



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE PLANTAS SELECTAS DE
TOMATE DE CASCARA (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)
PARA CRUZAS INTERCLONALES**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA**



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

PRESENTA:

HÉCTOR LUNA VICENTE

**Bajo la supervisión de:
Dr. Aureliano Peña Lomelí**

Chapingo, Estado de México. Junio de 2019

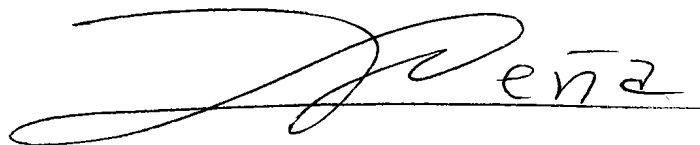


**PROPAGACIÓN *in vitro* DE PLANTAS SELECTAS DE TOMATE DE
CASCARA (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) PARA CRUZAS
INTERCLONALES**

Tesis realizada por Héctor Luna Vicente bajo la supervisión del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener
el grado de:

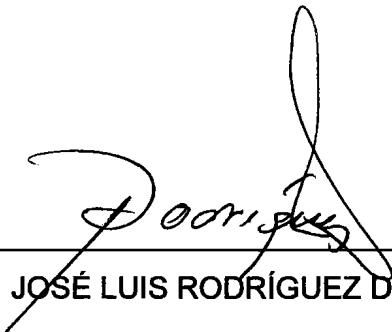
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



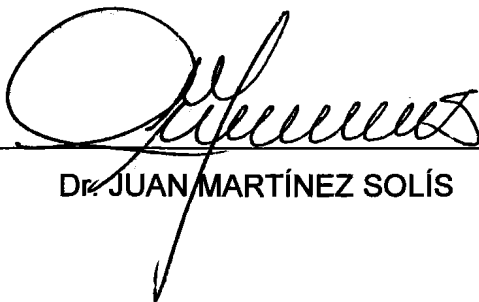
Dr. AURELIANO PEÑA LOMELÍ

ASESOR:



Dr. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR:



Dr. JUAN MARTÍNEZ SOLÍS

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
AGRADECIMIENTOS	ix
DEDICTORIA	x
DATOS BIOGRÁFICOS	xi
RESUMEN GENERAL	xii
GENERAL SUMMARY	xiii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Objetivo general	3
Objetivos particulares	3
Hipótesis	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos generales del tomate de cáscara	4
2.1.1 Importancia económica	4
2.1.2 Origen y distribución del tomate de cáscara	5
2.1.3 Clasificación taxonómica y descripción botánica del tomate	5
2.2 Autoincompatibilidad	7
2.2.1 Sistema heteromórfico	8
2.2.2 Sistema homomórfico	8
2.2.3 Sistema gametofítico	9
2.2.4 Sistema esporofítico	9
2.3 Mejoramiento genético del tomate de cáscara	10
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos vegetales	12

2.4.1 Usos de la micropropagación.....	12
2.4.4 Importancia de los medios de cultivo	15
2.4.5 Sistemas para la regeneración de plantas por micropropagación	18
2.4.6 Etapas de desarrollo en micropropagación	21
2.4.7 Factores ambientales que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	34
2.4.8 Sistemas de micropropagación automatizada y cultivo en liquido (biorreactor)	36
2.5 Propagación <i>in vitro</i> de tomate de cáscara.....	37
2.6 Literatura citada	39
3. PROPAGACIÓN <i>in vitro</i> DE FAMILIAS DE PLANTAS SELECTAS DE TOMATE DE CÁSCARA (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Horm.)	51
RESUMEN	51
ABSTRACT	52
3.1 Introducción.....	53
3.2. Materiales y métodos	56
3.2.1 Ubicación de la fase experimental	56
3.2.2 Material vegetal	56
3.2.3 Obtención de yemas y establecimiento aséptico.....	58
3.2.4 Propagación <i>in vitro</i> de yemas, enraizamiento y evaluación	58
3.2.5 Aclimatización de plantas	59
3.2.6 Establecimiento bajo invernadero	59
3.2.7 Variables evaluadas.....	60
3.2.8 Diseño experimental	60
3.2.9 Análisis de datos.....	60
3.3 Resultados y discusión.....	61
3.3.1 Cultivo <i>in vitro</i>	61

3.3.2 Aclimatización.....	66
3.3.3 Establecimiento bajo invernadero	69
3.4 Conclusiones.....	77
3.5 Literatura citada	77

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Soluciones stock (gr L^{-1}) usadas en la preparación de varios medios de cultivo para micropropagación ^a	16
Cuadro 2. Comparación de medias para altura de planta, longitud de raíz, número de hojas, raíces, tallos y botones tomadas de plantas de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Horm.) <i>in vitro</i>	62
Cuadro 3. Prueba de Kruskal-Wallis para vigor de tallo y comparación de proporciones binomiales para presencia de callo y sanidad en plantas de tomate de cascara (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Horm) regeneradas <i>in vitro</i>	64
Cuadro 4. Comparación de medias para altura de planta, número de hojas, flores, botones y tallos tomadas de plantas de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Horm.) regeneradas <i>in vitro</i> para aclimatización.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de mejoramiento genético para la obtención de Familias Selectas de Medios Hermanos Maternos de las cuatro variedades de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Horm.) y selección para cultivo <i>in vitro</i>	58
Figura 2. Plantas de las familias clonales cultivadas <i>in vitro</i> . a) Planta de la familia 2b de la variedad Morado San Miguel. b) Planta de la familia 2 de la variedad Tecozautla 04.	62
Figura 3. Sistema radicular cultivada <i>in vitro</i> de la planta de la familia 3 de la variedad Tecozautla 04.	63
Figura 4. Plantas obtenidas de cultivo <i>in vitro</i> al inicio de la aclimatización. a) Todas las familias de clones de las variedades Morado San Miguel, Tecozautla 04 y Manzano Tepetlixpa. b) Plantas de la familia 1 de Morado San Miguel.	68
Figura 5. Plantas obtenidas cultivo <i>in vitro</i> después de 15 días de aclimatización. a) Sistema de aclimatización bajo nebulización y malla sombra en invernadero. b) Familias de plantas de las tres variedades de tomate de cáscara después de 10 días de aclimatización.	69
Figura 6. Comparación de medias de altura de planta de las familias de clones de las tres variedades de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Horm.) bajo invernadero a lo largo de 75 días a partir de la aclimatización. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).	70
Figura 7. Plantas aclimatizadas trasplantadas al invernadero. a) planta de la familia clonal 2b de la variedad Morado San Miguel. b) Planta de la familia clonal 2 de la variedad Manzano Tepetlixpa.	71
Figura 8. Comparación de medias de número de bolsas en plantas de las familias de clones de las tres variedades de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Horm.) bajo invernadero a lo largo de 75 días a partir de la aclimatización.	

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).....	72
Figura 9. Plantas obtenidas <i>in vitro</i> a los 75 días después de la aclimatización bajo invernadero. a) Flores de las plantas de la familia clonal 1 de la variedad Morado San Miguel. b) Frutos desarrollados de la familia clonal 2 de la variedad Morado San Miguel.....	72
Figura 10. Comparación de medias de número de flores de plantas de las familias de clones de las tres variedades de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Horm.) bajo invernadero a lo largo de 75 días a partir de la aclimatización. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).....	73
Figura 11. Comparación de medias de número de hojas de plantas de las familias de clones de las tres variedades de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Horm.) bajo invernadero a lo largo de 75 días a partir de la aclimatización. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).....	74
Figura 12. Fenología de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Horm.) de plantas obtenidas <i>in vitro</i>	75
Figura 13. Frutos amarrados de cruza interclonales. a) Fruto de la cruza interclonal entre la familia 3 de Tecozautla 04 y 2 de Manzano Tepetlixpa. b) Fruto de la cruza interclonal entre la familia 1 y 2a de Morado San Miguel.	76
Figura 14. Planta obtenida <i>in vitro</i> de la familia 2a de Morado San Miguel con síntomas de enfermedad.	77

AGRADECIMIENTOS

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

A mi comité asesor: Dr. Aureliano Peña Lomelí, Dr. José Luis Rodríguez de La O y Dr. Juan Martínez Solís, por su total disposición, confianza y gran ayuda en la realización de la presente tesis y durante mis estudios.

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

A mi familia, mi papá Vicente y principalmente a mi madre, Gelacia quien siempre está a mi lado para apoyarme. A mis hermanos Edgar y Arisaid por su apoyo.

A una persona muy especial para mí, María de los Ángeles H. A., que me brinda siempre incondicionalmente su grata compañía y apoyo, me alienta a seguir adelante.

Al personal técnico del Programa de Mejoramiento Genético de Tomate de Cáscara (César Ayala Monsalvo) y del Laboratorio de Cultivo de Tejidos (Dr. Gabriel Ramírez González y Lic. Admón. Pública Gisela García De La Rosa) por su amabilidad, disposición y apoyo para conmigo en este trabajo.

A mis amigos Lucía, Luis Enrique, Diana, Germán y Rosy por pasar a mi lado los momentos de mi vida universitaria, por compartir nuestros conocimientos adquiridos en la universidad y estar siempre en las buenas y en las malas.

DEDICTORIA

A Dios por permitirme el maravilloso regalo de vivir y la gran oportunidad de estudiar.

A mis padres Vicente Luna Neria y Gelacia Vicente De Dios por su gran ejemplo de superación, su apoyo incondicional, sabios consejos y tanto amor que me demuestran día con día.

A mi hermano Edgar y hermana Arisadaíd Luna Vicente por su gran amor y ejemplo de superación.

A mi abuela Paciana De Dios Josento por su gran amor y con su gran ejemplo de trabajo me ha enseñado el amor al campo.

A una persona muy especial, María de los Ángeles Hernández Andrade que, con su valiosa compañía y gran cariño, alegra mucho siempre mi existir.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Héctor Luna Vicente

Fecha de nacimiento: 29 de enero de 1989

Lugar de nacimiento: Xicotepec de Juárez, Puebla.

CURP: LUVH890129HPLNCC04

Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia

Cédula profesional: 10889587



Desarrollo académico

Bachillerato: 2004-2007 Bachillerato General Oficial “José Vasconcelos”

Licenciatura: 2007-2011 Universidad del Desarrollo del Estado de Puebla

Licenciatura: 2011-2016 Departamento de Fitotecnia

Maestría: 2017-2018 Departamento de Fitotecnia

RESUMEN GENERAL

PROPAGACIÓN *in vitro* DE PLANTAS SELECTAS DE TOMATE DE CASCARA (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) PARA CRUZAS INTERCLONALES

Con el objetivo de propagar *in vitro* plantas selectas de *Physalis ixocarpa* para hacer cruza interclonales, fue evaluada la respuesta *in vitro* de ápices de tallo en familias de las variedades Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa y Morado San Miguel. Las plantas producidas *in vitro* se aclimatizaron y se trasplantaron en invernadero para dar seguimiento a su ciclo fenológico. Asimismo, los ápices se cultivaron en un medio básico con las sales inorgánicas Murashige y Skoog (100 %) suplementado con 0.4 mg·L⁻¹ de tiamina, 60 mg·L⁻¹ de L-cisteína, 100 mg·L⁻¹ de myo-inositol, 0.5 mg·L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg·L⁻¹ de ácido pantoténico, 3 % de sacarosa, 7 g·L⁻¹ de agar, sin reguladores del crecimiento y un pH a 5.7 ± 0.1. El enraizamiento *in vitro* se hizo durante 30 días con 16 horas de luz a 3000 µmol·m⁻²·s⁻¹. Las variables evaluadas *in vitro* fueron altura de plántula, vigor, callo, longitud de raíz, número de hojas, raíces, tallos y botones, bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las variables evaluadas en invernadero en aclimatización fueron altura de planta, número de hojas, botones, y flores, en tanto que durante el ciclo fenológico se midió altura de planta, número de hojas, flores y bolsas. En ambos casos bajo invernadero se usó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Se hizo análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey (p = 0.05), mientras que para el vigor se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y para presencia de callo se hizo comparación de proporciones binomiales (p = 0.05). Las familias con mejores respuestas morfogénicas *in vitro* fueron de las variedades Tecozautla 04 y Manzano, así como en el desarrollo fenológico, donde presentaron una mayor altura de planta. En la aclimatización la sobrevivencia fue de 100 % en todos los materiales. Las respuestas *in vitro*, la aclimatización y la fenología dependieron de la variedad.

Palabras clave: aclimatización, cultivo *in vitro*, fenología.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Ing. Héctor Luna Vicente
Director de Tesis: Dr. Aureliano Peña Lomelí

GENERAL SUMMARY

***In vitro* PROPAGATION OF SELECT PLANTS OF HUSK TOMATO (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) FOR INTERCLONAL CROSSES**

The objective of this study was to propagate *in vitro* select plants of *Physalis ixocarpa* to produce interclonal crosses. The *in vitro* response of stem apices was assessed in families of the varieties Tecozautla 04, Manzano Tepetlaxpa and Morado San Miguel. The plants produced *in vitro* were acclimatized and transplanted under greenhouse to follow their phenological cycle. Likewise, apices were cultivated in a basic medium with inorganic salts Murashige and Skoog (100 %) supplemented with 0.4 mg L⁻¹ thiamine, 60 mg L⁻¹ L-cysteine, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 0.5 mg L⁻¹ nicotinic acid, 0.5 mg L⁻¹ pantothenic acid, 3 % sucrose, 7 g L⁻¹ agar, without growing regulators and a pH of 5.7 ± 0.1. The *in vitro* rooting was done during 30 days with 16 hours of light at 3000 µmol·m⁻²·s⁻¹. The *in vitro* evaluated variables were seedling height, vigor, callus, root length, leaves number, roots, stems and buds, under a completely randomized design with four replicates. The evaluated variables in greenhouse during acclimatization were: plant height, leaves number, buds, and flowers, while during the phenological cycle, the variables plant height, and leaves number, flowers and bags were measured. In both cases under greenhouse conditions, a randomized complete blocks design, with four replicates, was used. An analysis of variance and Tukey means comparison tests were made (P = 0.05), while for vigor, the Kruskal-Wallis test was used and for the presence of callus a comparison of binomial proportions (P = 0.05) was made. The families with higher morphogenetic responses *in vitro* were of the Tecozautla 04 and Manzano varieties, as well as in the phenological development where they presented a higher plant height. In the acclimatization period, the survival was of a 100 % in all materials. The *in vitro* responses, acclimatization, and phenology depended on the variety.

Key words: acclimatization, *in vitro* culture, phenology.

² Thesis of Horticultural Sciences MSc program, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Ing. Héctor Luna Vicente
Advisor: Dr. Aureliano Peña Lomelí

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot ex. Horm) es la séptima hortaliza más cultivada en México; en el año 2018 se sembraron 24,235 hectáreas bajo riego y 7,821 hectáreas de temporal con un rendimiento promedio para 17.8 t ha⁻¹ (SIAP, 2018). En 2017 la producción total de tomate de cáscara fue de 773,351 toneladas, el 55 % de este fruto lo producen en primer lugar el estado de Sinaloa, seguido de Zacatecas, Jalisco, Puebla y Michoacán (SIAP, 2018). De 2012 a 2018, las exportaciones de tomate de cáscara han tenido un incremento de nueve mil toneladas en promedio por año, siendo Estado Unidos el principal destino de exportación (SIAP, 2018). Debido a las condiciones ambientales extremas por el cambio climático, la gran demanda del mercado interno y la creciente demanda de los mercados internacionales, se requieren de variedades mejoradas más rendidoras y adaptadas a condiciones diversas. Las variedades actuales disponibles en el mercado se han generado mediante selección, o son variedades nativas que los productores seleccionan y conservan y que algunas empresas producen su semilla, debido a que la especie presenta autoincompatibilidad gametofítica (Pandey, 1957; Peña *et al.*, 2014).

Por la característica de autoincompatibilidad, el tomate de cáscara se considera una alógama obligada y los métodos de mejoramiento genético más apropiados son la selección masal, la selección familiar de medios hermanos y la selección combinada de medios hermanos. Asimismo, debido a que la autoincompatibilidad dificulta generar líneas mediante autofecundación, en tomate de cáscara no es posible la formación de híbridos entre líneas altamente endogámicas (Peña y Márquez, 1990).

No obstante, se han generado híbridos intervarietales de rendimiento superior respecto al mejor progenitor, desde 14.3 % hasta 138.7 % (Peña *et al.*, 1998; Sahagún *et al.*, 1999). Además, se generaron híbridos de cruce simple entre plantas S₀ de las variedades CHF1 Chapingo (A_{S0}) y Puebla (B_{S0}) que superaron

en rendimiento de fruto hasta en 39.2 % a la mejor variedad (Santiaguillo *et al.*, 2004). Sin embargo, para producir semilla híbrida $AS_0 \times BS_0$ es necesario conservar y propagar las plantas S_0 , lo cual es imposible por medio de semilla debido a la autoincompatibilidad. Sin embargo, a través de la propagación clonal esto sería posible, además de lograr mantener el genotipo de las poblaciones a través de múltiples reproducciones (Van y Kroon, 1990). Una técnica factible para llevar a cabo la propagación clonal o vegetativa de los progenitores de un híbrido de tomate de cáscara es a través del cultivo *in vitro* (Ramírez y Ochoa, 1991; Manzo *et al.*, 1998).

Uno de las contribuciones del cultivo *in vitro* a los programas de mejoramiento genético de plantas es mediante la propagación *in vitro* de progenitores élite o selectos para la producción de semilla híbrida (Dore, 1981). Para llevar a cabo esta propagación asexual o en forma clonal, se utilizan diferentes explantes para promover la diferenciación celular de los tejidos cultivados hasta lograr la obtención y multiplicación *in vitro* de plantas completas. Las respuestas morfogénicas *in vitro* incluyen la organogénesis directa empleando como explantes las yemas axilares o bien los ápices de tallos. La ventaja de la micropropagación a través de la organogénesis directa es que se puede llevar a cabo un escalamiento de producción de plantas en forma masiva, manteniendo la base genética de los progenitores. (Torres, 1957).

Para el cultivo *in vitro* de *Physalis ixocarpa* se han empleado diferentes explantes, dentro de los que se incluyen: hipocótilos de tallo para promover respuestas morfogénicas (Ramírez y Ochoa, 1991); segmentos de tallos, hoja, peciolo y yemas axilares (de las variedades Rendidora, Salamanca y Tamazula) con el objetivo de desarrollar una metodología de micropropagación para tomate de cáscara (Manzo *et al.*, 1998); anteras, para poder generar plantas haploides (Ortuño-Olea *et al.*, 1997); segmentos de hipocótilo, para evaluar su capacidad de inducción y alargamiento *in vitro* de tallos y posteriormente el enraizamiento *in vivo*, donde se logró su aclimatización así como su estabilidad cromosómica

en plantas de 10 variedades (Andrade, 1998); e hipocótilos, cotiledones y segmentos nodales de plantas provenientes de semillas tetraploides, con la finalidad de establecer un protocolo de propagación *in vitro* (García *et al.*, 2018).

Con base en lo anterior, con el propósito de contribuir al desarrollo un programa de mejoramiento genético por hibridación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm), mediante la clonación de progenitores de híbridos sobresalientes, se realizó el presente trabajo de cultivo *in vitro* de familias selectas de tres variedades, con los objetivos e hipótesis siguientes:

Objetivo general

Establecer las condiciones *in vitro* que permitan la multiplicación de plantas de tomate de cáscara y evaluar su aclimatación y su comportamiento fenológico.

