figura 6). Estos resultados son respaldados por la investigación de Namita y Negi (2013) donde se utilizaron explantes de hojas de plántulas de tomate obtenidas por cultivo *in vitro* en un medio suplementado con 2 mg·L⁻¹ de BAP y 0.1 mg·L⁻¹ de AIA; con lo cual, 6 días después de la brotación, se obtuvieron promedios de 8.3 brotes con longitud de 3.67 mm.

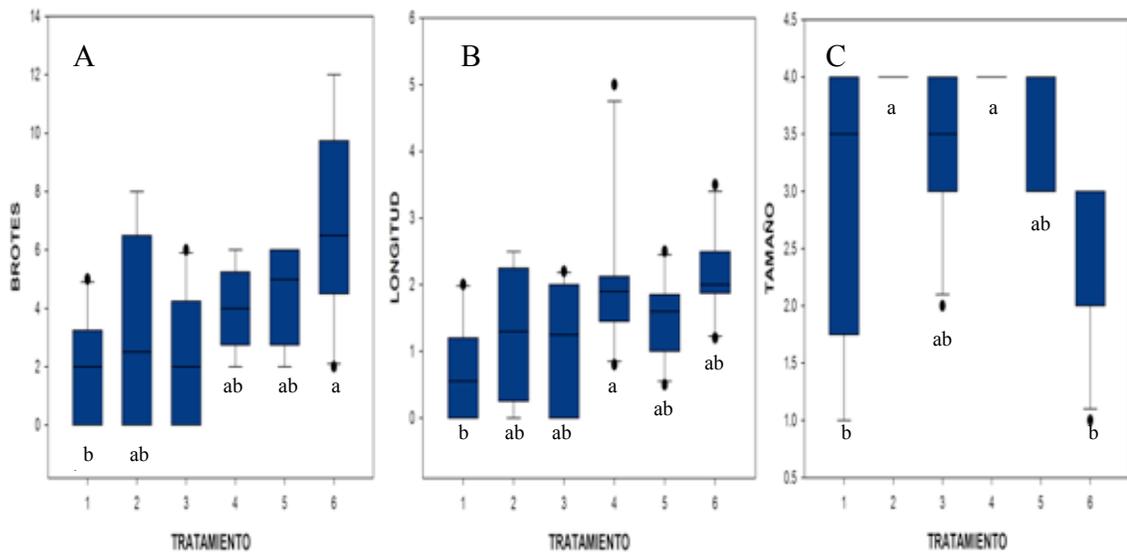


Figura 6. Efecto del tratamiento (origen del explante x composición del medio de cultivo) en el A) Número de brotes, B) Longitud de brote y C) Expansión del explante; 1 plántula proveniente de invernadero, 2 plántula proveniente de cultivo *in vitro*; diferente letra en las medias muestran diferencias estadísticas (Tukey $\alpha < 0.05$).

Enraizamiento *in vitro* de brotes de tomate

Respecto al análisis de varianza realizado a los datos de la fase de enraizamiento, se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) en número y longitud de raíces, la variable días a formación de raíz (DFR) no causó modificaciones.

Las auxinas juegan un papel importante en la inducción de raíces de brotes cultivados *in vitro* (Ramirez *et al.*, 2009; Chaudry *et al.*, 2010; Vikram *et al.*, 2011; Uribe *et al.*, 2012). Lo anterior respalda los resultados obtenidos ya que los cinco medios generaron raíces a partir del día 7 DDE en promedio, con porcentajes de formación de raíces del 90 – 100 %, a excepción del ME3, que sólo mostró el 45 % (Cuadro 6), esto contrasta con los resultados de Enríquez *et al.* (2001), que con la misma concentración de AIB ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) obtuvieron el 100 % de brotes enraizados.

Cuadro 6. Porcentaje de formación de raíz de cinco medios de cultivo.

| Medio de enraizamiento | Porcentaje |
|------------------------|------------|
| 1 | 100 % |
| 2 | 100 % |
| 3 | 45 % |
| 4 | 90 % |
| 5 | 90 % |

El ME1 generó el mayor NR con una media de 17 pero la LR más pequeña (Figura 7). Se observó que las raíces presentaron geotropismo negativo y fueron más gruesas que las raíces de los otros medios (Figura 8), los brotes se desarrollaron en condiciones de cultivo *in vitro*, sin embargo, sólo el 10 % sobrevivió a la fase de aclimatación.

El ME2 presentó 7.26 raíces en promedio, con la mayor longitud de raíz de los cinco medios (10.32 cm), sin embargo no permitió el desarrollo de la parte aérea (Figura 8) y sólo el 15 % sobrevivió a la aclimatación. Los resultados contrastan a los encontrados por Ramirez *et al.* (2009), que utilizaron la misma composición de medio de cultivo en la variedad Unapal – Arreboles y lograron aclimatar 84 % de las plantas.

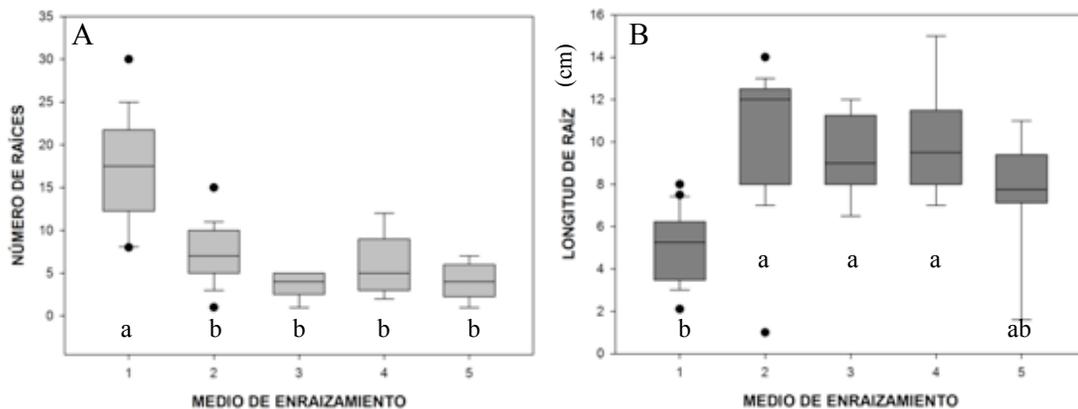


Figura 7. Efecto del medio de enraizamiento en el, número (A) y longitud (B) de raíces; diferente letra en las medias muestran diferencias estadísticas (Tukey $\alpha < 0.05$).

Los ME3, ME4 y ME5 conformados por el mismo tipo de auxina (AIB), no generaron diferencias significativas en las variables evaluadas (NR, LR y DFR). Se observó que de manera simultánea a la formación de raíz se desarrolló la parte aérea (Figura 8), ésta logró un crecimiento del doble de la longitud del brote establecido así como también aumentó el número de hojas por brote (Datos no mostrados), además de que 100 % de las plantas enraizadas tuvieron éxito en la etapa de aclimatación a diferencia de los medios con ANA. Uribe *et al.* (2012), señalaron que el ANA, a concentraciones mayores o iguales a AIB, puede ocasionar efectos inhibitorios (formación de callo, estimulación de compuestos fenólicos, etc.) en la producción de raíces por su mayor estabilidad en el medio de cultivo, siendo necesaria una menor concentración en su aplicación.

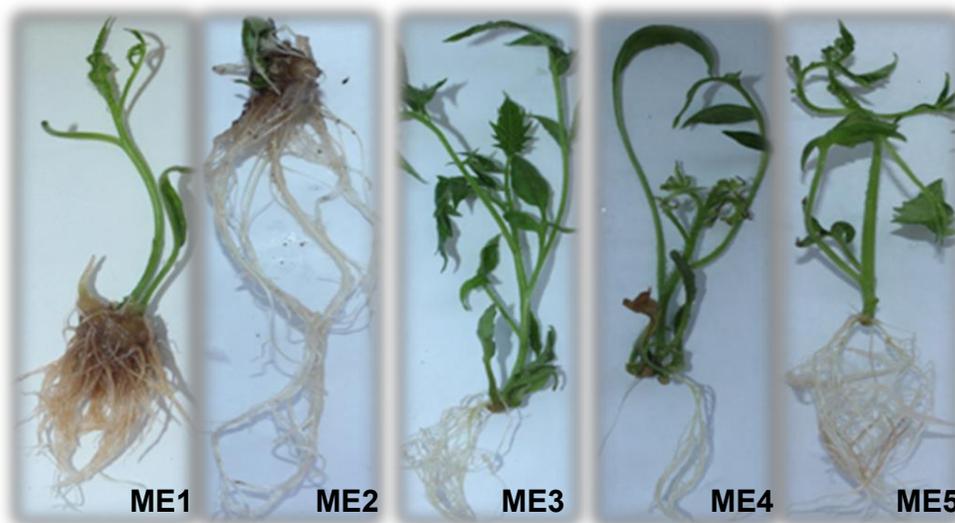


Figura 8. Desarrollo de raíz de brotes de tomate en diferentes medios a los 28 DDE.