Objetivos particulares

Evaluar la respuesta al cultivo *in vitro* de familias selectas de tres variedades mejoradas de tomate de cáscara.

Establecer y evaluar el protocolo para aclimatización de plantas provenientes de cultivo *in vitro*.

Estudiar la fenología de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro*.

Hipótesis

Es posible mantener plantas selectas mediante propagación *in vitro* de tomate de cáscara.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Aspectos generales del tomate de cáscara

2.1.1 Importancia económica

El tomate de cáscara es la séptima hortaliza más cultivada en México. En el año agrícola 2018 se sembró una superficie de 24,235 hectáreas bajo riego y 7,821 hectáreas de temporal, con un rendimiento promedio de 18.962 t ha⁻¹ tan solo en el ciclo primavera-verano y un rendimiento promedio de 16.567 t ha⁻¹ en el ciclo otoño-invierno (SIAP, 2018).

En el año 2017 la producción de tomate de cáscara fue de 773,351 toneladas. Los principales estados productores fueron Sinaloa, Zacatecas, Jalisco, Puebla, Michoacán, Sonora, Estado de México, Nayarit, Hidalgo y Morelos. En México se tiene un consumo de esta hortaliza en 5.1 kg per cápita. El 55 % de la producción se concentra en los estados de Sinaloa, Zacatecas, Jalisco, Puebla y Michoacán. Respecto a la participación nacional en la producción de hortalizas en México, el tomate de cáscara representa el 4.8 % y la exportación se dirige principalmente hacia los Estados Unidos y en menor proporción hacia Reino Unido y Países Bajos (SIAP, 2017).

Actualmente se dispone 11 variedades mejoradas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) registradas a nombre de la Universidad Autónoma Chapingo, las cuales son: CHF1 Chapingo, Diamante, Manzano Tetlixpa, Milpero Tetela, Potrero, Puebla SM3, Rendidora, Salamanca, Tamazula SM3, Tecozautla 04 y Yema de Huevo. Las siguientes están registradas a nombre de otras instituciones y no todas son *P. ixocarpa*: Dali, Siqueiros, Tamayor R, Cañon, Kuali, Kuui, Milli, Nikan, Potro, Tepetl, Tlali, Xococ y Yuku (SNICS, 2018).

2.1.2 Origen y distribución del tomate de cáscara

El género *Physalis* comprende aproximadamente 90 especies alrededor del mundo (D´Arcy, 1991) donde México se considera como centro de distribución principal del género y agrupa alrededor de 70 especies (D`Arcy, 1979; Martínez, 1993). De las especies distribuidas en México, 36 se encuentran en 26 estados de la República Mexicana en altitudes comprendidas entre 8 y 3,350 msnm y relacionadas con cuatro tipos climáticos (Ac, Am y Aw; BS; Cb y AC (A)Ca y (A)Cb) predominando el BS con 33 % (Santiagoullo *et al.*, 1994).

Un número reducido de especies se localizan en el este de Asia, Australia, India, Europa y África tropical. Solo una especie, *P. alkekengi* L., es considerada como originaria del viejo mundo (Santiagoullo *et al.*, 2010). En México, las especies del género referido se distribuyen a lo largo y ancho de la República Mexicana. Las especies logran prosperar en los ambientes subhúmedo y húmedo, tropical, subtropical y templado, árido, semiárido, frío, semicálido y cálido, y se relacionan con una diversidad geológica, edáfica, de tipos de vegetación y hábitats (Santiagoullo, 2009).

2.1.3 Clasificación taxonómica y descripción botánica del tomate

De acuerdo con Whittaker (1969), Cronquist (1993) y D´Arcy (1979) y Santiagoullo *et al.* (2010), el tomate de cáscara obedece a la siguiente calificación taxonómica:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Dicotyledoneae (Magnoliopsida)*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceae*

Subfamilia: *Solanoideae*

Tribu: *Solaneae*

Género: *Physalis*

Especie: *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.

De acuerdo con Waterfall (1967) y Vargas *et al.* (2003) las plantas del género *Physalis* son plantas anuales o perennes, herbáceas, algunas arbustivas, erectas o postradas. Las características morfológicas de estas plantas se describen a continuación:

Tallos. Ramificación dicotómica, cilíndrico, lisos, poco angulados o angulados; en algunas especies llegan a enraizar en los nudos basales.

Hojas. Pecioladas, alternas, pero a veces dos o aún tres aparentemente juntas debido a la reducción de los entre nudos, láminas foliares generalmente ovadas, en ocasiones orbicular lanceoladas o linear lanceoladas, el margen entero, repando, sinuado, acerrado, o dentado.

Flores. Pediceladas, generalmente solitarias en las axilas de las hojas, a veces varias y fasciculadas, raramente en falsos racimos.

Corolas. Raramente tubular expandidas a campanulada-rotáceas, urceoladas o el limbo más o menos reflejo, de color amarillo, amarillo verdoso o amarillo crema, blanco o púrpura, con cinco manchas contrastantes ocupando superficies variables de área arriba de la parte tubular, sólidas en color o cada una consistiendo de varios a muchos puntos separados, a veces las manchas no contrastan fuertemente, o bien ausentes. Estambres 5, anteras con dehiscencia longitudinal, oblongas a linear-oblongas a ovadas, púrpuras, azules, azules-verdosas, azules con una línea amarilla o amarillas, filamentos filiformes; ovario con un estilo filiforme, estigma claviforme, algunas veces capitado.

Cáliz. En el fruto acrescente, inflado vesicular, cubre por completo a la baya durante la fructificación, 5-angulado o 10-angulado, con 5 ángulos más

prominentes o cilíndrico, de menos de uno a 6 cm de largo, en la mayoría de las especies de 1-2.5 cm de ancho; lóbulos del cáliz ovados, lanceolados, deltoides o angostamente triangulares, el ápice agudo, corto acuminado, subulado o caudado subulado.

Fruto. Baya succulenta, de color blanco, verde, amarillo, anaranjado, o púrpura, de 0.8-1.5 cm de diámetro y hasta 6 cm en el tomate cultivado (García, 2001); semillas numerosas, reniformes, amarillas o de color café.

2.2 Autoincompatibilidad

Dentro de las especies de plantas hermafroditas existen varios sistemas controlados genéticamente para obligar a las plantas a tener una polinización cruzada que operan a través de la incompatibilidad entre el polen y el estilo. El proceso de incompatibilidad puede operar en cualquier etapa entre la polinización y la fertilización. En algunas especies el polen no logra penetrar el estigma, porque ocurre una inhibición y esta se puede evitar si se elimina la superficie estigmática, con lo que se demuestra que la reacción de incompatibilidad se localiza a nivel de estigma (Allard, 1960).

En algunas otras especies, el polen que es incompatible logra germinar, y el tubo polínico crece a lo largo del estilo, no obstante, este crecimiento se da tan lentamente que rara vez llega al ovario a tiempo para efectuar la fertilización. La tasa de crecimiento de los tubos polínicos puede ser determinada por el genotipo de fondo en el que opera el gen principal o varios genes que controlan las reacciones de incompatibilidad (Allard, 1960).

La incompatibilidad es muy común en el reino de las plantas, E. M. East estimó que ocurre en más de 300 especies entre 20 familias de plantas con flores (Allard, 1960)

Existe una clasificación de los sistemas de incompatibilidad. Los sistemas homomórficos, en los que las diferencias en la morfología floral no determinan la compatibilidad. La reacción de compatibilidad del polen puede definirse por el genotipo de la planta madre (esporofítica), como en los sistemas heteromórficos, o puede depender de la constitución genética del polen (gametofítica) (Lewis, 1954).

2.2.1 Sistema heteromórfico

Los sistemas heteromórficos se caracterizan por diferencias en la morfología de las flores de diferentes plantas. El control genético de este complejo de caracteres es por un solo gen, S, siendo Ss y ss. El polen de las plantas brevistilas, a pesar de que puede ser genéticamente S o s, todo se comporta como si fuera de la constitución S. En otras palabras, la reacción de incompatibilidad del polen está impresa en ella por el genotipo de la planta madre, es decir, por la generación esporofítica previa. Este sistema es entonces un sistema heteromorfo y esporofítico. El sistema heteromórfico no es importante entre las plantas de cultivo (Allard, 1960).

2.2.2 Sistema homomórfico

En los sistemas homomórficos, las diferencias en la morfología floral no acompañan la incompatibilidad. Además, la reacción de incompatibilidad del polen puede determinarse por el genotipo de la planta madre (determinación esporofítica), como en los sistemas heteromórficos, o puede depender de la constitución genética del polen en sí (determinación gametofítica). Los sistemas homomórficos son de gran importancia en las plantas cultivadas (Allard, 1960).

2.2.3 Sistema gametofítico

El sistema de incompatibilidad gametofítica fue descubierto por East y Mangelsdorf (1925) en *Nicotiana sanderae*. En este sistema, la incompatibilidad está controlada por un solo gen, S, que generalmente se caracteriza por el gran número de formas alélicas en las que existe. En el sistema, el crecimiento del tubo polínico resulta ser muy lento en un estilo que contiene el mismo alelo de S; en consecuencia, las plantas son heterocigóticas en este locus. La situación de dos alelos con control gametofítico y sin dominancia es, por supuesto, imposible porque todas las plantas serían incompatibles y la especie sería estéril (Allard, 1960).

El sistema gametofítico origina tres tipos principales de polinizaciones: (1) totalmente incompatible ($S_1S_2 \times S_1S_2$), en la que ambos alelos son comunes; (2) la mitad del polen es compatible ($S_1S_2 \times S_1S_3$), en el que un alelo es diferente; y (3) todo el polen es compatible ($S_1S_2 \times S_3S_4$), en el que ambos alelos difieren (Allard, 1980). Existe un alelo de autocompatibilidad en el locus S. Las plantas que tienen el genotipo S_fS_x donde S_x es cualquier otro alelo de la serie, son autocompatibles y en autofecundación dan plantas autocompatibles en la constitución S_fS_f y S_fS_x (East y Yarnell, 1929). También hay otro alelo especial, el alelo S_F , que es capaz de inhibir el crecimiento de los tubos de polen que llevan el alelo S_f (Anderson y de Winton, 1931).

2.2.4 Sistema esporofítico

El sistema esporofítico es similar al sistema gametofítico en el sentido de que el control genético es por un solo gen con múltiples alelos. Se diferencia del sistema gametofítico en que la planta sobre la cual se lleva el polen imparte la reacción de incompatibilidad al polen. El sistema esporofítico también difiere del sistema gametofítico en que los alelos pueden mostrar dominancia, acción individual o competencia en el polen o en los estilos según la combinación alélica involucrada.

Esto conduce a una gran complejidad de relaciones de incompatibilidad que dan lugar a muchos patrones diferentes de incompatibilidad (Allard, 1960). Según Lewis (1954), las características principales del sistema esporofítico que la diferencian del sistema gamético son las siguientes:

1. Hay diferencias recíprocas frecuentes.
2. La incompatibilidad puede ocurrir con el progenitor femenino.
3. Una familia puede constar de 3 grupos de incompatibilidad.
4. Los homocigóticos son una parte normal del sistema.
5. Un grupo de incompatibilidad puede contener 2 genotipos.

El sistema esporofítico fue descubierto por primera vez con los trabajos en *Crepis foetida*, y *Gerstel* (Hughes y Babcock, 1950).

2.3 Mejoramiento genético del tomate de cáscara

El tomate de cáscara posee flores perfectas hermafroditas, lo cual haría suponer que se puede autofecundar, y con ello generar líneas para utilizarlas como progenitores en cruza controladas y generar de esta manera semillas híbridas; sin embargo, debido a la presencia de dos loci independientes cada uno con alelos múltiple genera autoincompatibilidad de tipo gametofítica y esta se presenta cuando una vez ocurrida la polinización uno o más alelos que porta el polen se encuentran también en el estilo (Pandey, 1957). Esta característica particular presente en el tomate de cáscara crea una limitante para poder generar, a través de la autofecundación, líneas con un alto grado de endogamia, lo cual dificulta la formación de híbridos para esta especie (Peña y Márquez, 1990).

Debido a la autoincompatibilidad, el tomate de cáscara se considera una alógama obligada y los métodos de mejoramiento genético más apropiados son la selección masal, la selección familiar de medios hermanos y la selección

combinada de medios hermanos (Peña y Márquez, 1990). Los métodos de mejoramiento por selección favorecen el incremento de las frecuencias génicas de alelos favorable en mayor o menor grado de expresión de un carácter de importancia agronómica, con efectos aditivos. Una vez logrado esto, se pueden crear poblaciones con cierto grado de endogamia, derivadas de variedades mejoradas por selección, con el objetivo de hacer cruzamientos controladas para aprovechar los efectos de dominancia o epistáticos de los genes para la generación de híbridos de mayor rendimiento y heterosis, la cual puede resultar mayor mientras más divergencia genética presenten las poblaciones o líneas que sean usadas para los cruzamientos (Moll *et al.*, 1965; Falconer, 1986).

A pesar de la autoincompatibilidad gametofítica del tomate de cáscara, ha sido posible lograr autofecundar sus flores; sin embargo, los resultados han sido frutos principalmente de origen partenocárpico. Por esto, se han generado híbridos intervarietales sin recurrir a la emasculación de flores, que han resultado a nivel de experimento superiores en rendimiento de fruto respecto al mejor progenitor en 14.3 % (Peña *et al.*, 1998) y un 138.7 % (Sahagún *et al.*, 1999). También se generaron híbridos de cruce simple entre plantas S_0 de las variedades A y B que superaron en rendimiento de fruto hasta en 39.2 % al mejor progenitor (Santiaguillo *et al.*, 2004). No obstante, para la producción a nivel comercial del híbrido $AS_0 \times BS_0$ es necesario mantener y multiplicar las líneas S_0 , lo cual es imposible por medio de semilla; sin embargo, a través de la propagación clonal esto sí sería posible, además de lograr mantener el genotipo de las poblaciones a través de sucesivas reproducciones (Van y Kroon, 1990). Una técnica para llevar a cabo la propagación clonal o vegetativa de las líneas o plantas S_0 es mediante el cultivo *in vitro* (Ramírez y Ochoa, 1991; Manzo *et al.*, 1998).

2.4 Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

2.4.1 Usos de la micropropagación

Dentro de la Biotecnología Agrícola, el empleo del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales se ha transformado en una técnica fundamental para la propagación comercial de un gran número de variedades de plantas (George, Hall y De Klerk, 2007; Hammerschlag y Lawson, 1986). Diversos autores han evaluado las ventajas de la micropropagación como método y esto puede resumirse en los siguientes enunciados (Kyte, 1987; Pierik, 1999)

1. Propagación masiva de clones específicos.
2. Producción de plantas libres de patógenos.
3. Propagación clonal del stock parental (líneas puras) para la producción de semillas híbridas.
4. Producción de viveros durante todo el año.
5. Conservación del germoplasma.

Propagación masiva de clones específicos

Los factores controlados de la micropropagación permiten la rápida propagación de individuos a partir de una sola planta. Las tasas de multiplicación pueden llegar a ser muy altas, debido a que las plantas en cultivo pueden multiplicarse a una tasa exponencial por medio de un subcultivo continuo, aunque estas tasas generalmente no se mantienen en la práctica. Muchos laboratorios comerciales tienen la capacidad de producir millones de plantas micropropagadas al año (Paul, Kaigny y Sangwan-Norreel, 2000). La micropropagación comercial puede ser factible económicamente bajo las determinadas condiciones.

Una de ellas es cuando algunas especies la tasa de propagación es relativamente lenta por ejemplo las orquídeas, los bulbos, los helechos, muchas plantas de follaje, algunas herbáceas perennes y la palma, la única forma para la

propagación clonal (excepto la micropropagación) por medio de la división de la corona o los vástagos. Cuando se crean nuevos cultivares con alta demanda del mercado (Hartmann, Kester, Davies y Geneve, 2011).

Otra condición es con los Cultivares con alto valor de mercado, pese a que la micropropagación resulta muy costosa en contraste con otros métodos de propagación clonal. Los costos de propagación son mínimos en comparación con el valor del cultivo terminado. Ejemplo de ello se ubican a plantas leñosas de especialidad como valiosas reservas de raíces, rododendros y plantas perennes de especialidad como el lirio de día (Kester y Grasselly, 1987).

Otra circunstancia que justifica la micropropagación es donde la plantas resulta difícil de propagar mediante clonación por otros métodos. Por ejemplo, de manera tradicional, el injerto ha sido el único método para propagar clones de muchas plantas leñosas que resultan difíciles de enraizarse a partir de esquejes. La micropropagación ofrece una alternativa viable para la propagación de estas plantas en sus propias raíces. Para las especies que se encuentran en peligro de extinción, la micropropagación permite su conservación por medio de un método eficiente y rápido para la multiplicación de especies, cuando solo algunas plantas pueden estar disponibles como plantas de reserva o para la recolección de semillas de plantas silvestres (Hartmann *et al.*, 2011).

Producción de plantas libres de patógenos

La producción de material de propagación libre de virus fúngicos, bacterianos y sistémicos y patógenos similares a virus se ha convertido en un aspecto fundamental de la propagación. La micropropagación proporciona un método para eliminar los patógenos de un clon o de un stock reproductor. El cultivo de meristemas es un método rutinario para la obtención de plantas libres de enfermedades. Los propagadores no deben asumir automáticamente que los patógenos sistémicos están ausentes. Los aspectos específicos para el control

de patógenos se debe considerar el mantenimiento del germoplasma y el material de origen en una condición libre de patógenos, iniciar con la micropropagación para crear un sistema de reproducción de clones, y permitir el movimiento de materiales de germoplasma a través de barreras de cuarentenarias (Hartmann *et al.*, 2011)

Propagación clonal del stock parental (líneas) para la producción de semillas híbridas

Este procedimiento se ha utilizado para la producción de semillas híbridas de muchos cultivos anuales como petunia, impatiens, caléndulas, espárragos, tomate, cucurbitáceas y brócoli, donde las líneas parentales se multiplican por micropropagación (Dore, 1987; Murashige, 1974).

Preservación de germoplasma

El método principal de preservación de germoplasma son las semillas, pero el almacenamiento de semillas requiere una instalación relativamente grande con condiciones de almacenamiento muy especializadas, y no ha sido útil para semillas recalcitrantes que no toleran las condiciones de almacenamiento en seco. Además, las semillas no son una opción para conservar el germoplasma clonal. Estas razones son las que hacen que la preservación del tejido vegetativo como explante sea una alternativa atractiva (Kantha, 1985). La crioconservación, que a menudo utiliza materiales anticongelantes como ayuda, se ha utilizado para ultracongelar el tejido vegetativo de manera similar a la de las semillas (Paul, Kaigny y Sangwan-Norreel, 2000). El material congelado puede descongelarse y usarse posteriormente para micropropagar las plantas originales.