Los resultados sugieren que el tipo y concentración de auxina utilizada influyen de una manera significativa. Generalmente, el AIB se utiliza más que otra auxina en la estimulación del enraizamiento. Varios autores han observado también que el AIB desempeña un papel vital en la inducción de raíces en varios genotipos de tomate (Chaudhry *et al.*, 2010; Rashid & Bal, 2010; Sakthivel & Manigandan, 2011; Vikram *et al.*, 2011; Wayase & Shitole, 2014).

De los tres medios con AIB, se eligió el ME4 ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ya que obtuvo las medias más altas con promedio de 5.89 raíces de 9.95 cm de longitud y 100 % de eficiencia en la aclimatación, lo que es comparable con los resultados de Devi *et al.* (2008), Radish y Bal (2010) y Ashakiran *et al.* (2011), quienes en diferentes variedades de la misma especie definieron esta concentración como la mejor ya que obtuvieron porcentajes de formación de raíz cercanas a 100 % y una aclimatación de plantulas de más de 50 %. Sin embargo Wayase y Shitole (2014) y Soundararajan (2015), definieron que a mayor concentración de AIB, mayor porcentaje de formación de raíz y NB, indicando a $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ como la concentración óptima para generar raíces en brotes de tomate cultivados *in vitro*.

Las plantas aclimatadas mostraron desarrollo normal 28 DDE a condiciones *ex vitro* y se mantuvieron hasta la floración.

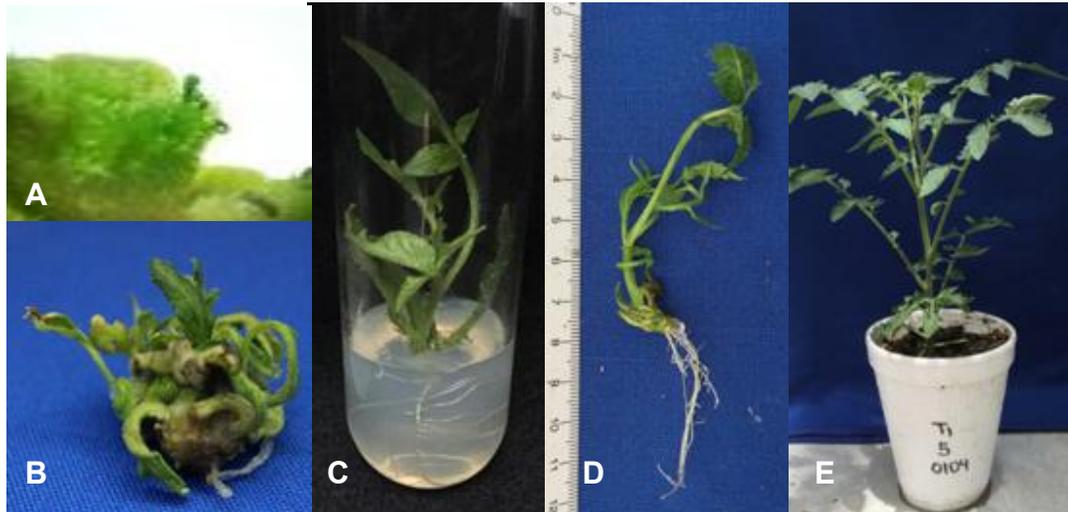


Figura 9. Proceso de regeneración por organogénesis directa a partir de explantes de hoja de tomate L3; A: desarrollo de callo y brotes a 14 DDE; B: desarrollo de callo y brotes a 28 DDE; C: Brote en ME, se observa desarrollo de parte aérea y raíz a 21 DDE; D: Planta completa de tomate a 28 DDE en ME; E: Planta de tomate aclimatada con desarrollo normal a los 30 DDE en sustrato y solución nutritiva.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se obtuvo un protocolo eficiente y reproducible para la regeneración directa de brotes adventicios de tomate por organogénesis directa en la línea homocigótica utilizada (L3). Se obtuvo que la interacción de los factores origen 2 y MR3 (explantes provenientes de plántulas de cultivo *in vitro* y una concentración de hormonas de 1.0 mg·L⁻¹ de BAP y 0.2 mg·L⁻¹ de AIA) generaron los valores máximos de NB y LB. Respecto al medio de enraizamiento, se encontró que la mejor concentración y tipo de auxinas fue de 0.2 mg·L⁻¹ de AIB que permitió 90 % de brotes enraizados y 100 % de aclimatación *in vitro*. El proceso hasta la fase *ex vitro* se pudo efectuar en 60 días y las plantas adquirieron un comportamiento similar a las cultivadas en invernadero en 30 días.

LITERATURA CITADA

- Abu-El-Heba, G.A.; Hussein G.M. and Abdalla N.A. (2008). A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system, *Agri. and Forestry Res.*, 58, 103-110.
- Ashakiran, K., Sivankalyani, V., Jayanthi, M., Govindasamy, V., & Girija, S. (2011). Genotype specific shoots regeneration from different explants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) using TDZ. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1(2), 107-113.
- Bastida, C. I. (2016). Regeneración por organogénesis y transformación genética de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo.
- Borges, G.M., Estrada, A.E., Pérez, R.I., Meneses, R.S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de dioscorea alata I, clon caraqueño. *Revista colombiana de biotecnología. Universidad nacional de Colombia-* vol. xi, núm. 2. pp. 127-135.
- Chandel, G., & Katiyar, S. K. (2000). Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.). *Advances in Plant Sciences*, 13(1), 11-18.
- Chaudhry, Z., Abbas, S., Yasmin, A., Rashid, H., Ahmed, H., and Anjum, M. A. (2010). Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. moneymaker. *Pak. J. Bot*, 42(1), 155-163.
- Cortina, C. and Culianez-Macia, F.A. (2005) Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci.* 169, 75–82
- Devi, R., Dhaliwal, M. S., Kaur, A., & Gosal, S. S. (2008). Effect of growth regulators on in vitro morphogenic response of tomato. *Indian Journal of Biotechnology*.;7:526-530.
- Enríquez, J. R., Carrillo, G., Sánchez, P., de las Nieves Rodríguez, M., & del Carmen Mendoza, M. (2001). Efectos de los ácidos acetilsalicílico e indolbutírico en el enraizamiento in vitro y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24(1), 71-78.
- FAOSTAT. FAO Statistics Division (2016). (Consultado en <http://www.fao.org/statistics/es/>, noviembre de 2016).

- Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). The anatomy and morphology of tissue cultured plants. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 465-477). Springer Netherlands.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 881-902.
- Godishala, V., Mangamoori, L., & Nanna, R. (2011). Plant regeneration via somatic embryogenesis in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Cell and Tissue Research*, 11(1), 2521.
- Guan, Z. J., Guo, B., Huo, Y. L., Dai, J. K., & Wei, Y. H. (2012). Histocytological examination on organogenesis and somatic embryogenesis of HBsAg-transgenic cherry tomato mutant. *Int J Exp Bot*, 81, 51-58.
- Hattab, A. Z. N., Qaudhy, A. W. K., Razaq, A. A., Kaaby, E. A., & Ani, J. A. (2015). In Vitro Regeneration of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Plants under Drought Stress. *Int. J. of Multidisciplinary and Current research*, 3.
- Khuong, T. T. H., Crété, P., Robaglia, C., & Caffarri, S. (2013). Optimisation of tomato Micro-tom regeneration and selection on glufosinate/Basta and dependency of gene silencing on transgene copy number. *Plant cell reports*, 32(9), 1441-1454. doi:10.1007/s00299-013-1456-8
- Mamidala, P., Nanna, R. (2011). Effect of genotype, explant source and medium on *in vitro* regeneration of tomato. *Int J Genet Mol Biol* 3:45-50.
- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., & Fraley, R. (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 5, 81-84.
- Montoya-Henao, L. M. (1991). Cultivo de tejidos vegetales. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 77 p.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Namitha, K. K., & Negi, P. S. (2013). Morphogenetic Potential of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. 'Arka Ahuti' to Plant Growth Regulators. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(2), 220-225.
- Newman, P. O., Krishnaraj, S., & Saxena, P. K. (1996). Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): somatic embryogenesis and shoot

- organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine. *International Journal of Plant Sciences*, 157(5), 554-560.
- Plana, D., Fuentes, A., Alvarez, M., Lara, R. M., Alvarez, F., & Pujol, M. (2006). A new approach for in vitro regeneration of tomato plants devoid of exogenous plant growth hormones. *Biotechnology journal*, 1(10), 1153-1157. doi:10.1002/biot.200500042
- Ramírez, H., Lentini, Z., & Vallejo Cabrera, F. A. (2009). Evaluation and selection of a protocol for in vitro regeneration of tomato variety Unapal –Arreboles. *Acta Agronómica*, 58(1), 29-33.
- Rashid, R., & Bal, S. S. (2010). Effect of hormones on direct shoot regeneration in hypocotyl explants of tomato. *Notulae Scientia Biologicae*, 2(1), 70.
- Sakthivel, S., & Manigandan, V. (2011). Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*, PKM1) from cotyledonary leaf explants. *Int J Chem Pharm Sci*, 2, 22-25.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010. Monografía de cultivos: Tomate. Disponible en www.sagarpa.gob.mx
- Sherkar, H. D., & Chavan, A. M. (2014). Studies on callus induction and shoot regeneration in tomato. *Sci Res Rep*, 1, 89-93.
- Sundararajan, M. (2015). Induction of organogenesis in tomato callus using plant growth promoters including triacontanol and antioxidants. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 5(3), 81-87.
- Uribe, M. E., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F., & Cartes, P. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana. Botánica*, 69(1), 105-112.
- Vikram, G., Madhusudhan, K., Srikanth, K., Laxminarasu, M., and Swamy, N. (2011). Effect of plant growth regulators on *in vitro* organogenesis in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Research Biology*. 4: 263-268.
- Wayase, U. R., & Shitole, M. G. (2014). Effect of plant growth regulators on organogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Dhanashri. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 20(2), 65.
- Yasmeen, A. (2009). An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv Rio Grande). *Acta physiologiae plantarum*, 31(6), 1271.
- Zhang, W., Hou, L., Zhao, H., & Li, M. (2012). Factors affecting regeneration of tomato cotyledons. *Bioscience Methods*, 3: 27-33.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5(10), 1411.

PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) QUE ACUMULAN TREHALOSA

Romero-Escobedo, S. Y.; Mascorro-Gallardo, J. O.; Rodríguez-Pérez, J. E.;
y Rodríguez-De-la-O, J. L.

RESUMEN

La transformación genética por agroinfección es la técnica más utilizada para la obtención de plantas transgénicas de tomate, así se pueden integrar genes de biosíntesis de trahalosa para conferirles tolerancia a sequía, frío y patógenos. Los factores más importantes que afectan la eficiencia de transformación son el genotipo de la planta, la cepa, el tiempo de co-cultivo, la densidad bacteriana y el uso de inductores como la acetosiringona. El objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo de transformación mediante *A. tumefaciens* para una línea experimental (L3). Se evaluaron las cepas de *Agrobacterium* (LBA4404 y C58C1) y las dosis de selección de kanamicina y fosfotricina. Para la obtención de plantas con genes de biosíntesis de trehalosa, se emplearon los vectores pBin19 y pTF101.1 con genes de selección *nptII* y *bar* de resistencia a kanamicina y fosfotricina, respectivamente, además de los genes quiméricos de interés *35S::ScTPS1TPS2::NOS* y *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS*. Sólo la cepa C58C1 mostró transformación con densidad de $A_{600} = 0.1$ ajustada con medio de infección más $100 \mu\text{M}$ de acetosiringona y co-cultivo de 48 hrs. La selección se hizo con $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de kanamicina y $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfotricina adicionado al medio de regeneración durante 28 días. Se obtuvieron: 50 plantas resistentes a fosfotricina y 59 a kanamicina. Por medio de la prueba de detección del gen *nptII* por PCR se determinaron como positivas 9 plantas con el gen *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS* y 2 con el *35S::ScTPS1TPS2::NOS*, lo que significó eficiencias de transformación de 4.5 y 1 %.

PALABRAS CLAVE: agroinfección, estrés abiótico, GUSint, tomate, trehalosa

TRANSGENIC TOMATO PLANTS (*Solanum lycopersicum* L.) THAT ACCUMULATE TREHALOSA

Romero-Escobedo, S. Y.; Mascorro-Gallardo, J. O.; Rodríguez-Pérez, J. E.; y Rodríguez-De-la-O, J. L.

ABSTRACT

Genetic transformation by agroinfection technique is the most used way to get transgenic tomato plants by this method trehalose biosynthesis genes can be integrated to confer tolerance to drought, cold and pathogens. Transformation efficiency is affected by several factors such as plant genotype, strain, co-culture time, bacterial density and the use of inducers like acetosyringone. Develop a protocol of tranformatiion using *A. tumefaciens* on an experimental line (L3) was the objective of this research. *Agrobacterium* strains (LBA4404 y C58C1) and kanamicina y forfinotricina selections doses were evaluated. Vectors pBin19 y pTF101.1 with selections genes *nptII* and resistant *bar* to kanamycin and phosphinothricin were used to obtain plants with trehalose biosynthesis genes, in addition to the chimeric genes of interest *35S::ScTPS1TPS2::NOS* and *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS*. C58C1 strain was the only one that showed transformation with a density of $A_{600} = 0.1$ adjusted with infection medium plus 100 μM of acetosyringone, the co-culture was 48 hrs. The selection was done with 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of kanamycin and 0.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of phosphinothricin added to the regeneration medium for 28 days. 50 plants resistant to phosphinothricin and 59 to kanamycin were obtained. By using the *nptII* gene detection test by PCR, 9 plants were identified as positive with *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS* and 2 with *35S::ScTPS1TPS2::NOS*, which meant transformation efficiencies of 4.5 and 1 %.

Keywords: *abiotic stress, agroinfection, GUSint, tomato, trehalose*

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es actualmente una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo por las divisas que genera (FAOSTAT, 2016). En México, el cultivo del tomate tiene importancia no sólo como generador de divisas, sino también por la elevada derrama económica que genera (Santiago & Borrego, 1998).

Debido a que 2/5 partes de la superficie del país son consideradas como zonas áridas o semiáridas (principalmente al norte), se ha trabajado mediante mejoramiento genético convencional en la producción de variedades resistentes a condiciones adversas como las temperaturas extremas o la sequía. Sin embargo, estos procesos conllevan un periodo largo de tiempo. Una opción factible en el desarrollo de variedades con características deseables específicas en poco tiempo es el uso de la ingeniería genética (Zheng *et al.*, 2009).

La acumulación de azúcares y de otros solutos es una respuesta común de los organismos ante el estrés abiótico. La trehalosa es un disacárido no reductor presente en muchas bacterias y hongos, invertebrados, así como en muchas plantas superiores tolerantes al estrés hídrico (Elbein *et al.*, 2003). Sus funciones son proteger las membranas y proteínas de las células expuestas al estrés hídrico y reducir la agregación de proteínas desnaturalizadas (Parvaiz & Satyawati, 2008), también es capaz de preservar la integridad de las membranas bajo condiciones de altas temperaturas o estrés osmótico favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos para evitar la separación de fases, la fusión y el rompimiento de las membranas (Crowe *et al.*, 1984).

En plantas transgénicas modificadas para sobreexpresar este disacárido, se ha observado que pequeños aumentos en los niveles de trehalosa se relacionan con

una mayor tasa fotosintética y a una disminución del daño foto-oxidativo durante el estrés (Chávez & González, 2009).

La primera transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en tomate fue reportado por McCormick (1986). Desde entonces se han desarrollado distintos protocolos de transformación (Gerszberg *et al.*, 2014), en la inserción de genes de resistencia a herbicidas, antibióticos, virus, hongos, insectos, factores abióticos, así como genes para la expresión de sustancias de importancia nutricional (Ramírez *et al.*, 2009).

Las ventajas de la transformación mediada por *Agrobacterium* sobre otras metodologías incluyen la conveniencia de la manipulación, la relativa alta eficiencia de transformación y el bajo número de copias de transgenes integrados.

El éxito de la transformación genética de plantas vía *Agrobacterium* depende del tipo de cepa, la densidad del cultivo, la adición y concentración de acetosiringona, el tiempo de la infección, la temperatura y el tiempo de co-cultivo (Ramírez *et al.*, 2009). Estos factores se deben optimizar para un genotipo en particular, por lo que el objetivo de la investigación fue identificar los factores mas importantes para desarrollar un protocolo de transformación por agroinfección de la línea experimental L3, a fin de obtener plantas transgénicas con genes de biosíntesis de trehalosa con tolerancia a sequía, frio y patógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipo

Se empleó la línea experimental denominada L3 de tomate proveniente del Programa de Mejoramiento Genético de Tomate para Invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo. Se trata de una línea homocogótica de alto rendimiento, de habito indeterminado y tipo de fruto saladette.

Los explantes se obtuvieron de plántulas cultivadas *in vitro* bajo el siguiente procedimiento: Las semillas se lavaron con una mezcla de: detergente comercial, tween 20 y agua estéril. Se sumergieron en alcohol al 70 % durante 3 minutos y posteriormente, en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 15 minutos. En una campana de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Se colocaron en medio de germinación estéril (120 °C, 1.5 lb² de presión, durante 20') que consistió de sales inorgánicas Murashige-Skoog (1962) suplementado con vitaminas Gamborg's (1968) (MSG), ácido cítrico 150 mg·L⁻¹, ácido ascórbico 100 mg·L⁻¹, Sacarosa 3 %, pH a 5.7 ± 0.1 y agar 7 g·L⁻¹. Las plántulas se incubaron a una temperatura de 25 °C aproximadamente con un fotoperiodo de 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad.

Material Biológico

Ensayo de expresión estable del gen GUS.

Para la optimización del proceso de agroinfección en tomate se realizó un ensayo de transformación con el gen GUS con la finalidad de evaluar la capacidad infectiva de dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* por expresión transitoria y estable. Se utilizaron dos cepas: LBA4404 (**C1**) y C58C1 (**C2**). Ambas con el vector binario p35SGUSint (Vancanneyt *et al.*, 1990) con gen de selección *nptII* de resistencia a kanamicina (Apéndice 2).