2.4.4 Importancia de los Medios de cultivo

Los ingredientes que componen el medio de cultivo varían de acuerdo al tipo de planta y la etapa de propagación en la que se trabaja. En general, ciertas mezclas estándar se usan para la mayoría de las plantas, pero es posible que se deban establecer formulaciones exactas mediante ensayos. Los medios se pueden hacer a partir de productos químicos puros o se pueden comprar como medios de cultivo comerciales premezclados. Los ensayos empíricos pueden ser necesarios para probar las combinaciones de ingredientes disponibles cuando se trata de un nuevo tipo de planta. Se puede agregar un colorante para alimentos al medio para que sea más fácil distinguir cada tipo de medio. Los ingredientes medianos se pueden clasificar bajo las siguientes categorías: sales inorgánicas, compuestos orgánicos y agentes gelificantes (Hartmann *et al.*, 2011).

Sales inorgánicas

Las sales inorgánicas aportan los macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) y los microelementos (boro, cobalto, cobre, manganeso, yodo, hierro y zinc). Estas sales se pueden preparar en soluciones de reserva por grupo y se pueden almacenar en un refrigerador. Una solución madre es una solución concentrada (generalmente 100 veces la concentración encontrada en el medio final) de la cual se eliminan las porciones para formar el medio final. Las soluciones de reserva ahorran tiempo porque las sales secas solo se deben pesar una vez. La razón para preparar diferentes soluciones madre es que ciertos tipos de productos químicos, cuando se mezclan, precipitan y no permanecen en solución. Las soluciones de reserva deben almacenarse en el refrigerador (no congeladas) y son válidas durante varios meses. La solución de stock nublado debe desecharse. Las sustancias inorgánicas y muchos de los materiales orgánicos se pueden mantener bajo refrigeración en soluciones madre 100 veces la concentración requerida. Se pueden agregar 10 ml de esta solución madre por cada litro de medio para proporcionar la concentración requerida. De la lista en

el Cuadro 1, los siguientes materiales se pueden combinar sin formar precipitados: nitratos, sulfatos, haluros, fosfatos, boratos y molibdatos. El hierro se puede comprar como una solución de hierro quelado, o se puede preparar por separado combinando las sustancias en el grupo E, o como alternativa se puede suministrar como hierro inorgánico- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), FeSO_4 ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) o tartrato de Fe. ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Las soluciones de hierro deben almacenarse en una botella oscura (Hartmann *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Soluciones stock (gr L^{-1}) usadas en la preparación de varios medios de cultivo para micropropagación^a.

Grupo	Componente	Murashige and Skoog (MS)	Woody plant medium (WPM)	Anderson (AND)	Gamborg B5
A	NH_4NO_3	165.00	40.00	40.00	---
	KNO_3	190.00	---	48.00	250.00
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	---	38.60	---	---
B	K_2SO_4	---	99.00	---	---
	MgSO_4	18.10	18.10	18.10	12.2
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.69	2.23	1.69	1.00
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86	0.86	0.86	0.20
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025
	NH_4SO_4	---	---	---	13.4
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44.00	9.6	44.00	15.00
C	KI	0.083	---	0.03	0.075
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025	---	0.0025	0.0025
D	KH_2PO_4	17.00	17.00	---	---
	H_3BO_3	0.62	0.62	0.62	0.30
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025	0.025
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ^b	---	---	38.00	15.00
E	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78	2.78	5.57	2.78
	Na_2EDTA	3.73	3.73	7.45	3.73
F	Thiamin*HCl	0.10	0.10	0.04	1.00
	Nicotinic acid	0.05	0.05	---	0.10
	Pyridoxine*HCl	0.05	0.05	---	0.10
	Glycine	0.20	0.20	---	---
G	Myo-inositol	10.00	10.00	10.00 ^c	10.00

^aEstas son 100 X la solución final. Use 10 ml de solución stock para preparar 1 L de medio de cultivo.

^bComúnmente se adiciona como un suplemento directamente al medio de cultivo de 85 a 255 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

^cSulfato de adenine agregar 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Los cuatro medios descritos en el Cuadro 1 son los más representativos para la micropropagación de diferentes especies de plantas. Los medios Murashige-Skoog (MS) y Linsmaier-Skoog se han utilizado ampliamente para una variedad de tipos y especies de cultivos, especialmente plantas herbáceas (Linsmaier y Skoog, 1965; Murashige y Skoog, 1962). Para plantas leñosas, es deseable una dilución de tres a diez veces de sales inorgánicas o un cambio a otros medios inorgánicos. El medio de plantas leñosas (WPM) se desarrolló para plantas leñosas y el medio de Anderson (AND) se desarrolló para rododendros (Anderson, 1975; Kyte, 1987; Lloyd y McCown, 1980). El medio Gamborg B5 se ha utilizado ampliamente para cultivos de células y tejidos (Gamborg y Wetter, 1975).

Componentes orgánicos

Se añaden diversos componentes orgánicos al medio, incluido un carbohidrato como fuente de energía (generalmente azúcar), vitaminas para apoyar las reacciones enzimáticas de las plantas, hormonas para dirigir la organogénesis y materiales diversos que facilitan el crecimiento y desarrollo de las plantas. En los carbohidratos se usa sacarosa de 2 a 4 % para la mayoría de los medios de cultivo, pero en algunos casos se pueden usar concentraciones tan altas como 12 %, como ocurre con embriones jóvenes. La glucosa a veces se ha utilizado para monocotiledóneas y las dicotiledóneas seleccionadas (como la fresa), y la fructosa, la maltosa y el almidón se han usado ocasionalmente, estos materiales se añaden a la hora de hacer el medio (Hartmann *et al.*, 2011).

En las vitaminas suele usarse tiamina (de 0.1 a 0.5 mg·L⁻¹), que casi siempre se considera esencial, y generalmente se agregan ácido nicotínico (0.5 mg·L⁻¹) y piridoxina (0.5 mg·L⁻¹). El inositol a 100 mg·L⁻¹ es beneficioso en muchos cultivos y generalmente se agrega de forma rutinaria. El ácido pantoténico (0.1 mg·L⁻¹) y la biotina (0.1 mg·L⁻¹) a veces son beneficiosos. Todas estas sustancias son solubles en agua y deben prepararse como soluciones madre, listas para su

dilución a 100 veces la concentración final. Las soluciones de reserva se deben almacenar en un refrigerador (Hartmann *et al.*, 2011).

2.4.5 Sistemas para la regeneración de plantas por micropropagación

Básicamente, existen dos patrones de desarrollo para la formación de plántulas en cultivos de tejidos, descritos por la forma en que los brotes se originan a partir del explante inicial. Una vez que se han formado los brotes, las etapas de enraizamiento y aclimatización son las mismas para los distintos patrones de desarrollo. Estos patrones son la formación de brotes axilares y la formación de brotes adventicios. Los sistemas diseñados para producir brotes predominantemente axilares son meristemos y cultivos de brotes, mientras que los sistemas diseñados para producir brotes adventicios utilizan tejido para una fuente de explante inicial que no contiene un brote axilar como raíces, entrenudos de tallo, hojas y escamas de bulbo. Los brotes generados a partir de callos también se forman de manera adventicia (Hartmann *et al.*, 2011).

Formación de brotes axilares

Estos se pueden clasificar en cultivo de meristemos y diversas formas de cultivo de brotes.

Cultivo de meristemos

El cultivo de meristemos se utiliza la parte más pequeña de la punta del brote como explante, incluida la cúpula del meristemo y algunos primordios de hojas subyacentes. El número de estructuras adicionales depende de la longitud del vástago escindido. La razón principal para este procedimiento es producir una plántula libre de virus sistémicos, organismos similares a virus y hongos y bacterias superficiales. El meristemo suele estar libre de organismos patógenos;

por lo tanto, cuanto más pequeño sea el explante, más efectiva será la eliminación de los patógenos (Morel, 1964; Kartha, 1984). Las puntas de meristemo de 0.10 a 0.15 mm han dado un 100 % de eliminación de virus y el porcentaje disminuye a medida que el tamaño aumenta a 1 mm; por otro lado, cuanto más pequeño es el explante, más difícil es establecerlo y más bajas son las tasas de supervivencia. Un compromiso general es usar explantes de 0.25 a 1.0 mm de largo. El estado del virus debe ser confirmado por indexación (Langhans, Horst y Earle, 1977).

Cultivar la planta madre a una temperatura cálida antes de la escisión del meristemo puede aumentar la probabilidad de eliminación del virus (Senula, Keller y Leseman, 2000). Una vez que se produce una planta enraizada, se puede utilizar como el inicio de un clon de base en un programa de stock limpio para esa especie y cultivar en particular (Raju y Trolinger, 1986).

Cultivos de brotes axilares

Los cultivos de brotes son como tallos, divisiones o capas miniaturizadas que crecen a partir de meristemos laterales y terminales. Las plántulas desarrolladas de esta manera tienden a ser confiables en la reproducción del genotipo de la planta fuente porque el sistema involucra la extensión de los meristemos apicales existentes. Típico del material biológico, diferentes especies y diferentes clones tienen patrones de crecimiento únicos y requisitos que pueden diferir en el cultivo. Existen varios patrones de crecimiento diferentes como: ramificación axilar, cultivos a partir de nudos, proliferación de pseudocormos y minitubérculos (George, Hall y Klerk, 2007).

En el sistema de ramificación axilar la punta del vástago apical se reprime y los brotes laterales se estimulan para formar un grupo denso de brotes. La citoquinina generalmente suprime el dominio apical, pero en algunos casos, la remoción de la punta del brote aumenta el desarrollo axilar del brote. La base de

este grupo puede estar engrosada y parecida a un callo. Los cultivos se multiplican mediante el subcultivo de brotes individuales o cortando el grupo en secciones y cada uno en contenedores separados. Esto a menudo puede llevar a un cultivo mixto con brotes originados de brotes del tallo axilar y brotes adventicios del callo basal (Hartmann *et al.*, 2011).

Los cultivos a partir de nudos involucran plantas cuyos brotes tienen un predominio apical bastante fuerte. Los brotes largos se cortan en nodos individuales y se plantan verticalmente en el medio. Las yemas axilares en cada nodo se alargan y crecen en longitud. El patrón se repite nuevamente cortando en segmentos nodales en cada subcultivo. Los cultivos de nódulos cotiledonares han sido muy eficaces para micropropagar una variedad de plantas, especialmente leguminosas (Hartmann *et al.*, 2011).

En el sistema de proliferación de pseudocormos los puntos de crecimiento de las orquídeas en cultivo producen grupos de pequeñas protuberancias que se asemejan a las pseudocormos iniciadas cuando una semilla de orquídea germina. Las protocormos a menudo forman rizomas cortos que pueden subcultivarse para producir numerosas plántulas. La estructura se subcultiva cortando en secciones (Hartmann *et al.*, 2011).

Para el caso de minitubérculos en las plantas de papa en cultivo pueden formar tubérculos en miniatura al final de los pequeños estolones, que se extienden desde los meristemas laterales ubicados en cada nodo de plantas de papa cuando se tratan con altos niveles de citoquinina, particularmente en la oscuridad. Estos órganos de almacenamiento se pueden quitar y utilizar en la producción de material de plantación libre de virus (Dodds, Silva-Rodríguez y Tovar, 1992). La formación de minitubérculos también es susceptible de producción en biorreactores automatizados a gran escala (McCown, Vas y Joyce, 1991).

Formación de brotes adventicios

Los brotes adventicios se inician directamente en el explante o indirectamente en el callo que se produce a partir del explante. La formación directa de brotes adventicios es análoga a los esquejes de hojas y raíces, escalas de bulbo y bulbillos. La selección de explantes y el régimen regulador del crecimiento determinan el éxito de la iniciación de brotes adventicios. El desarrollo indirecto de brotes adventicios primero implica el inicio de brotes escindidos en forma de callo basal en cultivo. Los brotes surgen de la periferia del callo y no están conectados inicialmente al tejido vascular del explante. La formación de brotes adventicios generalmente puede resultar en altas tasas de multiplicación, más altas que las tasas de los cultivos de brotes axilares. Por otro lado, los brotes adventicios también pueden resultar en un mayor número de plantas aberrantes, fuera de tipo, como resultado de las condiciones descritas en una sección posterior. Los cultivos adventicios de brotes se utilizan con mayor frecuencia en las plantas diploides regeneradas, pero también se pueden obtener regeneradas con diferentes niveles de ploidía para fines de fitomejoramiento (Tripepi, 1997).

2.4.6 Etapas de desarrollo en micropropagación

El éxito de la micropropagación se debe en gran parte a la separación de los diferentes aspectos del desarrollo del cultivo *in vitro* en etapas, cada una de las cuales se manipula mediante la modificación de los medios y el control ambiental (George, Hall y Klerk, 2007). De acuerdo con Hartmann *et al.* (2011) se reconocen cuatro etapas distintas para la mayoría de las plantas:

Etapla I: establecimiento. Colocación de tejido en cultivo.

Etapla II: multiplicación de brotes. Inducción a la producción de brotes múltiples.

Etapla III: formación de la raíz. Iniciación de raíces en microcortes.

Etapla IV: aclimatación. Desplazamiento gradual de las plantas al aire libre.

Etapas I: Establecimiento

Los objetivos para la etapa I son colocar con éxito un explante en un cultivo aséptico evitando la contaminación y luego proporcionar un entorno *in vitro* que promueva la producción estable de brotes (McCown, 1986). Algunas referencias sugieren que hay una Etapa 0 donde las plantas de origen se manipulan antes de la separación del explante para comenzar la Etapa I (Cassells y Oherlihy, 2003). Hartmann *et al.* (2011) sugieren que los aspectos importantes de la Etapa de Establecimiento incluyen: la selección de la fuente del explante, la desinfección del explante, el medio de cultivo y la estabilización.

En la selección y el manejo de la planta como fuente de explante es un aspecto importante de la micropropagación exitosa y comprende cuatro aspectos que requieren especial atención: el tipo de explante, las características genéticas y epigenéticas de las plantas fuente, el control de patógenos, y el acondicionamiento fisiológico de la planta fuente para optimizar su capacidad de establecerse en un cultivo.

Estudios han demostrado que el tipo de explante puede influir en el éxito de un sistema de cultivo de tejidos. Por ejemplo, los explantes de peciolo pueden producir muchos más brotes adventicios que los explantes de raíz bajo los mismos tratamientos hormonales (Geneve, Kester y Pompey, 2007). Frecuentemente, el mismo tipo de explante tomado de diferentes ubicaciones en la planta donante puede afectar la capacidad de regeneración, un fenómeno que se demuestra muy bien en la haya europea (*Fagus sylvatica*), donde se mostró una capacidad diferente para la regeneración de brotes entre las partes superior e inferior de la misma hoja tratada con la misma concentración de citoquinina (Viéitez y San-José, 1996). Además, dependiendo de la especie, la ubicación en la planta donante y el regulador de crecimiento utilizado, los explantes de capa de células delgadas pueden iniciar callos, brotes, raíces, flores o embriones somáticos (Nhut, Da Silva y Aswath, 2003).

Algunas plantas pueden iniciar cultivos en cualquier época del año, pero para otras, la época del año en que se recolecta el explante puede afectar la micropropagación. Las diferencias pueden ser entre tejido latente y no latente, o algunas otras diferencias sutiles, como cuando el explante se tomó dentro del ciclo de crecimiento rítmico mostrado en los cítricos. La época del año también puede afectar la dificultad de limpiar y desinfectar el explante (El-morsy y Millet, 1996).

Respecto a las características genéticas y epigenéticas de las plantas de origen es fundamental la correcta identificación del genotipo y la veracidad del tipo de las plantas de origen, ya que son esenciales debido a que un error en esta etapa puede multiplicar el problema muchas veces y causar una gran pérdida económica antes de que se descubra.

La capacidad de regeneración a menudo puede variar según el genotipo del tejido de origen (Henry, Vain y Buyser, 1994). El girasol es un sistema bien estudiado que demuestra la heredabilidad esperada de la regeneración de brotes de cultivo de tejidos. En girasol, la frecuencia de regeneración y el número de brotes por explante variaron entre las líneas genéticas. Los cruces genéticos entre estas líneas mostraron estimaciones de heredabilidad que indican que la capacidad de regeneración se puede seleccionar y mejorar mediante la reproducción convencional (Nestares, Zorzoli, Mroginski y Picardi, 2008).

Gran cantidad de diferentes tipos de plantas han sido micropropagados con éxito. En general, aquellas plantas que son fáciles de propagar convencionalmente también son fáciles de micropropagarse. Por ejemplo, muchas plantas herbáceas pueden propagarse vegetativamente con relativa facilidad mediante la propagación convencional o la micropropagación (George y Sherrington, 1984; Murashige, 1974; Pierik, 1999). Se ha comprobado que algunas plantas perennes leñosas se propagan de manera convencional (esquejes) y, por lo general,

también resultan más difíciles de micropropagarse. Sin embargo, debido al alto nivel de control presentado a través del cultivo de tejidos, muchas de estas plantas recalcitrantes también se han micropropagado con éxito (Bajaj, 1986; Jain y Ishii, 2003).

Los problemas de patógenos incluyen: la contaminación por hongos, mohos, levaduras y bacterias en la superficie de los tallos o alojados en grietas, escamas de yemas y en otros lugares; virus sistémicos y organismos similares a virus; y patógenos internos. Los contaminantes externos están literalmente presentes en todas partes: en el aire y en la superficie de las plantas, mesas, manos, etc. Las esporas se mueven sobre partículas de polvo transportadas por corrientes de aire. Se deben desinfectar los explantes, las herramientas y el área de trabajo para eliminar los contaminantes de la superficie. Todo el trabajo debe realizarse en áreas de transferencia especial donde se hayan eliminado contaminantes y se hayan tomado precauciones para evitar la recontaminación (Boxes y Druart, 1986).

La reducción de los contaminantes de la superficie comienza con las plantas de stock utilizadas como fuente de explantes. A menudo, los contaminantes están presentes solo en la superficie de las partes de la planta. Las estructuras internas, como los puntos de crecimiento de los brotes o dentro de semillas y frutos, tienden a estar relativamente libres de patógenos. Sin embargo, si la planta crece en una atmósfera húmeda, los micelios pueden invadir los interiores de la planta y convertirse en un problema persistente (Hartmann *et al.*, 2011).

Reducir los contaminantes de la superficie en las plantas de origen antes de la escisión del explante puede ayudar en los intentos posteriores de desinfestación. En general, las plantas que crecen en contenedores en ambientes protegidos, como un invernadero, son fuentes de explantes más limpias que las que cultivan en el exterior. Se debe evitar el riego por encima de la cabeza, la aspersión o cualquier actividad que incremente la humedad alrededor de la planta. Las partes

inactivas de la planta pueden tomarse y forzarse a crecer en condiciones de laboratorio para minimizar la contaminación (Read y Preece, 2007).

Para plantas al aire libre, se deben mantener las partes de la planta fuera del suelo y evitar el uso de raíces o porciones subterráneas como fuentes de explantes, si es posible. Las poblaciones de insectos y ácaros deben ser controladas. En un caso, fue necesario retener el agua y mantener las plantas frescas y secas durante 3 semanas para reducir los contaminantes, incluso dentro de un invernadero. Si las plantas crecen al aire libre, puede ser útil cubrir los brotes con bolsas de plástico o rociarlos con fungicidas (Knauss, 1976).

Las plantas en existencia deben ser evaluadas para detectar patógenos antes de su selección como plantas donantes. Las plantas contaminadas con virus pueden estar expuestas a temperaturas elevadas como una forma de termoterapia (Cassells y Oherlihy, 2003). Las partes aisladas de las plantas se tratan a aproximadamente 50 °C durante minutos a horas, mientras que las plantas en crecimiento se mantienen a unos 40 °C durante varias semanas. Alternativamente, se puede emplear el cultivo de meristemos o una combinación de cultivo de meristemos y termoterapia para eliminar patógenos (McGrew, 1980).

Para el acondicionamiento fisiológico, las plantas originales pueden tratarse para proporcionar explantes que se desempeñen mejor en el cultivo de tejidos. Este punto a veces se denomina Etapa 0 porque ocurre en la planta de origen antes de tomar cualquier explante. Incluye las plantas en crecimiento en ambientes controlados para que alcancen la etapa adecuada del desarrollo de los brotes en relación con los patrones estacionales, que produzcan plantas sanas y el tratamiento con reguladores del crecimiento (de Fossard, 1986).

La etapa 0, incluye procedimientos de preacondicionamiento aplicados a las plantas de origen antes de tomar los explantes para la etapa I de

micropropagación, que puede mejorar los establecimientos de explantes en cultivo. La luz y la temperatura bajo las cuales se cultivan las plantas de origen pueden influir en el rendimiento del cultivo de tejidos. Los explantes de begonia produjeron más brotes en un período de tiempo más corto a partir de plantas fuente que crecieron a menos de 25 °C y 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ de luz en comparación con 18 °C y 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ (Welander, Zhu y Li, 2007). La calidad de la luz (rojo versus rojo lejano) y el fotoperíodo también pueden desempeñar un papel en la capacidad de regeneración, posiblemente al impactar los niveles de auxinas y citoquininas endógenas (Read y Preece, 2007).

Otra actividad muy importante de la etapa del establecimiento consiste en la desinfestación del explante, proceso que consiste en eliminar contaminantes de la superficie del órgano en lugar de hacerlo desde dentro del órgano (Cassells y Oherlihy, 2003). Debido a que el explante se comienza a colocar en un medio de cultivo de tejidos que contiene nutrientes y azúcar, el explante debe estar completamente libre de contaminantes; de lo contrario, estos crecerán de manera activa y consumirán el explante en unos pocos días. La desinfestación requiere el uso de productos químicos que son tóxicos para el microorganismo, pero relativamente no tóxicos para el material vegetal. Los desinfectantes primarios incluyen alcohol (etilo, metilo o isopropilo, alrededor del 80 %) y blanqueador (calcio o hipoclorito de sodio, generalmente con un ingrediente activo de 5.25 a 6.0 %). El blanqueador generalmente se diluye en 10 a 20 % antes de usar. Para mejorar la cobertura de la superficie, deben agregarse unas pocas gotas de surfactante o detergente al cloro. La efectividad del tratamiento con cloro es una respuesta de dosis de tiempo; la efectividad de la desinfección aumenta con el aumento del tiempo y la concentración, pero también aumenta el daño a los tejidos vivos. Por lo tanto, se debe desarrollar un compromiso a través de pruebas para el tipo de explante que se está tratando (Hartmann *et al.*, 2011).

Los materiales adicionales utilizados para limpiar los explantes incluyen peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, y cloruro de mercurio. Se debe tener cuidado,

especialmente con cloruro de mercurio, para manejar estos materiales de manera segura y para desecharlos adecuadamente. Se debe solicitar al distribuidor la hoja de seguridad para estos productos químicos para obtener información adicional sobre el cuidado al usar estos compuestos. Un procedimiento típico para la preparación del explante sería cortar el tejido en trozos cortos de varios centímetros de largo y lavarlos con agua del grifo con un detergente. Para partes leñosas, puede ser útil un rápido baño de alcohol después del lavado. Las partes de las plantas se colocan en la solución desinfectante (con un surfactante o detergente agregado) durante 5 a 15 minutos. Luego se vierte la solución y el material se enjuaga dos o tres veces con agua estéril para eliminar toda la solución restante. Las modificaciones de este procedimiento básico que pueden mejorar la efectividad incluyen prelavado, agitación mecánica, infiltración al vacío y tratamientos múltiples (Hartmann *et al.*, 2011).

Los contaminantes microbianos, que consisten en levaduras y varias especies de hongos y bacterias, generalmente aparecen en la superficie del agar dentro de unos días a una semana como limo blanco u opaco, o como colonias de varios colores, a veces con esporas negras y micelio (Fogh, 1973). Cuando estos contaminantes pueden identificarse visualmente, los recipientes de cultivo que los contienen deben desecharse rápidamente mediante autoclave. Algunos contaminantes bacterianos, como *Bacillus subtilis*, *Erwinia* o *pseudomonas*, a veces permanecen dentro del material vegetal sin ser detectados durante varios meses después del cultivo inicial o la incubación. Los antibióticos se usan a veces en el medio para mejorar el control del crecimiento bacteriano (Cassells y Oherlihy, 2003).

No se debe dar por sentado que los explantes están libres de virus y de cualquier patógeno interno, incluso si se utiliza la extremidad extrema del brote. La indexación del cultivo se puede utilizar para identificar los explantes que muestran resultados positivos para la presencia de patógenos. Sin embargo, la

indexación en la etapa inicial del explante no siempre identifica todos los contaminantes potenciales (Henny, Knauss y Donnan, 1981).

El medio de cultivo generalmente incluye un soporte semisólido (agar u otro producto comercial), un medio basal de elementos nutrientes orgánicos (mayor y menor), una fuente de energía (principalmente sacarosa) y, a menudo, algunos suplementos vitamínicos. Se encuentran disponibles varias formulaciones de medios comerciales pero los componentes de un medio pueden desarrollarse para satisfacer específicamente las necesidades de una planta en particular, especialmente aquellos que muestran deficiencias minerales en medios estándar (Hartmann *et al.*, 2011). El enfoque básico es medir la composición química de la hoja de una plántula en crecimiento y luego personalizar los componentes del medio para cumplir con esos requisitos. Hay un software disponible para ayudar a formular estos medios para garantizar que las combinaciones de minerales sean compatibles y no precipiten cuando se estén preparando (Monteiro, Higashi, Goncalves y Rodríguez, 2000).

La última fase de la etapa del establecimiento es la estabilización, aquí el explante crece inicialmente por el alargamiento del brote terminal principal, con una proliferación limitada de brotes axilares. Si el explante se establece con éxito, se producen varios microbrotes en unas pocas semanas, el número depende del predominio apical del tipo particular de planta (Pierik, 1999). Los cultivos establecidos y estabilizados están listos para el subcultivo y se pueden mover a lo largo de la Etapa 2 de micropropagación. Sin embargo, en algunos casos, los explantes pueden requerir subcultivos repetidos para producir una cultura uniforme y de buen crecimiento. La mayoría de las plantas anuales y herbáceas se estabilizan rápidamente en unos pocos subcultivos. Las plantas leñosas invariablemente requieren períodos más largos y, a veces, los cultivos estabilizados nunca se pueden lograr. Las características de crecimiento cambian del desarrollo impredecible (a menudo anormal) de brotes, al principio, a un patrón de crecimiento predecible uniforme (McCown, 1986). La dificultad en

la estabilización parece estar asociada con el estado de fase del explante: cuanto más juvenil, más fácilmente se estabiliza. El patrón de crecimiento estacional característico de las especies que se cultivan se ha asociado con la facilidad de estabilización (Hartmann *et al.*, 2011).

Etapas II: Multiplicación de brotes

El propósito de la Etapa II es mantener el cultivo en un estado estabilizado y multiplicar los microbrotes al número requerido para el enraizamiento. La micropropagación comercial intensiva puede requerir la optimización no solo de los nutrientes inorgánicos, sino también de otros factores en el medio, que se pueden realizar mediante pruebas sistemáticas de rango de concentraciones de elementos de medios individuales combinados de varias maneras con otros elementos. Los métodos sugeridos han sido un enfoque de amplio espectro que utiliza todas las combinaciones posibles, o un enfoque factorial (de Fossard, 1986; Anderson, 1975), donde un rango de cada ingrediente (otros se mantuvieron constantes) se prueba en subcultivos consecutivos. La mayoría de los sistemas de micropropagación utilizan un medio sólido (solidificado con agar), pero los cultivos líquidos pueden proporcionar una mayor multiplicación de brotes y pueden automatizarse (Hvoslef-Eide y Preil, 2005).

En esta etapa, los reguladores del crecimiento como la citoquinina y la auxina se utilizan para mantener un nivel básico de crecimiento, pero son igualmente importantes para dirigir la respuesta de desarrollo de los tejidos en el cultivo. La iniciación de los brotes está fuertemente apoyada por la concentración de citoquinina. En general, la concentración mínima de citoquinina que estimula el inicio múltiple de brotes se selecciona durante la etapa de multiplicación. El aumento de los niveles de citoquinina puede promover la proliferación adicional de los brotes, pero puede inhibir la elongación de los brotes. Los requisitos pueden variar en diferentes etapas del cultivo, de modo que pueden producirse respuestas de crecimiento variables durante subculturas consecutivas. Puede ser

necesario un ajuste de las concentraciones de citoquinina. La auxina suele ser baja o ausente en los cultivos de la etapa II, pero hay casos en que la auxina sola se usa para inducir la multiplicación de brotes (Stimart, 1986).

Dentro de la multiplicación, el subcultivo se emplea una vez que los microbrotes han alcanzado una longitud adecuada, se recolectan y se usan para comenzar nuevos cultivos o se transfieren a la etapa III para enraizamiento. El cultivo original puede ser recortado o separado y subcultivado a nuevos medios de multiplicación. La relación de propagación es el número de nuevos microbrotes que se pueden producir por subcultivo. En general, la relación de propagación es mayor en brotes adventicios que en cultivos de brotes axilares. Sin embargo, la proporción de brotes fuera de tipo y aberrantes es más probable que sea mayor con el origen adventicio. En consecuencia, la relación de propagación más alta puede no ser la más deseable para mantener la calidad y la veracidad del tipo. La frecuencia de subcultivos varía de 2 a 8 semanas, dependiendo de la velocidad de desarrollo del brote. La prontitud es esencial para mantener la proliferación de brotes y para establecer tasas óptimas de multiplicación de brotes. La variación en la rutina puede afectar adversamente la tasa de multiplicación, el rendimiento y la calidad de los brotes, el enraizamiento y el crecimiento posterior. Si el subcultivo se retrasa demasiado tiempo, pueden desarrollarse el amarilleo de las hojas y la necrosis (Hartmann *et al.*, 2011).

La técnica de subcultivo debe optimizarse para el tipo particular de cultivo, incluido el tamaño del nuevo explante, el método de corte y, a veces, la orientación de la siembra. Ocurren ocasionalmente patrones rítmicos estacionales en la proliferación, aunque el subcultivo se realiza bajo condiciones uniformemente controladas. Para los cultivos que muestran patrones rítmicos de proliferación, los números de brotes tienden a ser mayores en verano que en invierno (Stimart, 1986).

Etapas III: Formación de raíces

La función de la etapa III es la de microcorte de raíz y, en algunos casos, prepararlos para el trasplante del entorno aséptico y protegido del tubo de ensayo a las condiciones exteriores del invernadero o área de trasplante. El enraizamiento puede tener lugar en el entorno *in vitro* o *ex vitro* (Ziv, 1986).

En el enraizamiento *in vitro*, los microcultivos que están enraizados en el tubo de ensayo están enraizados *in vitro*. Los microcultivos se trasladan a un medio inductor de raíz en el que el equilibrio del regulador del crecimiento del medio se cambia a citoquinina reducida (o ninguna) y auxina incrementada. La concentración de sales basales en el medio de enraizamiento generalmente se reduce a la mitad. Los microcortes individuales pueden colocarse en un medio inductor de la raíz (a menudo líquido) durante unos días y luego transferirse a un medio sin auxinas para el enraizamiento. Los cultivos pueden estar enraizados en la luz u oscuridad, para algunas especies (James y Thurbon, 1981).

En el enraizamiento *ex vitro*, muchos sistemas de micropropagación comerciales y experimentales evitan el enraizamiento *in vitro* al tratar microcortes con auxina, insertándolos directamente en un medio de enraizamiento sin efecto invernadero, y colocándolos en condiciones de niebla o alta humedad para el enraizamiento. El procedimiento no solo proporciona una excelente transición del entorno de cultivo al aire libre, sino que también ahorra requisitos de mano de obra para el manejo de plantas en micropropagación. Los protocolos incluyen tratar los microcultivos con auxina (generalmente AIB), como una aplicación rápida de inmersión, y plantarse en un medio de invernadero a alta humedad; o tratar los microcortes con auxina durante 5 a 15 días como tratamiento *in vitro* en agar o cultivo líquido, luego lavar el agar y colocar los microcortes en un entorno *ex vitro* (Yusnita, Geneve y Kester, 1990).

Existe una diferencia morfológica distinta entre las raíces formadas *in vitro* en comparación con las raíces *ex vitro*. Los microcortes de raíz *ex vitro* tienden a formar raíces que son más normales que los microcortes de raíz *in vitro*, incluidas las células corticales menos hinchadas y un sistema vascular más formado. Después de trasplantar a un medio de invernadero, las raíces que se desarrollaron *in vitro* pueden no sobrevivir. En otros casos, las raíces *in vitro* deben adoptar una morfología normal para funcionar correctamente (McClelland, Smith y Catothers, 1990). Un aspecto positivo del cultivo *in vitro* es que muchas plantas que normalmente son difíciles de enraizar a partir de esquejes pueden enraizarse como microcortes (Ranjit y Kester, 1988).

Etapas IV: Aclimatización

La aclimatización implica el cambio de una condición heterótrofa (que requiere azúcar) a una condición autótrofa (vida libre) y la aclimatación de la microplanta al ambiente exterior (Preece y Sutter, 1991). Mantener el crecimiento del brote activo es importante porque la aclimatación y el desarrollo de las condiciones autótrofas dependen de un nuevo crecimiento después de la transferencia desde el entorno de probeta. Inmediatamente después del trasplante, las microplantas enraizadas deben mantenerse en una humedad muy alta, exponiéndolas gradualmente a condiciones externas para prevenir la deshidratación (Driver y Suttle, 1986).

Los microbrotes desarrollados *in vitro* tienen una morfología foliar única (Brainerd, Fuchigami, Kwiatkowski y Clark, 1981). El tamaño de la hoja y el número de capas celulares que forman la hoja se reducen mucho, en comparación con las hojas desarrolladas al aire libre. Debido a alta humedad *in vitro*, las hojas no desarrollaron ceras epicuticulares en la superficie de la hoja en cantidades normales o con las mismas propiedades químicas. Como resultado, las hojas en microbrotes se secan rápidamente después de que se retiran del cultivo *in vitro* (Driver y Suttle, 1986).

Los estomas también son morfológicamente diferentes en hojas de plantas cultivadas *in vitro*. Por ejemplo, las hojas de goma dulce *in vitro* (Liquidambar) tenían estomas con células protectoras redondeadas y elevadas en la superficie inferior de la hoja, mientras que las plantas de invernadero típicamente tienen células protectoras elípticas y hundidas (Wetzstein y Sommer, 1982). Los estomas en plantas cultivadas *in vitro* por lo general permanecen abiertos y no se cierran después de ser retirados inicialmente del entorno *in vitro*, lo que nuevamente conduce a un rápido marchitamiento y desecación de estas hojas (Hazarika, 2006).

Para mejorar la aclimatización, se han desarrollado varios métodos para ayudar a que los microcortes arraigados se aclimaten. Cualquiera de estos métodos puede llevarse a cabo antes o después del trasplante (Hazarika, 2006). Por ejemplo, el tratamiento de aclimatación más común es reducir gradualmente la humedad alrededor de las microcortes enraizadas. La humedad se puede mantener mediante el uso de niebla intermitente, niebla, o encerrar las plántulas en una carpa de polietileno. Este es un paso crítico en el proceso de aclimatación. Los antitranspirantes se han utilizado con resultados variables y pueden ser fitotóxicos; su uso no es común comercialmente. En otro tratamiento las plántulas también pueden endurecerse mientras aún están *in vitro* y antes del trasplante. El endurecimiento implica varios tratamientos para reducir la humedad en el recipiente de cultivo. Puede ser tan simple como quitar la tapa en el vaso de cultivo de tejido durante 5 a 7 días antes de transplantar o usar desecantes para reducir la humedad. El enfriamiento del fondo del recipiente también reducirá la humedad. El aumento del potencial osmótico del medio (generalmente con sacarosa adicional) también puede ser eficaz para endurecer las microcortes enraizadas porque reduce el agua disponible a los brotes. Los reguladores del crecimiento (paclobutrazol) se han utilizado con éxito variable como un tratamiento previo *in vitro* antes del trasplante (Hartmann *et al.*, 2011). También se ha demostrado que los microcultivos inoculados con hongos micorrízicos

mejoran el enraizamiento o la aclimatación en numerosos cultivos comerciales, incluyendo frutas, ornamentales y coníferas (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

Las plántulas tratadas con micorrizas muestran una reducción en el impacto del trasplante, un mayor control de la conductancia estomática y una mayor absorción de nutrientes y crecimiento de las plantas. Además de la micorriza, se pueden agregar microorganismos benéficos como *Trichoderma* o *Bacillus* para mejorar el crecimiento de las plántulas al protegerlas de los organismos patógenos en el sustrato de trasplante (Estrada-Luna, Davies y Egilla, 2000).

2.4.7 Factores ambientales que influyen en el cultivo *in vitro*

Temperatura

El rango de temperatura utilizado con mayor frecuencia para el cultivo de tejidos es oscila entre 20 y 27 °C. Existe cierta evidencia que sugiere que se deben evitar las altas temperaturas y que pueden reducir la formación de brotes inducidos por citoquininas (Fonnesbech, 1974). La mayoría de los laboratorios de cultivo de tejidos mantienen una temperatura constante; sin embargo, para algunas especies (como la azucena), la formación del bulbillo se mejora utilizando ciclos de temperatura día / noche alternos (Stimart y Ascher, 1981).

Los cultivadores comerciales también usan la temperatura para suspender el crecimiento cuando la demanda de plántulas está baja. Los cultivos se colocan en almacenamiento refrigerado para reducir el crecimiento y eliminar la necesidad y el costo del subcultivo. Estos cultivos se retiran de la refrigeración para reanudar la multiplicación de brotes a medida que aumenta la demanda de plantas (Orlikowska, 1992).

Luz

Los efectos de la luz se pueden separar en el impacto de la irradiancia de la luz (expresada como radiación fotosintética activa-PAR), duración (fotoperíodo) y calidad en el crecimiento y desarrollo. Los niveles típicos de irradiancia para la multiplicación de brotes durante la micropropagación están entre 40 y 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ a la altura del cultivo, pero la irradiancia dentro del vaso puede ser mucho menor. La distribución de la luz dentro del recipiente de cultivo se midió utilizando microbrote simulado construido de una película de sensor de luz (Ibaraki y Nozaki, 2005).

Se demostró que el PAR disminuyó hacia el fondo del vaso con reducciones del 30 y 50 % en las partes medias y más bajas del microbrote simulado, respectivamente. Además, el tipo de cierre utilizado puede reducir la luz transmitida al recipiente de cultivo (Fujiwara, Kozai, Nakajo y Watanabe, 1989). El número de lámparas y la distancia entre las lámparas en los estantes de luz afectan tanto el costo de micropropagación como la uniformidad y la cantidad de distribución de la irradiancia de la luz en todo el estante. Hay modelos de regresión disponibles para describir la relación entre la altura y el espaciado de las lámparas fluorescentes (Chen, 2005).