Obtención de plantas que acumulan trehalosa

Para la obtención de plantas que sobreexpresan trehalosa se utilizó la cepa C58C1 con los genes quiméricos *35S::ScTPS1TPS2::NOS* y *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS* con promotor constitutivo e inducible por frío y sequía, respectivamente (Miranda *et al.*, 2007), con el gen bifuncional de trehalosa (ScTPS1TPS2) y terminador *nos*. Se emplearon dos vectores con ambos genes quiméricos, pTF101.1 (V1) y pBin19 (V2) con los genes de selección *bar* y *nptII* que confieren resistencia a fosfinotricina y a kanamicina, respectivamente (Apéndice 3).

Ensayos de resistencia para el establecimiento de dosis de selección.

Con la finalidad de seleccionar las células transformadas, se realizaron experimentos de resistencia a kanamicina, fosfinotricina (PPT) y sorbitol en explantes de hoja de tomate sin transformar. Los agentes se adicionaron en diferentes concentraciones (Cuadro 7) al medio de regeneración compuesto de MSG, 150 mg·L⁻¹ de ácido cítrico, 100 mg·L⁻¹ de ácido ascórbico, 3% de Sacarosa, BA 1.0 ml·L⁻¹, AIA 0.2 ml·L⁻¹, pH a 5.7 ± 0.1 y 7 g·L⁻¹ de agar.

Cuadro 7. Concentraciones de agentes selectivos para la evaluación de resistencia en explantes de hoja de tomate.

| Tratamiento | Kanamicina (mg·L ⁻¹) | Fosfinotricina (mg·L ⁻¹) | Sorbitol (mM) |
|-------------|-------------------------------------|---|------------------|
| T0 | 0 | 0 | 0 |
| T1 | 10 | 0.1 | 100 |
| T2 | 20 | 0.2 | 200 |
| T3 | 30 | 0.3 | 300 |
| T4 | 40 | 0.4 | 400 |
| T5 | 50 | 0.5 | 500 |
| T6 | 60 | 0.6 | 600 |
| T7 | 80 | 0.7 | 700 |
| T8 | 100 | 0.8 | 800 |
| T9 | - | 0.9 | - |
| T10 | - | 1.0 | - |
| T11 | - | 1.5 | - |

Se colocaron 10 explantes de hoja por cada concentración y se contabilizó el porcentaje de explantes con tejido inhibido a los 14, 21 y 28 días después del establecimiento.

Transformación

La transformación se llevó a cabo por agroinfección. La preparación de la bacteria consistió en la inoculación de las cepas transformadas de *A. tumefaciens* en medio LB líquido ($25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) con rifampicina $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + kanamicina $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para las cepas con los vectores pGUSint y pBin19; y rifampicina $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + estreptomicina $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para el vector pTF101.1. Se cultivaron por 24 hrs a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo agitación. Después de medir la densidad, se ajustó a $A_{600} = 0.1$ en medio de infección compuesto de MSG, sacarosa 3 %, glucosa (dextrosa) 10 mM, BA $1.0 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$, AIA $0.2 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ con pH a 5.8.

Explantes

Los explantes se obtuvieron del área central de las hojas más jóvenes de las plántulas de cuatro semanas de edad cultivadas *in vitro* por la metodología anteriormente mencionada, se cortaron con bisturí estéril en segmentos de 1 cm^2 aproximadamente.

Se destinaron 150 explantes por cepa para el ensayo de expresión estable con el gen GUS y 200 explantes por vector para cada gen bifuncional ($35S::ScTPS1TPS2::NOS$ y $Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS$) para obtener plantas que acumulan trehalosa.

Agroinfección y co-cultivo

Los explantes se sumergieron en el medio de infección con el cultivo bacteriano de *A. tumefaciens* ajustado a $A_{600} = 0.1$ más $100 \text{ }\mu\text{M}$ de acetosiringona durante

10 minutos. Posteriormente se retiraron, se eliminó el excedente con papel secante y se transfirieron a cajas Petri de 100 x 15 mm con medio de co-cultivo (MSG, 150 mg·L⁻¹ de ácido cítrico, 100 mg·L⁻¹ de ácido ascórbico, 3 % de Sacarosa, BA 1.0 ml·L⁻¹, AIA 0.2 ml·L⁻¹, pH a 5.7 ± 0.1 y 7 g·L⁻¹ de agar).

Las cajas con explantes infectados se mantuvieron en co-cultivo por 48 hrs, con fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad, a 25 ± 2 °C

Selección y regeneración de posibles transformantes.

Después del co-cultivo, los explantes se enjuagaron en una solución de 25 mg·L⁻¹ de Meropenem, se eliminó el excedente con papel secante y se colocaron en frascos de vidrio con 20 ml de medio de regeneración selectivo (con 20 mg·L⁻¹ de kanamicina para el vector pBin19 y 0.3 mg·L⁻¹ de fosfotricina para pTF101.1). En esta fase permanecieron 8 semanas, pasando los explantes a medio fresco cada 2 semanas para evitar que la degradación del agente selectivo causara la brotación de falsos transformantes o quimeras.

Los brotes de mas de 2 cm resultantes de la fase anterior fueron transferidos a tubos de ensayo 16 x 120 mm con 15 ml de medio de enraizamiento que contuvo MSG, 150 mg·L⁻¹ de ácido cítrico, 100 mg·L⁻¹ de ácido ascórbico, 3% de Sacarosa, AIB 0.2 mg·L⁻¹, pH a 5.7 ± 0.1 y 7 g·L⁻¹ de agar, en donde permanecieron durante 4 semanas. La selección en esta fase se llevó a cabo con sólo la mitad de la dosis de selección de cada agente.

Las condiciones de incubación de las fases anteriores fueron con fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad, a 25 ± 2 °C. Agregando a los medios 50 mg·L⁻¹ de Meropenem, 750 µl·L⁻¹ de PPM™ (Plant Preservative Mixture) para el control de *A. tumefaciens* y el agente selectivo correspondiente.

Las plantas enraizadas en la fase anterior se retiraron del medio de cultivo y se establecieron en un sustrato constituido por la mezcla de 80 % turba y 20 % de tezontle previamente esterilizada (120 °C, 1.5 lb² de presión, durante 20'). Previamente las raíces se sumergieron en agua con fungicida (Captan® 1 g·L⁻¹);

se utilizaron vasos de plástico transparente de 12 oz para cubrir las plantas, las cuales permanecieron en condiciones de laboratorio con luz solar indirecta durante tres semanas; posteriormente se trasladaron a invernadero, el vaso fue retirado completamente en la tercer semana posterior al trasplante.

Los riegos se realizaron con solución nutritiva Cadahía al 100 % (Cadahía, 1995), cada cinco días al principio, aumentando la frecuencia con el paso de los días. Una vez adaptadas, durante la etapa vegetativa se realizaron cuatro riegos por día de 4 minutos cada uno (400 ml por maceta) y durante la etapa reproductiva se aumentó a siete riegos por día (1000 ml por maceta).

Caracterización de Plantas Transformadas

Evaluación histoquímica de la actividad β -glucoronidasa.

Se llevó a cabo una caracterización con el sistema reportero GUS, para evaluar la expresión estable de este gen en el tejido sometido al protocolo de transformación (Jefferson *et al.*, 1987). La prueba se realizó 28 días después de la agroinfección; se incubaron segmentos de callo y brotes en la solución X-Gluc (5 bromo-4-cloro-3 indolil B-D glucoroido) durante 24 h, a 37 °C en condiciones de oscuridad para llevar a cabo la reacción histoquímica.

Después de 24 horas de incubación se eliminó la solución X-Gluc y se realizaron tres lavados con etanol al 96 % para eliminar la clorofila del tejido y poder visualizar la coloración azul que produce la expresión del gen GUS; para el mantenimiento de las muestras, se sumergen en una solución con glicerol al 50 % a 4 °C.

Las observaciones se realizaron con el microscopio estereoscópico. Se cuantificó el número de brotes azules por explante y porcentaje de explantes transformados.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de plantas transformadas.

A todas las plantas potencialmente transformadas (generación T0) se les extrajo ADN genómico con el método de Dellaporta *et al.* (1983) con ligeras adaptaciones (Apéndice 3). Los productos de extracción se analizaron cuantitativamente mediante espectrofotometría en un Nanodrop. Se ajustó la concentración de las muestras a 100 ng/ μ L.

Se detectó el gen *nptII* de 780 pb (Ghanem, 2011). La mezcla de reacción consistió de 2 μ M dNTPs, 1X buffer PCR (con Mg), 0.5 μ M de cada iniciador (F: 5'-TGA TTG AAC AAG ATG GAT TGC-3' y R: 5'-GAA CTC GTC AAG AAG GCG ATA-3'), 1 U Taq Polimerasa y 200 ng de ADN genómico. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 20 μ L con agua desionizada estéril. Como control positivo se utilizó el plásmido pGUSint en una mezcla con ADN genómico de tomate no transformado y como blanco se utilizó una mezcla con todos los componentes exceptuando el ADN genómico.