Aunque las especies difieren en sus requisitos de luz, este rango es una irradiancia muy baja en comparación con las irradiancias en exteriores y en invernaderos, que están entre 600 y 1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$. Este nivel de luz baja se usa porque la sacarosa se proporciona en el medio de cultivos heterotróficos en lugar de depender de la fotosíntesis para obtener energía. Los brotes en cultivos heterótrofos muestran tasas de fotosíntesis bajas debido al bajo nivel de CO_2 en el recipiente de cultivo y la inhibición por retroalimentación de la fotosíntesis por el azúcar en el medio. Una mayor irradiación de la luz en cultivos

heterótrofos puede provocar la pérdida de clorofila y necrosis de las hojas (Hazarika, 2006).

La calidad de la luz también puede afectar indirectamente el desarrollo de los brotes al causar cambios en los componentes de los medios, al alterar el desarrollo del cultivo. En general, la luz inhibe el crecimiento de la raíz y hay algunos indicios de que excluir la luz de la zona de enraizamiento es beneficioso para la formación de la raíz. Se ha sugerido que uno de los beneficios de incluir carbón activado al medio de enraizamiento *in vitro* es un nivel de luz reducido (Hangarter y Stasinopoulos, 1991).

2.4.8 Sistemas de micropropagación automatizada y cultivo en líquido (biorreactor)

Los cultivos líquidos contienen las mismas sustancias nutritivas y hormonales que se encuentran en los cultivos estacionarios, pero carecen de un agente solidificante como el agar. Por lo general, estos requieren un mecanismo para airear el medio o un método para evitar que los brotes se sumerjan. Los sistemas diseñados para automatizar la micropropagación generalmente emplean un sistema de cultivo de biorreactor líquido donde el medio puede ser bombeado y alejado del cultivo (Hvoslef-Eide, y Preil, 2005). Uno de los métodos automatizados es el sistema de biorreactor de inmersión temporal (Etienne y Berthouly, 2002), que actúa para recircular e inundar los explantes con medio a intervalos regulares, y puede usarse para el crecimiento de callos o la proliferación de brotes. También se han desarrollado biorreactores para cultivos geofíticos, incluida la papa, donde proliferan los grupos de yemas en el cultivo (Ziy, 2000).

Un área activa de investigación es la producción de embriones somáticos en biorreactores (Ibaraki y Kurata, 2001), especialmente con especies de coníferas para la reforestación (Tautorus y Dunstan, 1995). Los biorreactores, combinados

con el análisis de imágenes para clasificar embriones somáticos, tienen el potencial de producir en masa plántulas de coníferas clonales en las cantidades necesarias para las plantaciones de reforestación (Zhang, Chi y Hu, 1996).

Un método para mejorar el alargamiento de los brotes antes de tomar microcortes es utilizar una capa líquida o un cultivo de doble fase, en donde los brotes cortos permanecen en el medio de agar y están cubiertos con un medio líquido nutritivo que puede contener hormonas o carbón activado (Maene y Debergh, 1998). Esta técnica de superposición líquida se ha utilizado para mejorar la multiplicación de brotes y el alargamiento, y se ha empleado para mejorar la iniciación de embriones somáticos en coníferas (Pullman y Skryabina, 2007).

2.5 Propagación *in vitro* de tomate de cáscara

Existen trabajos sobre el cultivo *in vitro* de tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) con la finalidad de inducción de brotes. Para lograr esto se han utilizado diferentes fuentes de explantes, como las exploradas por Ramírez y Ochoa (1991) quienes emplearon hipocótilos cultivados con el medio MS en combinación con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento como: Benciladenina (BA), ácido naftanalacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Otra fuente de explantes fueron segmentos de tallo, hoja, peciolo y yemas axilares de las variedades Rendidora, Salamanca y Tamazula (Manzo-González *et al.*, 1997). Se utilizó el medio de cultivo básico Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), benciladenina (BA) y ácido indolacético (AIA). De manera particular, para la formación de yemas axilares en la variedad Rendidora se obtuvo con BA 3.0 mg L⁻¹ y AIA 0.1 mg L⁻¹, en la variedad Salamanca con BA 3.0 mg L⁻¹ y para la variedad Tamazula se logró con BA 1.0 mg L⁻¹ y el enraizamiento para las tres

variedades se obtuvo utilizando las sales inorgánicas de MS al 75 % y sin reguladores de crecimiento (Manzo-González *et al.*, 1997).

También se emplearon anteras como explantes las cuales se probaron bajo tres medios de cultivo sólidos distintos: Murashige y Skoog (1962), Chu (1981) y, Nitsch y Nitsch (1969); en combinación con 2 tipos de agar y diferentes concentraciones de sacarosa, auxinas y citocininas (Ortuño-Olea *et al.*, 1997). Por su parte, Andrade (1998) estudió la capacidad de inducción y alargamiento *in vitro*, enraizamiento *in vivo*, aclimatización y estabilidad cromosómica de plantas de 10 variedades de *Physalis ixocarpa* Brot., entre ellas 2 variedades silvestres. Encontró que la capacidad de regeneración *in vitro* depende ampliamente del genotipo de las plantas; por ejemplo, la mayor respuesta a la inducción de brotes la presentaron las variedades Tamazula, CHF1 Chapingo y Rendidora Original; respecto al alargamiento de brotes las mejores variedades fueron CHF1 Chapingo, Arandas y Milpero; Puebla y Manzano fueron las variedades que mayor respuesta tuvieron al enraizamiento *in vivo*; y las dos variedades silvestres fueron las de menor respuesta a la regeneración *in vitro*. La respuesta a la aclimatización fue muy favorable para todas las variedades manteniendo una humedad relativa adecuada.

García (2018) evaluó la respuesta a la germinación de semillas tetraploides de *Physalis ixocarpa* para posterior micropropagación, como una alternativa para la reproducción de este genotipo debido a las bajas tasas de germinación. Utilizaron como explantes a hipocótilos, cotiledones y segmentos nodales; se utilizó el medio MS y PCL2 en combinación con diferentes concentraciones de fitoreguladores como bencilaminopurina (BAP), Kinetina y ácido naftalenacético. El tratamiento de mayor respuesta fue con 3 mg L⁻¹ de BAP con 9.5 brotes por explante. Rivera y Mercado (2018) establecieron un protocolo de cultivo *in vitro* de cultivares selectos de *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm. usando yemas axilares y apices. Evaluaron la respuesta a la multiplicación *in vitro*, la aclimatización y el desarrollo fenológico en invernadero. Obtuvieron la multiplicación *in vitro* con el

medio Murashige y Skoog (1962) sin adición de reguladores, con una proporción de sobrevivencia a la aclimatización de 0.93 y el desarrollo fenológico de las plantas de tomate de cáscara fue más lento en plantas provenientes *in vitro*.

2.6 Literatura citada

- Allard, R. W. 1960. Principles of plant breeding. Ed. John. Wiley and Sons, Inc., New York. London. pp.238-242.
- Anderson, E., & D. De Winton 1931. The genetic analysis of an unusual relationship between self-fertility in *Nicotiana*. *Ann. Mo. Bot. Garden*, 18, 97-116. doi: 10.2307/2394046
- Anderson, W. C. 1975. Propagation of rhododendrons by tissue culture. 1. Development of a culture medium for multiplication of shoots. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 25, 129-35.
- Azcón-Aguilar, C. A., & J. M. Barea. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. *Scientia Hort.* 68, 1-24. doi: 10.1016/S0304-4238(96)00954-5
- Bajaj, Y. P. S. 1986. Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. I, Trees. Berlin: Springer-Verlag. 380 p.
- Berto, M., Curir, P., & Debergh P. 1999. Influence of agar on in vitro cultures: II. Biological performance of *Ranunculus* on media solidified with three different agar brands. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 35, 94-101. doi: 10.1007/s11627-999-0017-x
- Bilkey, P.C., McCown, B.H. & Hildebrandt, A.C. (1978). Micropropagation of African violet from petiole cross-sections. *HortScience*, 13, 37-38.
- Boulay, M. 1987. *In vitro* propagation of tree species. In C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer, eds. *Plant tissue and cell culture*. New York: Alan R. Liss. pp. 367-82.
- Bourgin, J. P., & Nitsch J. P. 1967. Obtention de *Nicotiana* haploids a partir d'tamines cultivées *in vitro*. *Ann. Phys. Veg.* 9, 377-82.
- Boxes, P H., & Druart P. 1986. Virus-free trees through tissue culture. In Y. P. S. Bajaj, ed. Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. I, Trees. Berlin: Springer-Verlag. pp. 24-30.

- Brainerd, K. E., Fuchigami, L. H., Kwiatkowski, S., & Clark, C. S. 1981. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. *HortScience*, 16, 173-75.
- Burger, D. 1988. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. *HortScience*, 23, 1066.
- Cassells, A. C., & Oherlihy, E. A. 2003. In S. M. Jain and K. Ishii, eds. Micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht: Kluwer Acad. Pub. pp. 103-28.
- Chen, C. 2005. Fluorescent lighting distribution for plant micropropagation. *Biosystems Engineering*, 90, 295-306. doi: 10.1016/j.biosystemseng.2004.10.005
- D'Arcy, W. G. 1979. The clasification of the solanaceae. In: J.G., Hawkes, R. N. Lester and A. D. Skeiding (eds). *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press. London. pp. 3-47.
- D'Arcy, W. G. 1991. The Solanaceae since 1976, with Review of its Biogeography, pp. 75-138. In: J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee y N. Estrada (Eds) *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry and Evolution*. Royal Botanical Garden, Kew, Gran Bretaña.
- de Fossard, R. A. 1976. Tissue culture for plant propagators. Armidale, Australia: Univ. of New England Printery. 409 p.
- de Fossard, R. A. 1986. Principles of plant tissue culture. In R. H. Zimmerman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag. and R. H. Lawson, eds. *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. pp. 1-13.
- Dodds, J. H., D. Silva-Rodriguez, & P. Tovar. 1992. Micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). In Y. P. S. Bajaj, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 19. High tech and micropropagation III*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 91-106.
- Dore, C. 1987. Application of tissue culture to vegetable crop improvement. In C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer, eds. *Plant tissue and cell culture*. New York: Alan R. Liss. pp. 419-32.
- Driver, J. A., & G. R. L. Suttle. 1986. Nursery handling of propagules. In J. M. Bonga and D. J. Durzan, eds. *Cell and tissue culture in forestry*, 2nd ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. pp. 320-31

- East, E. M. & A. J. Mangelsdorf. 1925. A new interpretation of the hereditary behavior of self-sterile plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 11, 116-183. doi: 10.1073/pnas.11.2.166
- East, E. M. & Yarnell, S. H. 1929. Studies on self-fertility. *Genetics*, 14, 455-487.
- El-morsy, A., & Millet, B. 1996. Rhythmic growth and optimization of micropropagation: The effect of excision time and position of axillary buds on *in vitro* culture of *Citrus aurantium* L *Ann. Bot.* 78, 197-202. doi: 10.1006/anbo.1996.0113
- Estrada-Luna, A. A., Davies, F. T. Jr., & Egilla, J. N. 2000. Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L) during *ex vitro* acclimatization and plant establishment. *Mycorrhiza*, 10, 1-8. doi: 10.1007/s005720050280
- Etienne, H., & M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation (review). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69, 215-31. doi: 10.1023/A:1015668610465
- Falconer, D. S. 1986. Introducción a la Genética Cuantitativa. Trad. F. Márquez S. Editorial CECSA. 2a. Edición. D. F., México. 383 p.
- Fogh, J., 1973. Contamination in tissue culture. New York: Academic Press. 288 p.
- Fonnesbech, M. 1974. Temperature effects on shoot and root development from *Begonia cheimanthus* petiole segments grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 32, 282-86. doi: 10.1111/j.1399-3054.1974.tb03135.x
- Fujiwara, K., T. Kozai, Y. Nakajo. And I. Watanabe. 1989. Effects of closures and vessels on light intensities in plant tissue culture vessels. *Journal of Agricultural Meteorology*, 45, 143-49. doi: 10.2480/agrmet.45.143
- Gamborg, O. L., & Wetter, L. R. 1975. Plant tissue cultures methods. Saskatoon, Canada: Prairie Regional Laboratory. 110 p.
- García S., F. 2001. *Physalis*. En: Rzedowski, J. y G. Calderón de R. (Eds). *Flora Fanerogámica del Valle de México. Segunda Edición. Instituto de Ecología A.C., Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). Pátzcuaro, Michoacán.* pp. 659-663.
- García O., H.T., Escobedo B., L., Robledo T., V., Benavides M., A., y Ramírez G., F. 2018. Germinación y micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) tetraploide. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (12), 2301-2311. doi: 10.29312/remexca.v0i12.763

- Geneve, R. L., Kester, S. T., & Pompey, K. W. 2007. Autonomous shoot production in paw-paw [*Asimina triloba* (L.) Dunal] on plant growth regulator free media. *Propagation Ornamental Plants*, 7, 51-6.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. 2007. Plant propagation by tissue culture. Dordrecht: Springer. 204 p.
- George, E. F., & Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, UK: Exegetics Ltd. 60:3,360-360
- Guha, S., & Maheshwari, S. C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, (London) 204-497.
- Hangarter, R. P., & Stasinopoulos, T. C. 1991. Repression of plant tissue culture growth by light is caused by photochemical change in the culture medium. *Plant Science*, 79, 253-57. doi: 10.1016/0168-9452(91)90114-N
- Hartmann, H. T., & J. Whisler. 1977. Micropropagation exercises in teaching plant propagation. *Comb. Proc. Intl. Plant. Prop. Soc.* 27, 407-13.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies, & R.L. Geneve. 2011. Plant propagation, Principles and practices. 8th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. pp. 639-714
- Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108, 105-20. doi: 10.1016/j.scienta.2006.01.038
- Henny, R. J., Knauss, J. F., & A. Donnan, Jr. 1981. Foliage plant tissue culture. In J. Joiner, ed. Foliage plant production. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall. pp. 137-178.
- Henry, Y., Vain, P., & J. de Buyser. 1994. Generic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica*, 79, 45-58.
- Hughes, M. B., & Babcock, E. B. 1950. Self-incompatibility in *Crepis foetida* (L.) Subsp. *Rhoedifolia* (Bieb.) Schinz et Keller. *Genetics*, 35, 570-588.
- Hvoslef-Eide, A. K., & W. Preil. 2005. Liquid culture systems for *in vitro* propagation. Dordrecht: Springer. pp. 165-280.
- Ibaraki, Y., & Kurata, K. 2001. Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65, 179-99. doi: 10.1023/A:1010636525315

- Ibaraki, Y., & Nozaki, Y. 2005. Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80,111-13. doi:10.1007/s11240-004-5936-y
- Jackson, M. B., Abbott, A. J., Belcher, A. R., Hall, K. C., Butler, R. , & J. Cameron. 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. *Annals of Botany* 67, 229-37. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a088127
- Jain, S. M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118, 153-66. doi: 10.1023/A:1004124519479
- Jain, S. M., & Ishii, K. 2003. Micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht: Kluwer Acad. Pub. 150 p.
- James, D. J., & Thurbon, I. J. 1981. Shoot and root initiation in vitro in the apple rootstock M9 and the promotive effects of phloroglucinol. *Journal of Horticultural Science*, 56, 15-20. doi: 10.1080/00221589.1981.11514960
- Kartha, K. K. 1984. Elimination of viruses. In I. K. Vasil, ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, Vol. 1. New York: Academic Press. pp. 577-85.
- Kartha, K. K. 1985. Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Raton, FL: CRC Press. 288 p.
- Kester, D. E., & Grasselly, C. 1987. Almond rootstocks. In R. C. Rom and R. F. Carlson, eds. *Rootstock for fruit crops*. New York: John Wiley and Sons. pp. 265-93.
- Kim, K. W., & Kako, A. 1984. Studies on clonal propagation in the Cymbidium floral organ culture in vitro. *J. Korean Soc. Hort. Soc.* 25, 65-71.
- Knauss, J. F. 1976. A tissue culture method of producing *Dieffenbachia picta* cv. Perfection free of fungi and bacteria. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 89, 293-96.
- Kyte, L. 1987. *Plants from test tubes; an introduction to micropropagation*. (rev. ed.). Portland, OR: Timber Press. 274 p.
- Langhans, R. W., Horst, R. K., & Earle, E. D. 1977. Disease-free plants via tissue culture propagation. *HortScience*, 12, 149-50.
- Lewis, D. 1954. Comparative incompatibility in agiosperms and fungi. *Advances in Genetics*, 6, 235-285. doi: 10.1016/S0065-2660(08)60131-5

- Linsmaier, E. M., & Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18, 101-27. doi: 10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x
- Lloyd, G., & McCown, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30, 421-27.
- Maene, L., & Debergh, P. 1998. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, 23-33. doi: 10.1007/BF00033566
- Martínez y Díaz., M. L. 1993. Systematics of *Physalis* Section *Epeteiorhiza*. Tesis Doctoral, Universidad de Texas, Austin, U.S.A.
- McClelland, M. T., Smith, M. A. L., & Carothers, Z. B. 1990. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23, 115-23. doi: 10.1007/BF00035831
- McCown, B. H. 1986. Woody ornamentals, shade trees, and conifers. In R. H. Zimmerman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag, and R. H. Lawson, eds, *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. pp. 333-42.
- McCown, B. H., & Joyce, J. 1991. Automated propagation of microtubers of potato. In I. K. Vasil, ed. *Scale-up and automation in plant propagation*. New York: Academic Press. pp. 95-109.
- McGrew, J. R. 1980. Meristem culture for production of virus-free strawberries. In R. H. Zimmerman, ed. *Proc. conf. on nursery production of fruit plants through tissue culture, Applications and feasibility*, U.S. Dept. of Agr. Sci. and Education Administration ARR-NE-11. pp. 80-5.
- Mok, M. C., Mok, D. W. S., Turner, J. E., & Mufer, C. V. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*, 22, 1194-97.
- Moll, R. H., Lonquist, J. H., Velez-Fortuño, J., & Johson, E. C. 1965. The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. *Genetics* 52, 139-144.
- Monteiro, A. C. B. A., Higashi, E. N., Goncalves, A. N., & Rodriguez, A. P. M. 2000. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion-fruit (*Passiflora edulis*