La PCR se realizó en un termociclador MaxyGene Gradient con la siguiente programación: 1 ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 60 s, alineamiento a 58 °C por 60 s y extensión a 72 °C por 60 s; y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % y tinción con bromuro de etidio (5 μ g·ml⁻¹), visualizados y fotografiados bajo luz UV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de resistencia

Se puede inferir que la concentración inhibitoria mínima para un agente selectivo en el proceso de transformación no debe causar necrosis (muerte) de los explantes pero si debe reducir la regeneración del tejido, lo que se puede observar en la disminución de la formación y tamaño de los callos (Fani *et al.*, 2012). En este sentido los experimentos de susceptibilidad a diversas sustancias mostraron los siguientes resultados:

Agentes selectivos durante la transformación

Kanamicina. Se observó, que 10 mg·L⁻¹ de kanamicina en el medio de cultivo, no inhibió el crecimiento y desarrollo. En cambio, con 20 mg·L⁻¹ se inhibió completamente todo tipo de respuesta morfogénica en el 100 % de los explantes establecidos, lo que indica a esta dosis como la correcta para la selección de eventos transformantes (Apéndice 2), información que contrasta con la reportada en la literatura en la que se han utilizado dosis de selección en tomate de 100 mg·L⁻¹ (Van Roekel *et al.*, 1993) y 50 mg·L⁻¹ (Gao *et al.*, 2009; Yasmeen, 2009; Kaur & Bansal, 2010; Koul *et al.*, 2014). La selección con kanamicina se utilizó para la transformación con los vectores pGUSint y pBin19.

Fosfinotricina. El sistema de selección utilizando glufosinato de amonio o fosfinotricina (PPT) *in vitro* es de gran valor como una herramienta en el proceso de selección de las plantas transformadas y una alternativa al uso de antibióticos como la kanamicina. Hay un rango muy amplio de dosis de selección de plantas transformadas de tomate que van desde 0.5 mg·L⁻¹ (Fani *et al.*, 2012) hasta 10 y 15 mg·L⁻¹ (Khuong *et al.*, 2013; Koul *et al.*, 2014).

Los resultados de la prueba de susceptibilidad señalan que a los 21 días después del establecimiento en el 100 % de los explantes establecidos, la respuesta morfogénica se induce bajo el rango de dosis de 0 hasta 0.5 mg·L⁻¹, por encima de ésta la respuesta se inhibe hasta llegar a la necrosis del explante. En dosis de

0.1 y 0.2 mg·L⁻¹ se induce una respuesta de tipo organogénica, de 0.3 a 0.5 mg·L⁻¹ la respuesta es de tipo callogénica, lo cual coincide con lo reportado por Fani *et al.*, (2012) quienes determinaron que la concentración óptima para la selección de plantas transformadas en el cultivar MoneyMaker fue de 0.5 mg·L⁻¹ de PPT. Debido a que en la dosis de 0.3 mg·L⁻¹ se inhibió la respuesta organogénica, se determinó a ésta como la dosis de selección en la L3. La selección con este agente, se utilizó para el vector pTF101.1.

Sorbitol. Se ha comprobado que el gen de interés que se busca integrar a las plantas de tomate en esta investigación (*ScTPS1-TPS2*) confiere resistencia a estrés osmótico en plantas transformadas (Parvaiz & Satyawati, 2008), y de acuerdo con Hassan, (2009) el sorbitol actúa como un elemento higroscópico y crea un estrés osmótico.

Las pruebas de susceptibilidad adicionando sorbitol al medio de cultivo, indicó que la respuesta organogénica en el 100 % de explantes establecidos, se inhibe a una concentración de 300 mM y la respuesta callogénica a 600 mM (Apéndice 2), sin embargo se eligió como dosis de selección 500 mM. El sorbitol podría emplearse como agente selectivo alternativo para los genes de biosíntesis de trehalosa (*ScTPS1-TPS2*) en cualquier vector (pBin19 ó pTF101.1).

En el caso de kanamicina y PPT, se observó que a los 28 días de establecidos en las dosis seleccionadas comienza a desarrollarse callo y brotes, respectivamente, por lo que fue necesario definir cambios a medio fresco a los 14 días para que la pérdida de efectividad del agente selectivo no afectara en la selección de células transformadas.

Ensayo de expresión estable del gen GUS

El proceso de transformación genética de plantas es muy compleja e intervienen muchos factores importantes como la adición de acetosiringona, el medio de infección, factores bacterianos (cepa de *Agrobacterium*, la densidad de cultivo),

el vector y los factores específicos de tejido (el genotipo y el tipo de explantes), la composición del medio de cultivo (concentración de fitohormonas), el tipo y la concentración de antibióticos, el tiempo de cocultivo, etc. (Gerszberg *et al.*, 2014).

En el ensayo realizado se observó la transformación sólo en explantes agroinfectados con la cepa C58C1. Se obtuvieron 38 brotes resistentes a kanamicina de 150 infectados, lo que significó un 25.3 % de eficiencia de transformación.

El ensayo histoquímico para la expresión del gen GUS por medio de la tinción con X-gluc a los 28 días mostró brotes sin un color azul uniforme en el 100 % del brote (Figura 10), lo que indicó expresión constitutiva, sin embargo, se observaron también tinción, lo que reveló que el proceso de selección no es tan efectivo y permite el desarrollo de escapes o falsos transformantes.

Los resultados son similares a los obtenidos por Hu & Phillips (2001), quienes utilizaron la misma cepa con el vector pGSFR1161 y el gen de selección nptII y obtuvieron un porcentaje de transformación del 25 %. Por lo general, con la cepa C58C1 se reportan buenos resultados y eficiencias de transformación por arriba de 25 % (McCormick *et al.*, 1986; Chyi & Phillips, 1987; Katia *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 2006).

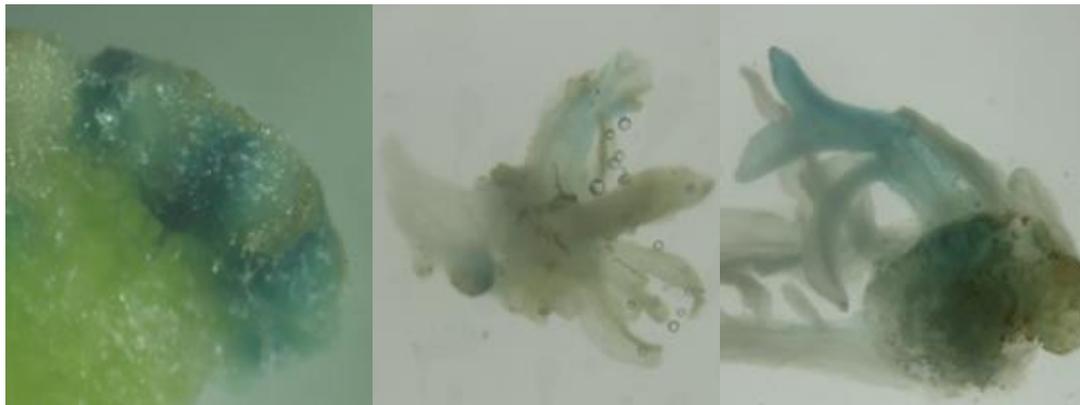


Figura 10. Expresión del gen GUS en explantes de tomate L3 a 28 DDE en medio selectivo con 20 mg·L⁻¹ de kanamicina.

De acuerdo con Pandey *et al.*, (2011) la cepa LBA4404 es la más reportada en estudios de transformación en tomate, con un amplio rango de variación en la eficiencia de transformación que va del 0.4 % a más del 50 %. Sin embargo en este estudio no se obtuvo transformación.

La eficacia de la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* depende de la interacción planta-bacteria, que implica numerosos genes de ambos organismos (Gelvin, 2000).

Obtención de plantas que acumulan trehalosa

Los brotes obtenidos bajo la selección de los respectivos agentes, se adaptaron a condiciones *ex vitro* (Figura 5), se obtuvieron en total 109 plantas con las distintas construcciones (Cuadro 8).

Para validar molecularmente la selección de las líneas consideradas como posibles transformantes y descartar aquellas que a las cuales el transgén no se insertó en el genoma de la planta. Se amplificó por PCR la región correspondiente al gen *nptII*, generando un fragmento de (780 pb) (Figura 11) de 59 líneas sometidas a la prueba; obteniendo una eficiencia de transformación en pBin19 RD29A-Bif de 4.5 % y en pBin19 35S-Bif de 1 %.

Cuadro 8. Eficiencia de transformación de tomate de cuatro construcciones.

| Vector | Explantos Infectados | Brotos resistentes | Porcentaje (%) | No. de plantas adaptadas <i>ex vitro</i> | No. de plantas T0 positivas a PCR* | Eficiencia de transformación |
|--------------------|----------------------|--------------------|----------------|--|------------------------------------|------------------------------|
| pTF101.1 RD29A-Bif | 200 | 40 | 20 | 34 | ND | ND |
| pTF101.1 35S-Bif | 200 | 34 | 17 | 16 | ND | ND |
| pBin19 RD29A-Bif | 200 | 69 | 34.5 | 37 | 9 | 4.5 % |
| pBin19 35S-Bif | 200 | 39 | 19.5 | 22 | 2 | 1 % |

ND: No Determinado



Figura 11. Proceso de transformación genética por agroinfección en tomate L3. A: Co-cultivo de explantes de hoja de tomate; B: Regeneración por organogénesis directa de brotes resistentes al agente selectivo 28 DDE; C: Enraizamiento de brotes resistentes al agente selectivo; D: Aclimatación de plantas resistentes al agente selectivo; E: Posibles plantas transformadas adaptadas en invernadero; F: Etapa de floración de las plantas adaptadas en invernadero; G: Fructificación de las posibles plantas transformadas.

Los resultados contrastan con los obtenidos por Agharbaoui *et al.* (1995), quienes en dos variedades de *Solanum chilense* utilizando el vector pBin19 con el gen *nptII* obtuvieron un 56 y 25 % de eficiencia de transformación. Asimismo Ellul *et al.* (2003) y Cortina y Culianez – Macia (2004) en diferentes variedades de *Solanum lycopersicum* L., obtuvieron un rango de eficiencia de transformación de 1.8 a 12.5 % con el mismo vector. Sin embargo en estos trabajos se utilizó una dosis de selección de 50 a 100 mg·L⁻¹, lo que indicó que deben realizarse mejoras en el proceso de selección para aumentar la eficiencia.



Figura 12. Fragmento amplificado (*nptII*), de plantas transformadas de tomate

En las plantas de las dos construcciones del vector pTF101.1 no se pudieron establecer las condiciones de la PCR para amplificar el gen de selección *bar* ni los genes *ScTPS1* y *ScTPS2*, debido a que los iniciadores utilizados generaron amplificaciones inespecíficas, por lo cual habrá que diseñar otros iniciadores o tratar de detectar los transcritos de los mismos genes mediante RT-PCR, siguiendo los procedimientos utilizados en trabajos similares previos (Cuellar, 2015).

CONCLUSIÓN

Se logaron obtener brotes transformados con la cepa C58C1 (pGUSint), en frecuencias de hasta 25 %, mientras que la cepa LBA4404 (pGUSint) no mostró capacidad de infección para el genotipo ni para las condiciones en que se establecieron. Asimismo la tinción mostró que la dosis de selección de kanamicina no era la adecuada al permitir el desarrollo de brotes no transformados, por lo que se recomienda afinar este proceso.

Con la construcción bifuncional ScTPS1-TPS2 para la sobreexpresión de trehalosa, se obtuvieron 9 plantas transgénicas con el gen *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS* y 2 con *35S::ScTPS1-TPS2::NOS*, con eficiencias de transformación de 4.5 y 1 % respectivamente. Al observar muchos falsos transformantes, se recomienda afinar el proceso de selección.

El siguiente paso en la investigación, es caracterizar molecular, bioquímica y fisiológicamente los eventos transformados con los genes de biosíntesis de trehalosa.

LITERATURA CITADA

- Agharbaoui, Z., Greer, A. F., & Tabaeizadeh, Z. (1995). Transformation of the wild tomato *Lycopersicon chilense* Dun. By *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant cell reports*, 15(1), 102-105. doi:10.1007/BF01690263
- Cadahía, L. C. (1995). Fertilización. pp. 167–187. In: F. Nuéz (ed.). El cultivo del tomate. Mundi Prensa. Madrid, España.
- Chávez, L., & González, L. M. (2009). Mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad. *ITEA*, 105(4), 231-256.
- Chyi, Y. S., & Phillips, G. C. (1987). High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. *Plant cell reports*, 6(2), 105-108.
- Cortina, C., & Culiáñez-Macià, F. A. (2005). Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*, 169(1), 75-82. doi:10.1016/j.plantsci.2005.02.026.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223(4637), 701-703.
- Cuellar, O. R. (2015). Plantas transgénicas de crisantemo que acumulan trehalosa muestran tolerancia a estrés biótico y abiótico. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Chapingo.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. (1983). A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., & Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R–27R.
- Ellul, P., Garcia-Sogo, B., Pineda, B., Rios, G., Roig, L., & Moreno, V. (2003). The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2), 231-238.
- Fani, M. O., Versiani, A. F., Dias, A. C. F., Xisto, M. F., Otoni, W. C., de Oliveira, L. L. & de Paula, S. O. (2012). Analysis of the Inhibitory Concentration of Ammonium Glufosinate in Cotyledons Explants of Tomato Plants (*Solanum lycopersicon*). *Biotechnology*, 11(3), 184.
- FAOSTAT. FAO Statistics Division (2016). (Consultado en <http://www.fao.org/statistics/es/>, noviembre de 2016).
- Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5.

- Gao, X., K. Liu, and Y.T. Lu. (2009). Specific roles of AtEXPA1 in plant growth and stress adaptation. *Russ. J. Plant Physiol.* 57:241–246. doi:10.1134/S102144371002011
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 881-902.
- Gelvin, S.B. (2000). Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 223–256.
- Ghanem, S. (2011). Cloning of the nptII gene of Escherichia coli and construction of a recombinant strain harboring functional recA and nptII antibiotic resistance. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1445–1454.
- Hu, W., and G.C. Phillips. (2001). A combination of overgrowth- control and antibiotics improves *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation efficiency for cultivated tomato (*L. esculentum*). *In Vitro Cell. Biol. Plant* 37:12–18. doi:10.1007/s11627-001-0003-4.
- Hassan, M., Ahmed, Z., Munir, M., Malik, S. I., & Shahzad, K. (2009). Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African Journal of Biotechnology*, 8(23).
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant molecular biology reporter*, 5(4), 387-405.
- Katia, H., J. Lipp, and T.A. Brown. (1993). Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rifr:pGSFR1161 in the presence of acetosyringone. *Plant Cell Rep.* 12:422–425.
- Kaur, P., & Bansal, K. C. (2010). Efficient production of transgenic tomatoes via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biologia Plantarum*, 54(2), 344-348.
- Khuong, T. T. H., Crété, P., Robaglia, C., & Caffarri, S. (2013). Optimisation of tomato Micro-tom regeneration and selection on glufosinate/Basta and dependency of gene silencing on transgene copy number. *Plant cell reports*,32(9), 1441-1454.
- Koul, B., Srivastava, S., Amla, D. V., & Sanyal, I. (2014). Establishment and optimization of agrobacterium-mediated transformation and regeneration of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Biosciences (IJB)*,4(10), 51-69.
- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., & Fraley, R. (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 5, 81-84.

- Miranda, J. A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J. M., Van Dijck, P., & Iturriaga, G. (2007). A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 226(6), 1411-1421.
- Pandey, S., Nookaraju, A., Upadhyaya, C., Gururani, M., Venkatesh, J., Doo-Hwan, K. & Park, S. (2011). An Update on Biotechnological Approaches for Improving Abiotic Stress Tolerance in Tomato. *Crop Science*, 51: 2303-2324
- Parvaiz, A., & Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. *Plant Soil and Environment*, 54(3), 89.
- Ramírez, H., Lentini, Z., & Vallejo Cabrera, F. A. (2009). Evaluation and selection of a protocol for in vitro regeneration of tomato variety Unapal-Arreboles. *Acta Agronómica*, 58(1), 29-33.
- Santiago, J., & Borrego, F. (1998). Evaluación de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) en invernadero: criterios fenológicos y fisiológicos. *Agronomía mesoamericana*, 9(1), 59-65.
- Sun, H.J., Uchii, S., Watanabe, S. & Ezura, H. (2006). A high efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol.*, 47:426–431.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., & Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, 220(2), 245-250.
- Van Roekel, J. S., Damm, B., Melchers, L. S., & Hoekema, A. (1993). Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Reports*, 12(11), 644-647.
- Yasmeen, A. (2009). An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv Rio Grande). *Acta physiologiae plantarum*, 31(6), 1271.
- Zheng, Y., He, X. W., Ying, Y. H., Lu, J. F., Gelvin, S. B., & Shou, H. X. (2009). Expression of the *Arabidopsis thaliana* histone gene AtHTA1 enhances rice transformation efficiency. *Molecular plant*, 2(4), 832-837.

APÉNDICES

Apéndice 1. Análisis de varianza de la regeneración de tomate.