- Sims. f. flavicarpa* Deg.). *In Vitro Cell Dev. Bio. Plant*, 36, 527-31. doi: 10.1007/s11627-000-0094-3
- Morel, G. M. 1964. Tissue culture: A new means of clonal propagation of orchids. *Amer. Orchid Soc. Bul.* 33, 473-78.
- Mudge, K. W., Borgman, C. A., Neal, J. C., & Weller, H. A. 1986. Present limitations and future prospects for commercial micropropagation of small fruits. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 36, 538-43.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135-66. doi: 10.1146/annurev.pp.25.060174.001031
- Murashige, T., & F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nestares, G., Zorzoli, R, Mroginski, L., & Picardi, L. 2008. Heritability of *in vitro* plant regeneration capacity in sunflower. *Plant Breeding*, 121, 366-68. doi: 10.1046/j.1439-0523.2002.727109.x
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85-87. doi: 10.1126/science.163.3862.85
- Nhut, D. T., Da Silva, J. A. T., & Aswath, C. R. 2003. The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 39, 266-76. doi: 10.1079/IVP2002408
- Orlikowska, T. 1992. Effects of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of two apple rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31, 1-7. doi: 10.1007/BF00043468
- Ortuño, O. L., Manzo, G. A., y Peña, L. A. 1997. Cultivo de anteras en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 4, 39-43. doi: 10.5154/r.rchsh.1997.06.045
- Ozudogru, E. A., Ozden-Tokatli, Y., & Akgin, A. 2005. Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia-type peanut through shoot tip culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 41, 151-56. doi 10.1079/IVP2004591
- Pandey, K. K. 1957. Genetics of self-incompatibility in *Physalis ixocarpa* Brot. A new system. *American Journal of Botany*, 44, 879-887. doi: 10.1002/j.1537-2197.1957.tb08275.x
- Paul, H., Kaigny, G., & Sangwan-Norreel, B. S. 2000. Cryopreservation of apple (*Malus x domestica* Borkh) shoot tips following encapsulation-dehydration

- or encapsulation-vitrification. *Plant Cell Rpt.* 19, 768-74. doi: 10.1007 / s002990000195.
- Peña, L. A., Márquez, S. F. 1990. Mejoramiento genético de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot). *Revista Chapingo*, 71-72, 84-88.
- Peña, L. A., Molina, G. J. D., Cervantes, S. T., Márquez, S. F., Sahagún, C. J., y Ortiz, C. J. 1998. Heterosis intervarietal en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 4(1), 31-37. doi: 10.5154/r.rchsh.1997.12.093
- Peña, L. A., Ponce, V. J. J., Sánchez, del C. F., y Magaña, L. N. 2014. Desempeño agronómico de variedades de tomate de cáscara en invernadero y campo abierto. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37 (4), 381 – 391.
- Pierik, R. L. M. 1999. In vitro culture of higher plants. 4th ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 348 p.
- Pierik, R. L. M., Jansen, J. L. M., Maasdam, A., & Binnendijk, C. M. 1975. Optimalization of Gerbera plantlet production from excised capitulum explants. *Scientia Horticulturae*, 3, 351-57. doi: 10.1016 / 0304-4238 (75) 90049-7
- Preece, J. E., & Sutter, E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In P. C. Debergh and R. H. Zimmerman, eds. *Micropropagation: Technology and application*. Dordrecht: Kluwer Acad. Pub. pp. 71-94.
- Pullman, G. S., & Skryabina, A. 2007. Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rpt.* 26, 873-87. doi: 10.1007 / s00299-006-0296-1
- Ramírez, M. R., Ochoa, A. N. 1991. Adventitious shoot formation and plant regeneration from tissues of tomatillo (*Physalis ixocarpa*, Brot.). *Plant Cell and Organ Culture*, 25, 185-188. doi: 10.1007/BF00036209
- Raju, B. C., & Trolinger, J. C. 1986. Pathogen indexing in large scale propagation of florist crops. In R. H. Zimmerman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag, and R. H. Lawson, eds. *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 138 p.
- Ranjit, M., & Kester, D. F. 1988. Micropropagation of cherry rootstocks: II. Invigoration and enhanced rooting of '46-1 Mazzard' by co-culture with 'Colt.' *J. Amer Soc. Hort. Sci.* 113, 150-54.

- Read, P. & Preece, J. 2007. Micropropagation of ornamentals: the wave of the future? *Propagation Ornamental Plants* 7, 150-59. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.812.2
- Rivera, C. C., y Mercado, G., D. A. 2018. Micropropagación *in vitro* de cultivares selectos de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Chapingo, México. 93 p.
- Sahagún, C. J., Gómez, R. F., y Peña, L. A. 1999. Efectos de aptitud combinatoria en poblaciones de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 5(1), 23-27. doi: 10.5154/r.rchsh.1998.07.050
- Santiagoullo, H. J. F., López, M. R., Peña, L. A., Cuevas, S. J. A., y Sahagún, C. J. 1994. Distribución, colecta y conservación de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis spp*) en México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 1(2), 125-129. doi: 10.5154/r.rchsh.1993.07.052
- Santiagoullo, H. J. F., Cervantes, S. T., y Peña, L. A. 2004. Selección para rendimiento y calidad de fruto de cruas planta x planta entre dos variedades de tomate de cáscara. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 1(27), 85-91.
- Santiagoullo, H. J. F., Vargas, P. O., Grimaldo, J. O., Sánchez, M. J., y Magaña, L. N. 2009. Aprovechamiento tradicional y moderno de tomate (*Physalis*) en México. Publicaciones de la Red de Tomate de Cáscara. Folleto Técnico Número 2. Septiembre de 2009. México. 31 p.
- Santiagoullo, H. J.F., Cedillo, P. E., y Cuevas, S. J. A. 2010. Distribución geográfica de *Physalis spp.* en México. Publicaciones de la Red de Tomate de Cáscara. Octubre de 2010. Guadalajara, Jalisco, México. 245 p.
- Scholten, H. J., & Pierik, R. L. M. 1998. Agar as a gelling agent: Differential biological effects *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 77, 109-16. doi: 10.1016/S0304-4238(98)00165-4
- Senula, A., Keller, E. R. J., & Leseman, D. E. 2000. Elimination of viruses through meristem culture and thermotherapy for the establishment of an *in vitro* collection of garlic (*Allium sativum*). *Acta Horticulturae*, 530, 121-28. doi: 10.17660/ActaHortic.2000.530.12
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do (consultado 06 de febrero de 2019)

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2018. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do (consultado 06 de febrero de 2019).
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). 2018. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/401833/CNVV3erTrim18_web_.pdf (consultado 06 de febrero de 2019).
- Simonton, W., Robacker, C., & S. Krueger. 1991. A programmable micropropagation apparatus using cycled medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 211-18. doi: 10.1007/BF00041292
- Sinha, S., Roy, R. P., & K. K. Jha. 1979. Callus formation and shoot bud differentiation in anther culture of *Solanum surattense*. *Can. J. Bot.* 57, 2524-27. doi: 10.1139/b79-299
- Steiner, A. A. 1984. The universal solution. Proceedings of 6th International Congress on Soilless Culture. ISOSC. Lunteren, The Netherlands. pp. 633-649.
- Stimart, D. P. 1986. Commercial micropropagation of florist flower crops. In R. H. Zimmerman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag, and R. H. Lawson, eds. *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. pp. 301-15.
- Stimart, D. P., & Ascher, P. D. 1981. Developmental response of *Lilium longiflorum* bulblets to constant or alternating temperatures in vitro. *J. Amer. Sci. Hort. Sd.* 106, 450-54
- Stoltz, L. P. 1979. Getting started in tissue culture: Equipment and costs. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 29, 375-15
- Tautorius, T. E., & Dunstan, D. I. 1995. Scale-up of embryogenic plant suspension cultures in bioreactors. In S. W Jain, P. K. Gupta, and R. J. Newton, eds. *Somatic embryogenesis in woody plants: History, molecular and biochemical aspects and applications*, Dordrecht: Kluwer Acad. Pub. pp. 265-92.
- Thomas, T. D. & Chaturvedi, R. 2008. Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93, 1-14. doi: 10.1007/s11240-008-9336-6
- Thomas, T. D., Bhatnagar, A. K., & Bhojwani, S. S. 2000. Production of triploid plants of mulberry (*Morus alba* L.) by endosperm culture. *Plant Cell Rpt.* 19, 395-99. doi: 10.1007 / s002990050746.

- Torres, K. C. 1957. Tissue culture techniques for horticultural crops. Van Nostrand Reinhold. New York. pp. 1-69
- Tran Thanh Van, M. 1973. *In vitro* control of de nove flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissues. *Nature*, 245, 44-5. doi: 10.1038 / 246044a0
- Tripepi, R. R. 1997. Adventitious shoot regeneration. In R. L. Geneve, J. E. Preece, and S. A. Merkle, eds. *Biotechnology of ornamentals*. Biotechnol. Agric. Series No. 16. Wallingford, UK: CAB International. pp. 45-72.
- Vargas, P. O., Martínez, M., & Díaz y P. Dávila a. 2003. La Familia Solanaceae en Jalisco, el género Physalis. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México. 127 p.
- Viéitez, F. J., & San-José, M.C. 1996. Adventitious shoot regeneration from Fagus sylvatica leaf explants *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 32, 140-47. doi: 10.1007/BF02822757
- Waterfall U., T. 1967. Physalis in Mexico, Central América and the West Indies. *Rhodora* 69:82-120,203-239,319-329.
- Welander, M., L-H. Zhu & X-Y. Li 2007. Factors influencing conventional and semi-automated micropropagation. *Propagation Ornamental Plants*, 7, 103-11
- Wetzstein, H. Y., & H. E. Sommer. 1982. Leaf anatomy of tissue-cultured Liquidambar styraciflua (Hamamelidaceae) during acclimatization. *Amer. J. Bot.* 69, 1579-86.
- Yusnita, S., Geneve, R. L., & Kester, S. T. 1990. Micropropagation of a white flowering form of eastern redbud. *Journal Environmental Horticultural*, 8, 177-79.
- Zhang, C., Chi, M. C., & Hu, W. S. 1996. Application of image analysis to fed-cultures of somatic embryo development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 32, 190-98.
- Zimmerman, R. H., R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag, & R. H. Lawson, eds. 1986. Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 369 p.
- Ziv, M. 1986. In vitro hardening and acclimatization of tissue culture plants. In L. A. Withers and P. G. Alderson, eds. Plant tissue culture and its agricultural applications. London: Butterworth. pp. 187-96.

- Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticultural Reviews* 24, 1-30. doi: 10.1002/9780470650776.ch1
- Ziv, M., Halevy, A. H., & Shilo, R. 1970. Organs and plantlets regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. *Annals of Botany* 34, 671-76.
- Van, G. J., De Kroon, H. 1990. Clonal Growth in Plants: Regulation and Function. S.P.B. Academic Publishing. The Hague, The Netherlands. 196 p.

3. PROPAGACIÓN *in vitro* DE FAMILIAS DE PLANTAS SELECTAS DE TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)

RESUMEN

Con el objetivo de propagar *in vitro* plantas selectas de *Physalis ixocarpa* para hacer cruces interclonales, fue evaluada la respuesta *in vitro* de ápices de tallo en familias de las variedades Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa y Morado San Miguel. Las plantas producidas *in vitro* se aclimatizaron y trasplantaron en invernadero para dar seguimiento a su ciclo fenológico. Asimismo, los ápices se cultivaron en un medio básico con las sales inorgánicas Murashige y Skoog (100 %) suplementado con 0.4 mg·L⁻¹ tiamina, 60 mg·L⁻¹ de L-cisteína, 100 mg·L⁻¹ de myo-inositol, 0.5 mg·L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg·L⁻¹ de ácido pantoténico, 3 % de sacarosa, 7 g·L⁻¹ de agar, sin reguladores del crecimiento y un pH a 5.7 ± 0.1. El enraizamiento *in vitro* se hizo durante 30 días con 16 horas de luz a 3000 μmol·m⁻²·s⁻¹. Las variables evaluadas *in vitro* fueron altura de plántula, vigor, callo, longitud de raíz, número de hojas, raíces, tallos y botones, bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las variables evaluadas en invernadero en aclimatización fueron altura de planta, número de hojas, botones, y flores, en tanto que durante el ciclo fenológico se midió altura, número de hojas, flores y bolsas. En ambos casos bajo invernadero se usó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Se hizo análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey (p = 0.05), mientras que para el vigor se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y para presencia de callo se hizo comparación de proporciones binomiales (p = 0.05). Las familias con mejores respuestas morfogénicas *in vitro* fueron Tecozautla 04 y Manzano, así como en el desarrollo fenológico, donde presentaron una mayor altura de planta. En la aclimatización la sobrevivencia fue de 100 % en todos los materiales. Las respuestas *in vitro*, la aclimatización, y la fenología dependieron de la variedad y de las familias.

Palabras clave: aclimatización, cultivo *in vitro*, fenología.

³ Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.
Autora: Ing. Héctor Luna Vicente
Director de Tesis: Dr. Aureliano Peña Lomelí.

***In vitro* PROPAGATION OF FAMILIES OF SELECT PLANTS OF HUSK
TOMATO (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)**

ABSTRACT

The objective of this study was to propagate *in vitro* select plants of *Physalis ixocarpa* to produce interclonal crosses. The *in vitro* response of stem apices was assessed in families of the varieties Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa and Morado San Miguel. The plants produced *in vitro* were acclimatized and transplanted under greenhouse to follow their phenological cycle. Likewise, apices were cultivated in a basic medium with inorganic salts Murashige and Skoog (100 %) supplemented with 0.4 mg L⁻¹ thiamine, 60 mg L⁻¹ L-cysteine, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 0.5 mg L⁻¹ nicotinic acid, 0.5 mg L⁻¹ pantothenic acid, 3 % sucrose, 7 g L⁻¹ agar, without growing regulators and a pH of 5.7 ± 0.1. The *in vitro* rooting was done over 30 days with 16 hours of light at 3000 µmol·m⁻²·s⁻¹. The *in vitro* evaluated variables were seedling height, vigor, callus, root length, leaves number, roots, stems and buds, under a completely random design with four replicates. The evaluated variables in greenhouse during acclimatization were: plant height, leaves number, buds, and flowers, while during the phenological cycle, the variables height, and number of leaves, flowers and bags were measured. In both cases under greenhouse conditions, a random complete blocks design, with four replicates, was used. An analysis of variance and Tukey means comparison tests were made (P = 0.05), while for vigor, the Kruskal-Wallis test was used and for the presence of callus a comparison of binomial proportions (P = 0.05) was made. The families with better morphogenetic responses *in vitro* were Tecozautla 04 and Manzano, as well as in the phenological development where they presented a higher plant height. In the acclimatization period, the survival was of a 100 % in all materials. The *in vitro* responses, acclimatization, and phenology depended on the variety.

Key words: acclimatization, *in vitro* culture, phenology.

⁴ Thesis of Horticultural Sciences MSc program, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Ing. Héctor Luna Vicente
Advisor: Dr. Aureliano Peña Lomelí

3.1 Introducción

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) es la séptima hortaliza más cultivada en México y ocupa el 4.8 % respecto a la producción nacional de Hortalizas. En el año agrícola se sembraron 32,056 hectáreas con una producción total de 773,351 toneladas. Los principales estados que concentran el 55 % de la producción son en orden de importancia Sinaloa, Zacatecas, Jalisco, Puebla y Michoacán (SIAP, 2017). Se dispone de 16 variedades registradas mejoradas por selección (SNICS, 2018). Sin embargo, dadas las condiciones ambientales drásticas y su demanda en el mercado nacional e internacional, se requieren de variedades con mejores características agronómicas y resistentes a fitopatógenos.

Los métodos genotécnicos más adecuados para la generación de variedades mejoradas son Selección Masal Visual Estratificada (SMVE), Selección Familiar de Medios Hermanos (SFMH) y Selección Combinada de Medios Hermanos (SCMH) (Peña y Márquez, 1990). Esto debido a que las plantas presentan autoincompatibilidad de tipo gametofítica (Pandey, 1957) que impide la formación de líneas endogámicas para la formación de híbridos.

Una estrategia para la formación de híbridos en tomate de cáscara es cruzar poblaciones con cierto grado de endogamia, generada a través de cruces fraternales en familias élite de alto rendimiento, hasta encontrar una combinación híbrida entre progenitores de rendimiento superior. No obstante, la producción comercial de semilla híbrida necesita la propagación y mantenimiento del genotipo de los progenitores a lo largo de las generaciones (Santiaguillo *et al.*, 2004). Esto puede ser posible a través de reproducción vegetativa (Van y Kroon, 1990). Un método para ello es el cultivo *in vitro* (Manzo *et al.*, 1997).

Uno de los objetivos del cultivo *in vitro* en los programas de mejoramiento genético, es la propagación clonal de las líneas parentales para la producción de semilla híbrida (Dore, 1987). Un método de propagación en cultivo *in vitro* es a

través de ramificación axilar mejorada usando puntas de tallos y brotes laterales como explantes. La ventaja de este tipo de micropropagación es que se forma muy poco callo y el grado de anormalidad y variabilidad genética se reduce (Torres, 1957).

Respecto al cultivo *in vitro* de *Physalis ixocarpa*, se han empleado diferentes fuentes como explantes. Ramírez y Ochoa (1991) evaluaron la respuesta morfogénica de explantes de hipocótilos cultivados en el medio Murashige y Skoog (1962) (MS), en combinación con Benciladenina (BA), ácido naftalenacético (ANA) y 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). La inducción de brotes y raíces se realizó con una combinación de citoquininas y auxinas.

Manzo *et al.* (1998) utilizaron como explantes segmentos de tallo, hoja, peciolo y yemas axilares de las variedades Rendidora, Salamanca y Tamazula con el medio de cultivo MS suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), benziladenina (BA) y ácido indolacético (AIA).

Ortuño-Olea *et al.* (1997) usaron anteras como explantes, las cuales se probaron bajo tres medios de cultivo sólidos distintos: Murashige y Skoog (1962), Chu (1981) y, Nitsch y Nitsch (1969); en combinación con 2 tipos de agar y diferentes concentraciones de sacarosa, auxinas y citocininas.

Andrade (2005) estudió la capacidad de inducción y alargamiento *in vitro*, enraizamiento *in vivo*, aclimatización y estabilidad cromosómica de plantas de 10 variedades de *Physalis ixocarpa* Brot., entre ellas 2 variedades silvestres. Además, estas plantas regeneradas *in vitro* se llevaron a la fase de aclimatización mediante el uso de sustrato estéril compuesto por tierra negra y de hoja (proporción 1:3) en macetas cubiertas con vasos de plástico transparentes de 1 L, bajo invernadero.

García *et al.* (2018) evaluó la respuesta a la germinación de semillas tetraploides de *Physalis ixocarpa* para su posterior micropropagación, como una alternativa para la reproducción de este genotipo debido a las bajas tasas de germinación. Utilizaron como explantes hipocótilos, cotiledones y segmentos nodales, cultivados en los medios MS y PCL2 en combinación con diferentes concentraciones de fitoreguladores como bencilaminopurina (BAP), Kinetina y ácido naftalenacético (ANA).

Es fundamental evaluar las diferentes variedades de tomate de cáscara para conocer su respuesta de regeneración en cultivo *in vitro* y adecuar el medio de cultivo a los genotipos de interés agronómico para un programa de mejoramiento genético, debido a que la regeneración *in vitro* está determinada ampliamente por el genotipo de las plantas. Esta influencia se ha observado en la respuesta a la organogénesis en cuatro cultivares de *Dianthus caryophyllus* L. (Kallak, Reidla, Hilpus y Virumäe, 1997) y en la inducción de embriogénesis en el cultivo de microsporas de 50 genotipos diferentes de *Capsicum annuum* L. usando reguladores del crecimiento y carbón activado (Cheng, Ma, Jiao, Quiao y Li, 2013).