Cuadro 9. Cuadrados medios del análisis de varianza para organogénesis.

| FV | GL | CM | | |
|-----------------------|----|------------|-----------|---------|
| | | NB | LB | TAM |
| ORIGEN | 1 | 141.06 *** | 16.22 *** | 7.35 ** |
| MEDIO | 2 | 13.85 | 0.86 | 1.61 |
| ORIGEN X MEDIO | 2 | 7.81 | 0.36 | 8.75 |
| ERROR | 54 | 6.01 | 0.81 | 1.30 |
| TOTAL | 59 | | | |
| CV | | 70.05 | 68.88 | 37.05 |
| MEDIA | | 3.5 | 1.31 | 3.08 |

***P≤0.001; **P≤0.01;

NB = Número de brotes, LB = Longitud de brote, TAM = Expansión de explante

Cuadro 10. Cuadrados medios del análisis de varianza para enraizamiento.

| FV | GL | CM | | |
|--------------------|----|------------|-----------|-------|
| | | NR | LR | DFR |
| TRATAMIENTO | 4 | 472.18 *** | 82.24 *** | 2.93 |
| ERROR | 60 | 18.05 | 6.14 | 7.44 |
| TOTAL | 64 | | | |
| CV | | 46.02 | 30.27 | 40.38 |
| MEDIA | | 9.23 | 8.19 | 6.75 |

*** P≤0.001; NR = Número de raíces; LR = Longitud de raíces; DFR = Días a la formación de raíces.

Apéndice 2. Construcciones utilizadas en la transformación genética de tomate.

Vector p35SGUSint

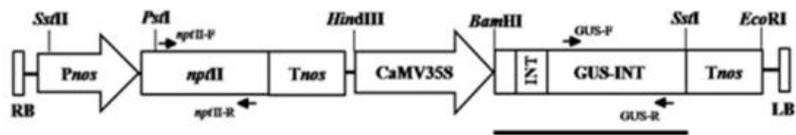


Figura 13. Vector 35SGUS-INT con el gen *uidA* con el promotor CaMV35S y un intrón de 190 pb (Vancanneyt *et al.*, 1990).

Vector pBin19

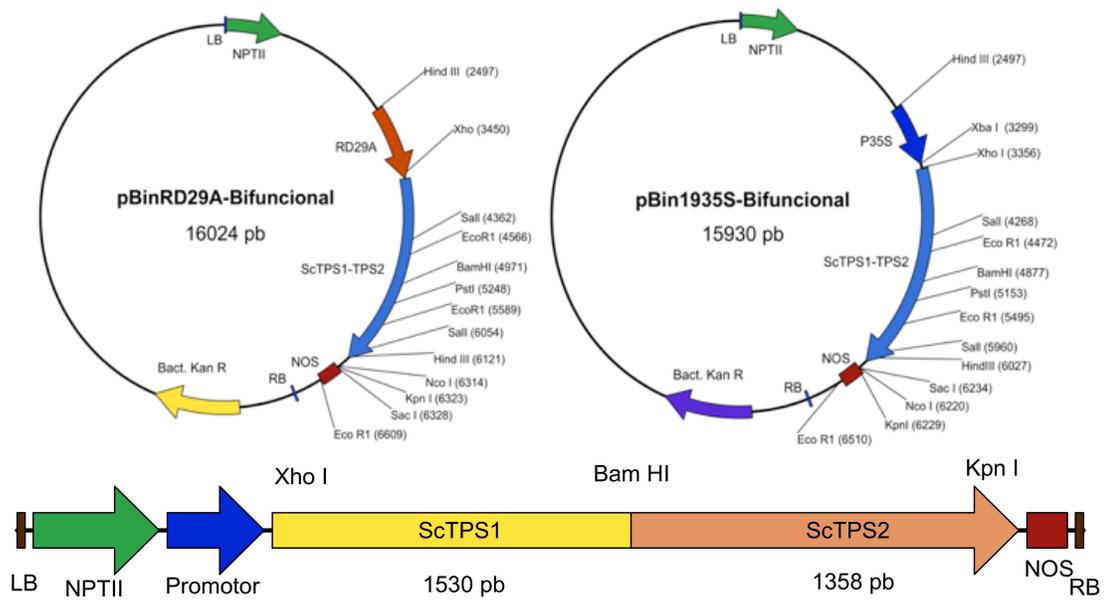


Figura 14. Vector pBin19 con el gen de selección *nptII* y los genes *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS*, donde RD29 es el promotor inducible y B) *35S::ScTPS1TPS2::NOS*, donde 35S es el promotor constitutivo

Vector pTF101.1

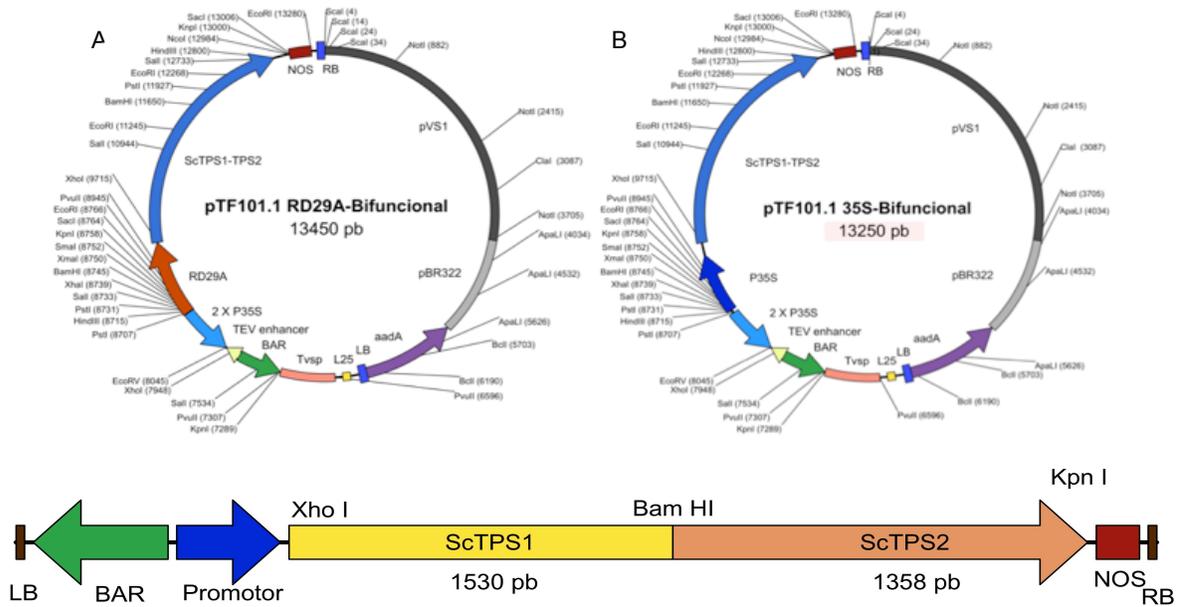


Figura 15. Vector pTF101.1 con el gen de selección *bar* y los genes *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS*, donde RD29 es el promotor inducible y B) *35S::ScTPS1TPS2::NOS*, donde 35S es el promotor constitutivo.

Apéndice 3. Ensayos de resistencia para el establecimiento de dosis de selección.

Kanamicina



Figura 16. Explantes de hoja de Tomate L3 cultivados durante 21 días en medio de regeneración con Kanamicina; T0: Testigo; T1: 10 mg·L⁻¹; T2: 20 mg·L⁻¹; T3: 30 mg·L⁻¹; T4: 40 mg·L⁻¹; T5: 50 mg·L⁻¹; T6: 60 mg·L⁻¹; T7: 80 mg·L⁻¹; T8: 100 mg·L⁻¹.

Fosfinotricina

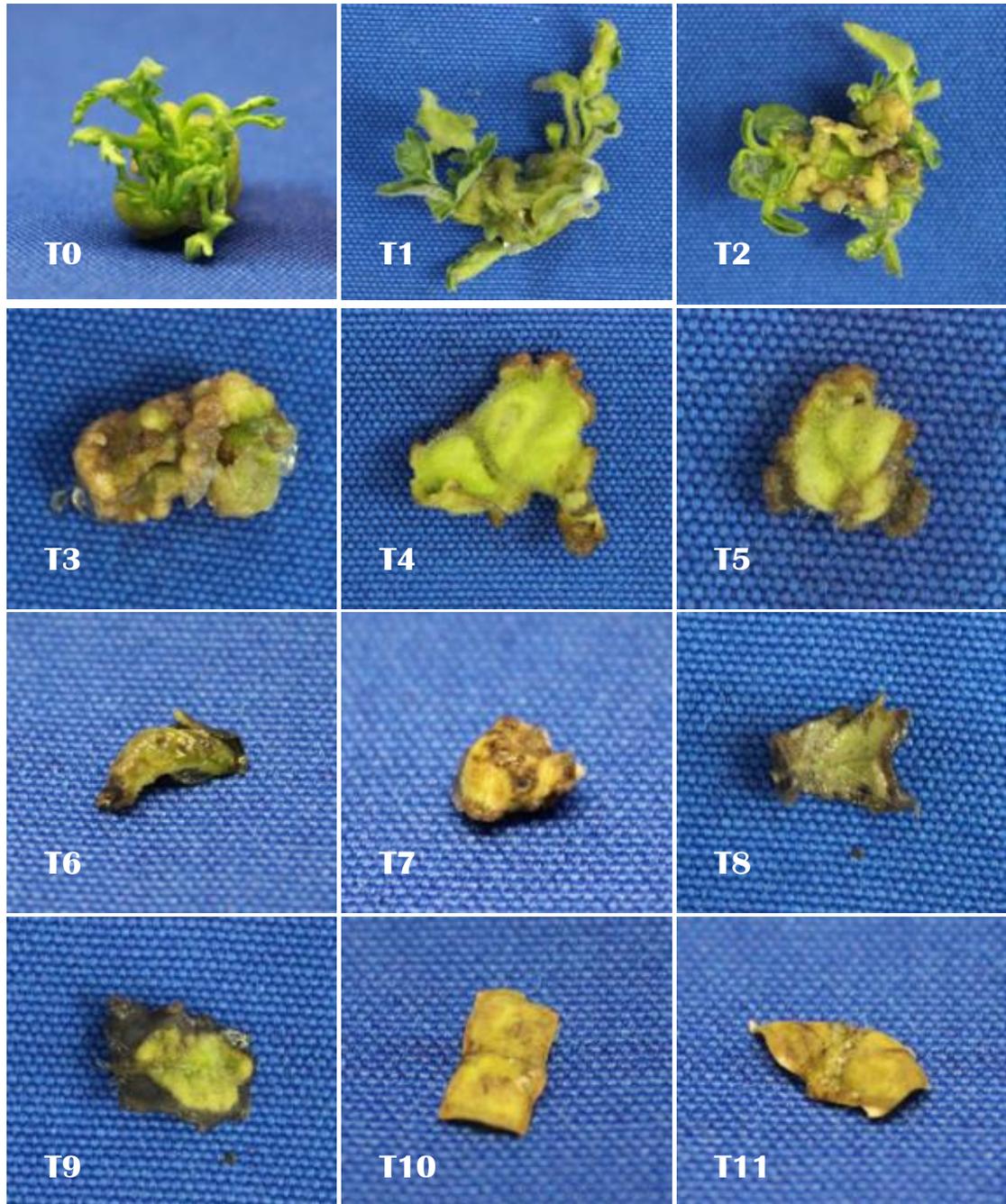


Figura 17. Explantes de hoja de Tomate L3 cultivados durante 21 días en medio de regeneración adicionado con Fosfinitricina; T0: Testigo; T1: 0.1 mg·L⁻¹; T2: 0.2 mg·L⁻¹; T3: 0.3 mg·L⁻¹; T4: 0.4 mg·L⁻¹; T5: 0.5 mg·L⁻¹; T6: 0.6 mg·L⁻¹; T7: 0.7 mg·L⁻¹; T8: 0.8 mg·L⁻¹; T9: 0.9 mg·L⁻¹; T10: 1.0 mg·L⁻¹; T11: 1.5 mg·L⁻¹

Sorbitol



Figura 18. Explantes de hoja de Tomate L3 cultivados durante 21 días en medio de regeneración adicionado con Sorbitol; T0: Testigo; T1: 100 mM de Sorbitol; T2: 200 mM de Sorbitol; T3: 300 mM de Sorbitol; T4: 400 mM de Sorbitol; T5: 500 mM de Sorbitol; T6: 600 mM de Sorbitol; T7: 700 mM de Sorbitol; T8: 800 mM de Sorbitol.

Apéndice 4. Aislamiento de ADN genómico de tejido vegetal

1. Se toman 200 mg de tejido vegetal y con nitrógeno líquido se maceran en un tubo eppendorf® o en un mortero pre-enfriado.
2. Adicionar 750 µl del buffer de extracción, mezclar suavemente y calentar a 65 °C por 10 minutos invirtiendo los tubos ocasionalmente.
3. Añadir 200 µl de una solución 5 M de acetato de potasio, mezclar por inversión y mantener los tubos en hielo por 30 minutos.
5. Centrifugar a 15 000 xg a 4 °C por 20 minutos.
6. Transferir el sobrenadante (450 µl por tubo) a dos tubos eppendorf® nuevos con 500 µl de isopropanol (del congelador) cada uno. Incubar por 30 minutos a – 20 °C.
7. Centrifugar, eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 200 µl de solución de dilución del ADN.
8. Añadir 2 µl de una solución de ARNasa e incubar por una hora a 37 °C.
9. Añadir 20 µl de acetato de sodio 3M y 200 µl de isopropanol frío (del congelador) e incubar a –20 °C por 30 a 120 minutos.
10. Colectar el ADN con un palillo estéril, pasarlo a otro tubo eppendorf® y lavarlo con etanol al 70%, dos veces.
11. Secar el pellet y luego resuspenderlo en unos 20 µl de agua desionizada estéril o de buffer TE, determinar la concentración en un espectrofotómetro Nanodrop® y almacenarlo a 4 °C si se va a utilizar pronto, o a -20 °C y se va a utilizar en semanas o meses.

Soluciones y Buffers

Buffer de extracción

| | |
|-------------------------|----------------|
| NaCl | 500 mM |
| EDTA | 50 mM |
| Tris-HCl | 100 mM, pH 8.0 |
| SDS | 1.3 % |
| β -mercaptoetanol | 0.2% |

Buffer de dilución

| | |
|----------|---------------|
| Tris-HCl | 50 mM, pH 8.0 |
| EDTA | 10 mM |

Buffer TE

| | |
|----------|---------------|
| Tris-HCl | 10 mM, pH 8.0 |
| EDTA | 1 mM |

Acetato de sodio 3M, pH 5.2

Acetato de potasio 5 M

Etanol al 70% en agua

ARNasa a 10 mg/ml, en Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 5 mM, glicerol 50%, pH 7.0. Antes de usar, hervir en agua por 30 minutos.

Apéndice 5. Distribución de plantas en el invernadero

| | | | | | | | |
|---------------|--------------------------|--|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| NPTII35S-6 | NPTII35S-8 NPTII35S-7 | BARRD-15 BARRD-17 | BARRD-16 BARRD-18 | NPTIIRD-8 NPTIIRD-11 | NPTIIRD-6 NPTIIRD-10 | | NPTIIRD-50 NPTIIRD-48 |
| NPTII35S-1 | NPTII35S-4 NPTII35S-2 | BARRD-19 BARRD-23 | BARRD-22 BARRD-24 | NPTIIRD-14 NPTIIRD-15 | NPTIIRD-12 NPTIIRD-16 | NPTIIRD-44 | NPTIIRD-47 NPTIIRD-46 |
| BAR35S-4 | BAR35S-5 BAR35S-3 | BARRD-26 BARRD-28 | BARRD-28 BARRD-26 | NPTIIRD-18 BARRD-49 | NPTIIRD-20 BARRD-47 | NPTIIRD-42 | NPTIIRD-43 NPTIIRD-41 |
| BAR35S-2 | BAR35S-1 T2BAR35S-2 | BAR35S-7 GUST3-3 | BAR35S-6 BAR35S-9 | BARRD-46 BARRD-41 | BARRD-43 BARRD-39 | NPTIIRD-40 NPTIIRD-38 | NPTIIRD-39 NPTIIRD-37 |
| BARRD-13 | BARRD-12 BARRD-9 | GUST3-1 GUST2-3 | GUST3-2 | BARRD-37 BARRD-33 | BARRD-34 BARRD-30 | NPTIIRD-35 NPTIIRD-33 | NPTIIRD-34 NPTIIRD-31 |
| BARRD-7 | BARRD-10 BARRD-7 | GUST1-3 GUST1-2 | GUST1-1 | BARRD-29 BARRD-21 | BARRD-25 BARRD-14 | NPTIIRD-29 NPTIIRD-27 | NPTIIRD-28 NPTII35S-26 |
| BARRD-6 | BARRD-4 BARRD-5 | GUST1-2 NPTIIRD-9 | NPTIIRD-13 NPTIIRD-5 | BAR35S-20 BAR35S-15 | BAR35S-16 BAR35S-13 | NPTII35S-27 NPTII35S-25 | NPTII35S-26 NPTII35S-24 |
| BARAVP1-12 | BARAVP1-13 BARAVP1-10 | NPTIIRD-7 NPTIIRD-4 | NPTIIRD-3 NPTIIRD-2 | BAR35S-12 BAR35S-10 | BAR35S-11 BAR35S-8 | NPTII35S-23 NPTII35S-21 | NPTII35S-22 NPTII35S-19 |
| BARAVP1-8 | BARAVP1-9 BARAVP1-8 | NPTIIRD-10 GUST3-6 | GUST3-4 | NPTII35S-9 NPTII35S-11 | NPTII35S-5 NPTII35S-10 | | |
| BARAVP1-6 | BARAVP1-7 BARAVP1-6 | GUST3-8 BARAVP1-16 | BARAVP1-15 BARAVP1-18 | NPTII35S-14 NPTII35S-17 | NPTII35S-12 NPTII35S-15 | | |
| BARAVP1-4 | BARAVP1-5 BARAVP1-4 | GUST3-8 BARAVP1-19 | BARAVP1-15 BARAVP1-18 | | | | |
| | BARAVP1-14 | BARAVP1-21 BARAVP1-20 | BARAVP1-15 BARAVP1-18 | | | | |
| PUERTA | | Plantas transgénicas, según la detección del gen <i>nptII</i> mediante PCR | | | | | |

Figura 19. Cróquis de localización de plantas posiblemente transformadas en el invernadero. Nomenclatura: Gen de selección, gen de interés, número de evento.