La etapa de aclimatización es la más crítica para las plantas obtenidas *in vitro*, esto determina el éxito en la sobrevivencia total de estas plantas al trasplante bajo condiciones del invernadero o campo. Los estomas de las plantas cultivadas *in vitro* presentan la característica de incapacidad para cerrar cuando se han retirado por primera vez del cultivo *in vitro*, lo que provoca una fuerte evapotranspiración después del trasplante en condiciones *ex vitro* (Drew *et al.* 1992). Esto produce que las plantas en condiciones *ex vitro* se marchiten y puedan llegar a morir por pérdida excesiva de agua; para evitar esto se suministra de un ambiente de transición adecuado aplicado a la aclimatización en un tiempo de una a varias semanas (Grount and Millam, 1985). En este ambiente de transición la humedad relativa se debe mantener en un rango de 70 % al 100 % a través de un sistema de nebulización (Teixeira da Silva *et al.*, 2017).

Con base en lo antes expuesto, el presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la respuesta al cultivo *in vitro* de familias selectas de tres variedades selectas de tomate de cáscara; establecer y evaluar el protocolo para aclimatización de plantas provenientes de cultivo *in vitro*; y estudiar la fenología de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro*.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1 Ubicación de la fase experimental

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia y en los invernaderos del Campo Agrícola Experimental en la Universidad Autónoma Chapingo. Este experimento consistió en dos etapas: en la primera se realizó la obtención de yemas axilares y ápices de plantas selectas clonadas con antelación y aclimatadas en el invernadero, las cuales se establecieron bajo condiciones asépticas para su micropropagación y evaluación en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos; en la segunda etapa los clones obtenidos se trasladaron al invernadero del Campo Agrícola Experimental para su aclimatación en un túnel de plástico con humedad relativa constante, después de lo cual se trasplantaron en invernadero en macetas con tezontle regadas con la solución nutritiva de Steiner (1984) al 100 %.

3.2.2 Material vegetal

Se establecieron semillas botánicas de 12 Familias de Medios Hermanos Maternos (FMHM) S₃ derivadas por cruza fraternales de las variedades Diamante, Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa y Morado San Miguel, tres familias por cada variedad. Las familias fueron proporcionadas por el Programa de Mejoramiento Genético de Tomate de Cáscara de la Universidad Autónoma Chapingo. Las familias originales se obtuvieron con base en un ciclo de selección

masal y uno de selección familiar (Peña y Márquez, 1990) en cada una de las variedades se representan las mejores familias de cada variedad (familias selectas), como se ilustra en la Figura 1. Las 12 familias selectas se sembraron en primavera de 2017 en charolas de poliestireno de 200 cavidades con Cosmopeat como sustrato; cinco semanas después se trasplantaron al invernadero dos plantas por maceta llenas con tezontle, alcanzando un total de 54 macetas por familia enumeradas del 1 al 54. Veinte días después del trasplante se llevó a cabo una selección, con base en el mejor individuo por contenedor. Se tomaron datos de todas las plantas con las variables de número de flores, número de frutos, vigor y sanidad de la planta para seleccionar los 10 mejores individuos por cada familia. De estos mejores individuos de cada una de las 12 familias, se tomaron yemas axilares y ápices de los tallos para su desinfestación, su micropropagación en el laboratorio de cultivo de tejidos y después su aclimatación y trasplante en el invernadero. De estas plantas clon provenientes del laboratorio, en diciembre de 2017 se colectaron yemas axilares y ápices de plantas sanas de las variedades Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa y Morado San Miguel. De estos clones originales, debido a respuestas desfavorables en cultivo *in vitro*, sólo se logró obtener clones de la variedad Tecozautla (uno de la familia 2 y otro de la familia 3); Morado San Miguel (2 clones diferentes de la familia 2, 2 clones diferentes de la familia 3 y un clon de la familia 1); finalmente, un clon de la familia 2 de la variedad Manzano Tepetlixpa; es decir, se estudiaron 8 familias clonales, lo cual se debió a que no todas las familias originales tuvieron una respuesta favorable al cultivo *in vitro*.

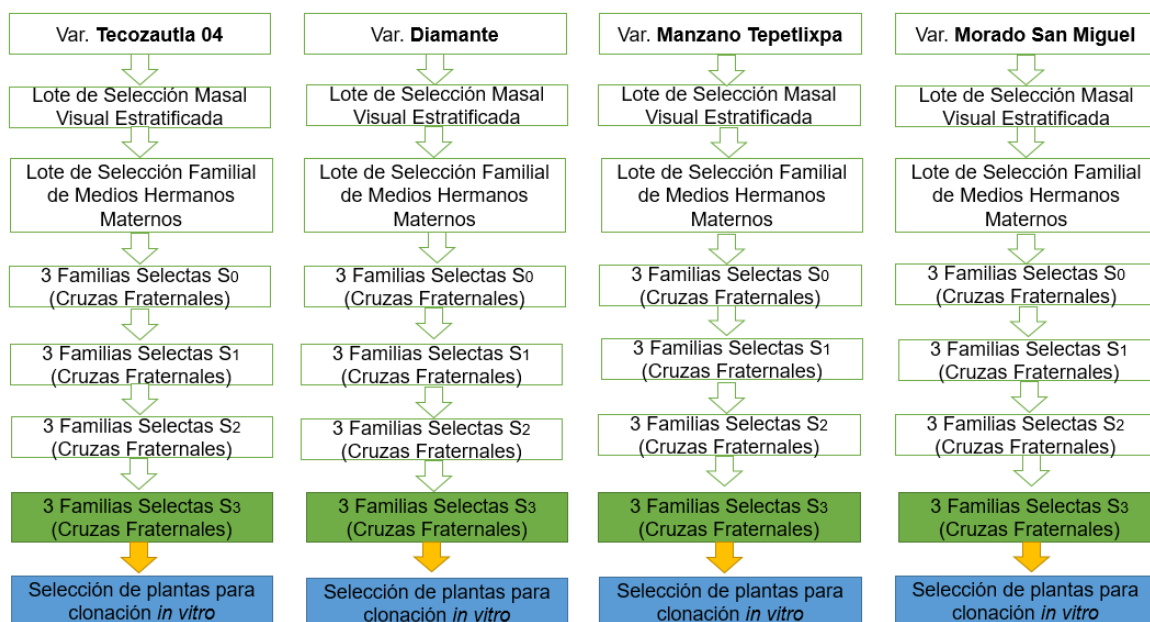


Figura 1. Esquema de mejoramiento genético para la obtención de Familias Selectas de Medios Hermanos Maternos de las cuatro variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) y selección para cultivo *in vitro*

3.2.3 Obtención de yemas y establecimiento aséptico

El tratamiento de desinfestación de yemas consistió en lavar vigorosamente con detergente y Tween 20 separando cuidadosamente ápices y yemas, después, los explantes se sumergieron en una solución de alcohol diluido en agua al 70 % durante tres minutos, luego se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) diluido en agua al 7 % sumergidas durante 15 minutos, posteriormente se enjuagaron tres veces en agua estéril y finalmente se realizó la siembra *in vitro*.

3.2.4 Propagación *in vitro* de yemas, enraizamiento y evaluación

Para la multiplicación de los ápices y las yemas se utilizó el medio de cultivo con las sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962) al 100 % suplementado con 0.4 mg·L⁻¹ de Tiamina y 60 mg·L⁻¹ L-cisteína; 100 mg·L⁻¹ de Myo- inositol; 0.5

mg·L⁻¹ de Ácido nicotínico; 0.5 mg·L⁻¹ de Ácido pantoténico; 3 % de sacarosa; 7 g·L⁻¹ de agar y ajuste de pH a 5.7 ± 0.1 .

Estos medios de cultivo se vertieron en frascos de vidrio claro cuyo volumen es de 460 ml (78.3 mm de diámetro y 134.95 mm altura) con una tapa con rosca twist-off. A cada tarro se le vertió 50 ml de medio de cultivo. Los tarros, los bisturí, tijeras, cristales, y agua se esterilizaron en la autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.5 kg·cm⁻² durante 20 minutos. Posteriormente, con los explantes desinfestados y los materiales esterilizados, se procedió a sembrar los explantes en la campana de flujo laminar. Una vez sembrados las yemas y ápices en los tarros, se trasladaron al área de cultivo del laboratorio durante 30 días, bajo condiciones de 16 horas de luz e iluminación de 3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.2.5 Aclimatización de plantas

Para esta etapa, se utilizó como sustrato turba (Cosmopeat®), el cual se esterilizó y se depositó en vasos de unicel del número 8. Se extrajeron las plántulas de los frascos. Estas plantas se enjuagaron con agua, se tomaron datos y se trasplantaron a los vasos. Después, los vasos se colocaron en un mini invernadero con un sistema de nebulización de ocho riegos por día, con un intervalo entre un riego y otro de una hora, la duración de cada riego fue de 5 minutos. Con este sistema de nebulización se mantuvo una humedad relativa entre 60 y 100 %, con una temperatura media de 25 °C. Todo el sistema de aclimatización se mantuvo activo durante 15 días.

3.2.6 Establecimiento bajo invernadero

Una vez que las plántulas ya estaban aclimatizadas, se trasplantaron al invernadero en macetas de polietileno negro con un volumen de 18 L de tezontle

como sustrato. El riego fue por goteo con una solución nutritiva Steiner al 100 % (Steiner, 1984). Se tomaron datos cada dos semanas.

3.2.7 Variables evaluadas

En la etapa de micropropagación *in vitro* y enraizamiento en el laboratorio, se registraron datos de altura de planta, vigor de tallo, presencia de callo, sanidad, longitud de raíz, número de hojas, raíces, tallos y botones. En la etapa de aclimatización se registraron los datos de altura de planta, número de hojas, flores, botones, y se determinó el porcentaje de aclimatización. Finalmente, para estudiar la fenología de los clones trasplantados en el invernadero, se registró la altura de planta, número de bolsas, de flores y de hojas.

3.2.8 Diseño experimental

Para evaluar la respuesta a la micropropagación a través del enraizamiento en el laboratorio, se usó un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental se constituyó de tres plantas por frasco con cuatro repeticiones por familia. Para evaluar la aclimatización se hizo un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones y la unidad experimental se constituyó de siete plantas, donde se evaluó la altura, número de hojas, flores, botones. Para evaluar la fenología, se utilizó un diseño de bloque completo al azar con cuatro repeticiones y la unidad experimental fue de siete plantas donde se midió altura, número de hojas, de flores y de bolsas.

3.2.9 Análisis de datos

Para los datos de laboratorio, se hizo análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ($p = 0.05$) para las variables: altura de planta, longitud de raíz, número de hojas, raíz, tallos, botones, y bolsas, utilizando el programa de análisis estadístico SAS (SAS institute Inc. 2002). Para evaluar vigor

de plántula se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y para presencia de callo una comparación de proporciones binomiales con ($p = 0.05$).

Se hizo análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ($p = 0.05$) para las variables de la etapa de aclimatización (de altura de planta, número de hojas, flores, botones y tallos) y del estudio de la fenología (altura de planta, número de hojas, flores y bolsas).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Cultivo *in vitro*

Altura de planta

La altura de planta de las ocho familias clonales muestran una ligera diferencia entre sí, mostrando las mayores alturas para las familias 2 de Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa y la familia 3a de Morado San Miguel y los menores valores para la familia 1 de Morado San Miguel y la familia 3 de Tecozautla 04 (Cuadro 2). Las plantas de la familia 2b de la variedad Morado San Miguel presentó respuesta favorable a la altura, al igual que las plantas desarrolladas de las familias clonales 2 de la familia Tecozautla 04 (Figura 2).



Figura 2. Plantas de las familias clonales cultivadas *in vitro*. a) Planta de la familia 2b de la variedad Morado San Miguel. b) Planta de la familia 2 de la variedad Tecozautla 04.

Número de hojas

Para el número de hojas, la familia 2 de la variedad Tecozautla 04 presentó la mayor cantidad en relación a las demás familias, entre las cuales no hubo diferencias significativas para dicha variable (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de medias para altura de planta, longitud de raíz, número de hojas, raíces, tallos y botones tomadas de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) *in vitro*.

Variedad	Familia	ALT	NH	LR	NR	NT	NB
Morado	1	4.16 b ^z	7.3 b	1.86 c	9.6 b	1.6 a	1.4 ab
Morado	2a	8.26 ab	5.5 b	15.76 a	29.9 b	1.1 ab	0.4 c
Morado	3a	9.04 a	5.4 b	11.66 ab	65.5 a	0.9 b	0.9 bc
Morado	2b	8.26 ab	7.3 b	7.27 bc	26 b	1.0 b	0.3 c
Morado	3b	6.53 ab	8.8 b	5.51 bc	34.7 b	1.4 ab	0.4 c
Manzano	2	9.79 a	8.3 b	6.58 bc	14.5 b	1.0 b	0.0 c
Tecozautla	2	10.5 a	14.7 a	10.63 ab	22.1 b	1.1 ab	0.0 c
Tecozautla	3	4.45 b	5.3 b	8.53 bc	20.5 b	1.2 ab	2.1 a
DMSH ^y		4.38	4.9	6.88	27.6	0.6	1

^zMedias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDMSH: diferencia mínima significativa honesta; ALT: altura de planta; NH: número de hojas; LR: longitud de raíz; NR: número de raíces; NT: número de tallos; NB: número de botones.

Longitud de raíz

El mayor valor para esta variable fue presentado por la familia 2a, y el valor menor fue para la familia 1 de Morados San Miguel (Cuadro 2).

Número de raíces

Para el número de raíces la familia que presentó un desarrollo radical mayor fue la 3a de la variedad Morado San Miguel, mientras que, para las demás familias, el número de raíces no fue significativamente diferente (Cuadro 2). El sistema radicular de las plantas se desarrolló en mayor o menor medida dependiendo de la familia y la variedad. Las plantas de la familia clonal 3 de la variedad Tecozautla 04 presentaron un desarrollo vigoroso de raíces (Figura 3).



Figura 3. Sistema radicular cultivada *in vitro* de la planta de la familia 3 de la variedad Tecozautla 04.

Número de tallos

El mayor número de tallos desarrollados por explante correspondió a la familia 1 de la variedad Morado San Miguel. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en relación con las familias 2a y 3b de la misma variedad y de la familia 2 y 3 de Tecozautla 04. Y el menor número de tallos la presentó la familia 3a, 2b de Morado San Miguel y de la familia 2 de Manzano Tepetlixpa (Cuadro 2).

Número de botones

Para esta variable, la familia 3 de la variedad Tecozautla 04 presentó el mayor número de botones, pero sin diferencia significativa en relación a la familia 1 de la variedad Morado San Miguel. El menor número de botones lo presentaron las demás familias sin mostrar diferencias significativas entre sí (Cuadro 2).

Vigor de tallo

Las plantas que desarrollaron el mayor vigor del tallo correspondieron a la familia 2 de la variedad Tecozautla, sin mostrar diferencia significativamente en relación a la familia 2 de la variedad Manzano Tepetlixpa. Las familias que desarrollaron el menor vigor en sus tallos fueron la 1 de la variedad Morado San Miguel y la 3 de Tecozautla 04 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Prueba de Kruskal-Wallis para vigor de tallo y comparación de proporciones binomiales para presencia de callo y sanidad en plantas de tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm) regeneradas *in vitro*.

Variedad	Familia	R(x)		Callo		Sanidad	
Morado	1	23.083	e ^y	0.667	ab ^z	0.417	ab
Morado	2a	49.208	c	0.167	cd	0.583	a
Morado	3a	53.227	bc	0.909	a	0.182	bcd
Morado	2b	47.000	cd	0.333	bc	0.250	abc
Morado	3b	41.667	cd	0.833	a	0.083	cd
Manzano	2	66.958	ab	0.750	a	0.000	d
Tecozautla	2	71.833	a	0.000	d	0.000	d
Tecozautla	3	31.458	de	0.333	bc	0.167	bcd
Tc ^x		34.431	**				

^zProporciones con las mismas letras dentro de columnas no son diferentes (p=0.05). ^yRangos con la misma letra no son diferentes (Kruskal-Wallis, 0.05). ^xEstadístico de la prueba de Kruskal-Wallis. ^{**}Significancia con p=0.01.

Presencia de callo y sanidad

Respecto a la presencia de callo los explantes de las familias que desarrollaron fueron la 3a, 3b de la variedad Morado San Miguel y la 2 de Manzano Tepetlixpa.

La variedad que menos callo presentó fueron la familia 2 de Tecozautla y la 2a de Morado San Miguel. Y para la sanidad, las plantas que presentaron más problemas de enfermedad fueron las familias 1, 2a y 2b de Morados. Las familias que no presentaron problemas de sanidad fueron las familias 2 de Manzano Tepetlixpa, la 2 de Tecozautla 04, la 3b y la 3a de los Morados (Cuadro 3).

La respuesta al número de raíces se logró obtener de manera exitosa *in vitro* con el medio MS al 100 % sin adición de reguladores del crecimiento y varió en función del genotipo. Esto coincide con el trabajo de Manzo *et al.* (1998) quienes lograron inducir la formación de raíces con el medio MS al 100 % y sin reguladores del crecimiento en las variedades Rendidora, Salamanca y Tamazula de tomate de cáscara. Donde obtuvieron diferente número de raíces entre las variedades. Por su parte, Andrade (1998), al enraizar *in vivo* las diez variedades de tomate de cáscara provenientes del cultivo *in vitro* en MS al 100 % sin adición de reguladores del crecimiento, obtuvo número y longitud de raíces diferentes de acuerdo al genotipo empleado.

Las respuestas diferenciadas al cultivo *in vitro* obtenidas entre las familias clonales de las tres variedades estuvo en función del genotipo particular de cada una. Esto fue demostrado por Andrade (2005), quien observó que la capacidad de propagación *in vitro* del tomate de cáscara varió en función del genotipo de la variedad utilizada. Por su parte Abdul *et al.* (2016) también encontró respuestas diferentes al cultivo *in vitro* en de cinco variedades de *Solanum melongena* L. respecto al número de brotes regenerados por explante y su enraizamiento utilizando el medio MS al 100 % sin reguladores del crecimiento.

3.3.2 Aclimatización

Altura de planta

Al inicio de la aclimatización, solo la familia 1 presenta la menor altura y las demás familias presentan las mayores alturas sin diferencias significativas entre ellas (Cuadro 4). Después de dos semanas bajo la aclimatización, las únicas familias que presentaron las menores alturas fueron las familias 1 y 3b de la variedad Morado San Miguel, y la 2 de Tecozautla 04 (Figura 6).

Número de hojas

Para el número de hojas, al comenzar la aclimatización la familia con mayor cantidad de hojas fue la 3b de Morado San Miguel y el menor valor fue para la familia 3 de Tecozautla (Cuadro 4). Después de la aclimatización, el mayor número de hojas correspondió a la familia 1 de Morado San Miguel. La menor cantidad de hojas fue para la familia 2 de la variedad Tecozautla 04 (Figura 11).

Cuadro 4. Comparación de medias para altura de planta, número de hojas, flores, botones y tallos tomadas de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) regeneradas *in vitro* para aclimatización.

Variedad	Familia	ALT	NH	NF	NB	NT
Morado	1	4.42 b ^z	11.6 de	0.00 b	1.3 cd	1.6 a
Morado	2a	12.95 a	13.6 cde	0.3 a	2.3 bc	1.2 ab
Morado	3a	12.92 a	18.6 abc	0.2 ab	4.00 a	1.5 ab
Morado	2b	13.66 a	16.7 abcd	0.1 ab	3.00 ab	1.3 ab
Morado	3b	12.38 a	21.3 a	0.00 b	0.8 d	1.4 ab
Manzano	2	10.87 a	14.2 bcde	0.00 b	1.5 cd	1.3 ab
Tecozautla	2	10.88 a	19.8 ab	0.1 ab	1.8 bcd	1.3 ab
Tecozautla	3	11.28 a	10.1 e	0.1 ab	2.2 bcd	1.1 b
DMSH ^y		2.96	5.8	0.3	1.4	0.5

^zValores de las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

^yDMSH: diferencia mínima significativa honesta. ALT: altura de planta; NH: número de hojas; NF: número de flores; NB: número de botones; NT: número de tallos.

Número de botones

El mayor número de botones las presentaron las familias 3a y 2b de la variedad Morado San Miguel y la menor cantidad de botones fueron para las familias 1 y 3b de Morado, la 2 y 3 de Tecozautla 04, y la 2 de Manzano Tepetlixpa (Cuadro 4). Posteriormente a la aclimatización, todas las familias presentaron una cantidad de botones que no eran significativamente diferentes entre dichas familias (Figura 8).

Número de flores

Respecto a la cantidad de flores previo a la aclimatización, la familia que presentó flores fue la 2a de Morado San Miguel y las únicas familias que no presentaron flores fueron las familias 1 y 3b de la variedad Morado San Miguel (Cuadro 4). Después de la aclimatización, las familias que desarrollaron más flores fue la familia 3a de Morado y la familia 2 de Tecozautla 04 resultó con menor número de flores (Figura 10).

Número de tallos

La familia con mayor número de tallos fue la Morado 1, aunque solo superó significativamente a la familia 3 de Tecozautla que fue la de menor valor (Cuadro 4).

Porcentaje de sobrevivencia a la aclimatización

Al inicio de la etapa de aclimatización, las plantas debido a las condiciones anatómicas de las hojas provenientes del cultivo *in vitro* presentaron una transpiración excesiva (Figura 4a y 4b). No obstante, para todas las familias clonales de las tres variedades se obtuvo el 100 % de sobrevivencia con una excelente respuesta al protocolo establecido controlando principalmente la

humedad relativa mediante nebulización (Figura 5a y 5b). Esto coincide con el trabajo realizado por Andrade (2005) quien obtuvo un porcentaje igual de sobrevivencia al aclimatizar ocho variedades mejoradas y dos razas silvestres de *Physalis ixocarpa* Brot. con un método alterno durante dos semanas baja invernadero. Por su parte, Manzo et al. (1998), logró en una primera etapa un 50 % de sobrevivencia y un 100 % al mejorar las condiciones del sistema de aclimatización plantas de tomate de cáscara de las variedades Rendidora, Salamanca y Tamazula obtenidas *in vitro*.



Figura 4. Plantas obtenidas de cultivo *in vitro* al inicio de la aclimatización. a) Todas las familias de clones de las variedades Morado San Miguel, Tecozautla 04 y Manzano Tepetlixpa. b) Plantas de la familia 1 de Morado San Miguel.

Además, el éxito logrado en aclimatización se debió en primer lugar a la inducción un sistema de raíces funcional *in vitro* aceptable en todas las familias clonales (Cuadro 2). Un buen sistema radicular es indispensable para garantizar un alto porcentaje de sobrevivencia a las condiciones *ex vitro* después del trasplante (Teixeira da Silva *et al.*, 2017), debido a que las raíces generadas *in vitro*, continúan su crecimiento durante el proceso de aclimatización *ex vitro* (Nowak and Pruski, 2004). En segundo lugar, al mantenimiento de una humedad relativa alta y una disminución gradual de esta, mejora el proceso de adaptación de la morfología y fisiología principalmente de las hojas, lo cual se demuestra con el trabajo de Shekhawat *et al.* (2015), al aclimatizar plantas provenientes de *in vitro* de *Passiflora foetida* L. durante un mes manteniendo la humedad relativa al 100

% las primeras dos semanas y disminuyéndola las dos semanas posteriores lograron una supervivencia después de la aclimatización del 100 %.

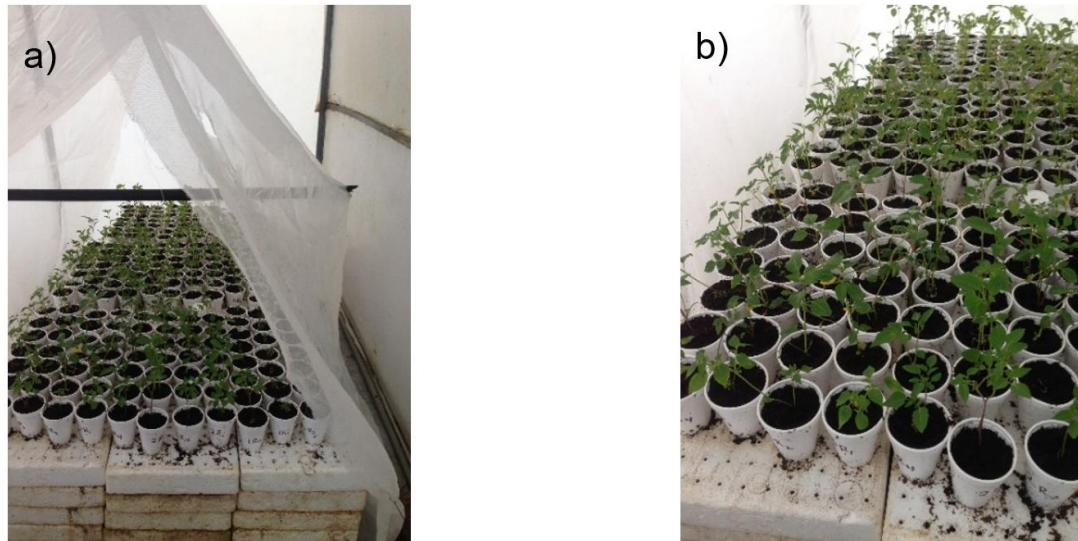


Figura 5. Plantas obtenidas cultivo *in vitro* después de 15 días de aclimatización. a) Sistema de aclimatización bajo nebulización y malla sombra en invernadero. b) Familias de plantas de las tres variedades de tomate de cáscara después de 10 días de aclimatización.

3.3.3 Establecimiento bajo invernadero

Altura de planta

El desarrollo fenológico de las plantas clonadas de las diferentes familias de las tres variedades evaluadas muestra un comportamiento diferenciado debido al tipo de crecimiento que presentan, la variedad Morado San Miguel describe un crecimiento de tipo postrado o rastrero, mientras que Tecozautla 04 y Manzano Tepetlixpa un crecimiento erecto. Al inicio del trasplante al invernadero las plantas provenientes de la aclimatización presentaron una buena altura (Figura 7a y 7b).

Para la variable de altura de planta, la familia 2 de Manzano Tepetlixpa presentó la mayor altura y las familias 1 y 3b de Morado San Miguel el menor valor de

altura a lo largo de la evaluación. Cabe señalar que al final del ciclo, que las familias 2 de Tecozautla 04 y la 2b de Morados, se eliminaron debido a la presencia de un fitopatógeno (Figura 6). Además, se puede observar que el incremento de altura de las plantas en todas las familias no decrece durante el ciclo fenológico evaluado.

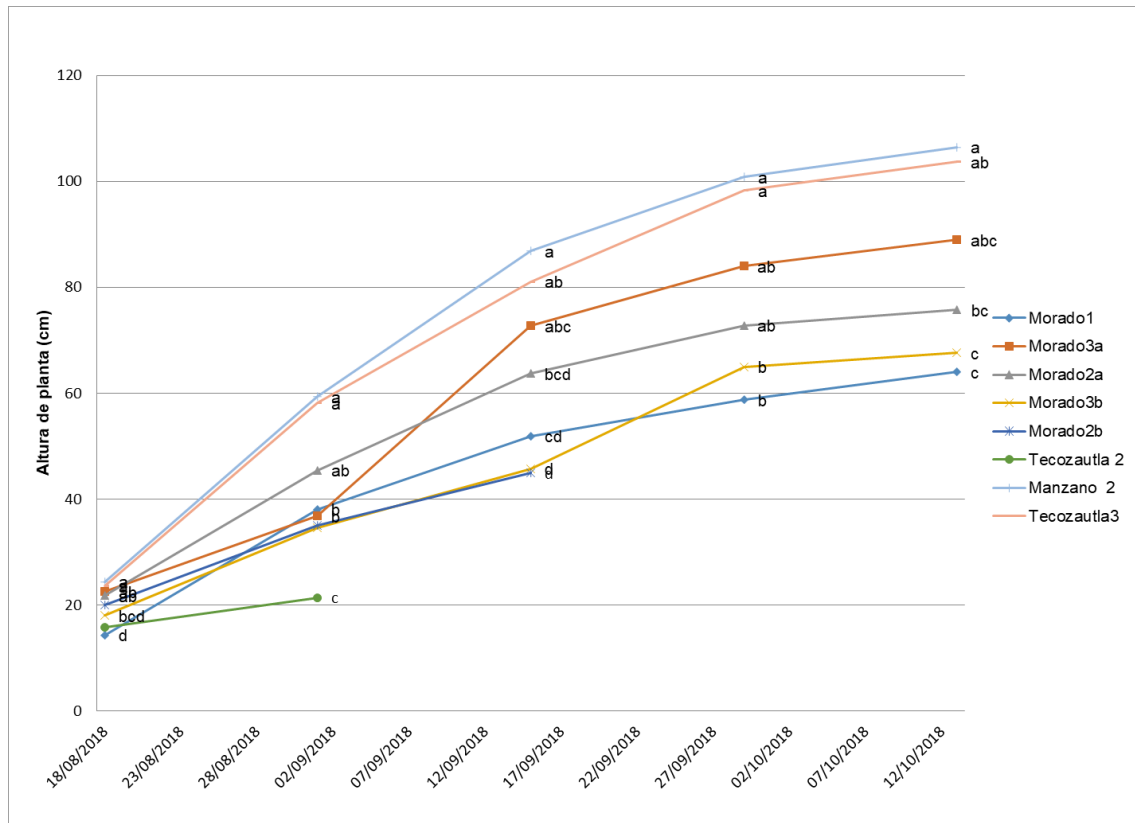


Figura 6. Comparación de medias de altura de planta de las familias de clones de las tres variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) bajo invernadero a lo largo de 75 días a partir de la aclimatización. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).



Figura 7. Plantas aclimatizadas trasplantadas al invernadero. a) planta de la familia clonal 2b de la variedad Morado San Miguel. b) Planta de la familia clonal 2 de la variedad Manzano Tepetlixpa.

Número de bolsas

Para la variable de número de bolsas, las familias 1 y 3b de la variedad Morado San Miguel presentaron el mayor número de bolsas, mientras que las familias de Tecozautla 04 y Manzano Tepetlixpa desarrollaron menor cantidad (Figura 8). Esto debido principalmente al hábito de crecimiento, en los cuales los de tipo rastrero presentan mayor número total de bolsas que los de crecimiento erecto, mostrando ser un poco más productivos (Cartujano, Fernández y Jankiewics, 1987).

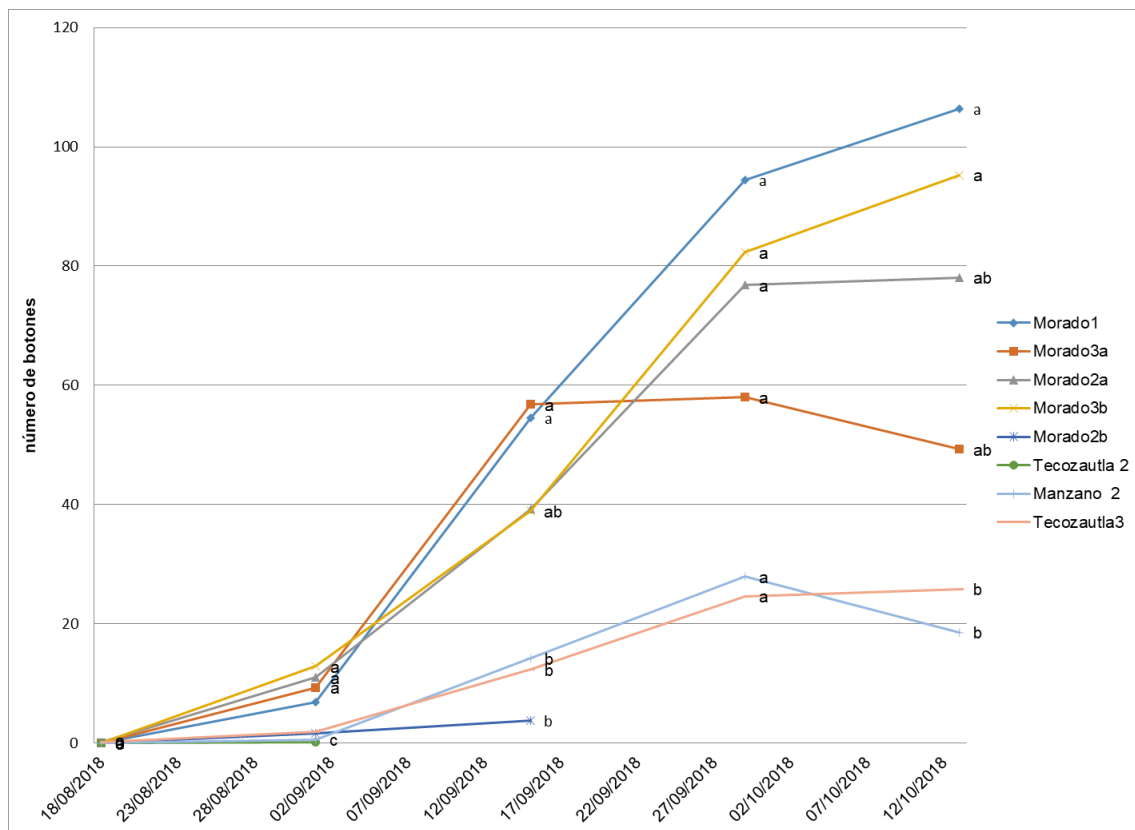


Figura 8. Comparación de medias de número de bolsas en plantas de las familias de clones de las tres variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) bajo invernadero a lo largo de 75 días a partir de la aclimatización. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

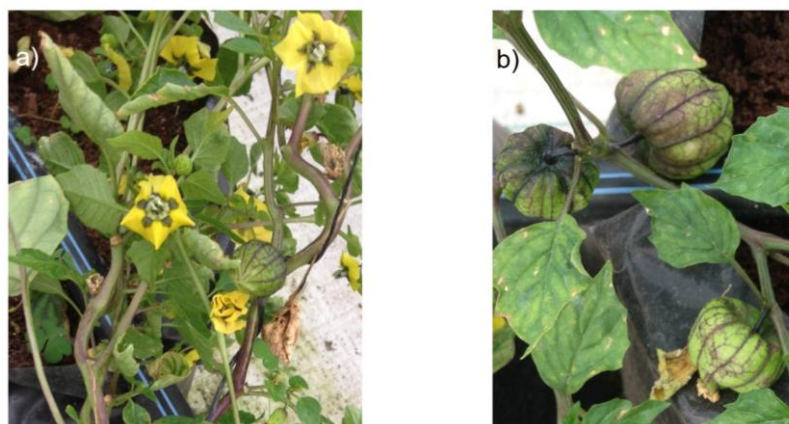


Figura 9. Plantas obtenidas *in vitro* a los 75 días después de la aclimatización bajo invernadero. a) Flores de las plantas de la familia clonal 1 de la variedad

Morado San Miguel. b) Frutos desarrollados de la familia clonal 2 de la variedad Morado San Miguel.

Número de flores

Para el número de flores, al inicio de la evaluación la familia 3a de Morado San Miguel presentó el mayor valor y la familia 2 de Tecozautla 04 el menor. Al final de la evaluación las familias 3 de Tecozautla 04 y 1 de Morado San Miguel presentaron la cantidad menor de flores en relación a las demás familias (Figura 9a y 10). Como se observa en la Figura 10, al inicio del ciclo, el número de flores sufre un incremento hasta la semana 10, pero, a partir de ahí, se presenta un decremento en la formación de botones y flores debido al continuo crecimiento de órganos generativos que provocan competencia entre ellos (Cartujano, Fernández y Jankiewics, 1987).

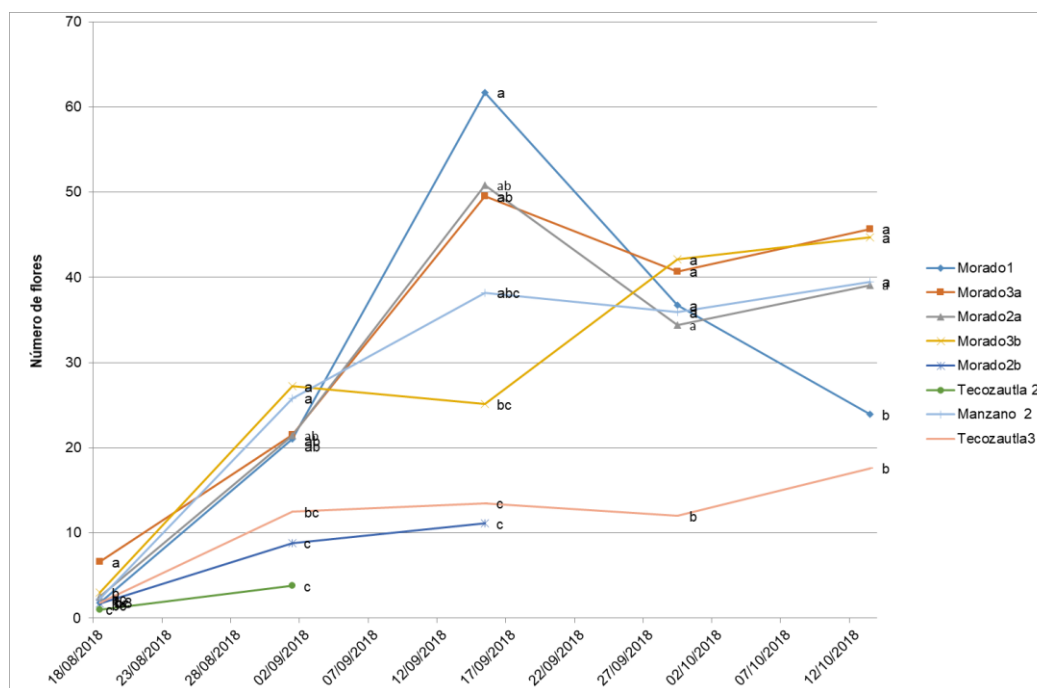


Figura 10. Comparación de medias de número de flores de plantas de las familias de clones de las tres variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) bajo invernadero a lo largo de 75 días a partir de la aclimatización. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

Número de hojas

Respecto a esta variable, la familia 1 de la variedad Morado San Miguel presentó el mayor número de hojas y la familia 2 de Tecozautla 04 el menor número al inicio de la evaluación. No obstante, al final de la evaluación, la cantidad de hojas entre todas las familias de las tres variedades no fueron significativamente diferentes (Figura 11). Como se aprecia en la Figura 11, el incremento del número de hojas continúa hasta las últimas semanas de evaluación, fenómeno que en plantas provenientes de semilla no ocurre de la misma manera de acuerdo con las cuatro fases fenológicas descritas en tomate de cáscara por Cartujano, Fernández y Jankiewics (1987), debido probablemente a una mayor juvenilidad de plantas obtenida *in vitro*.

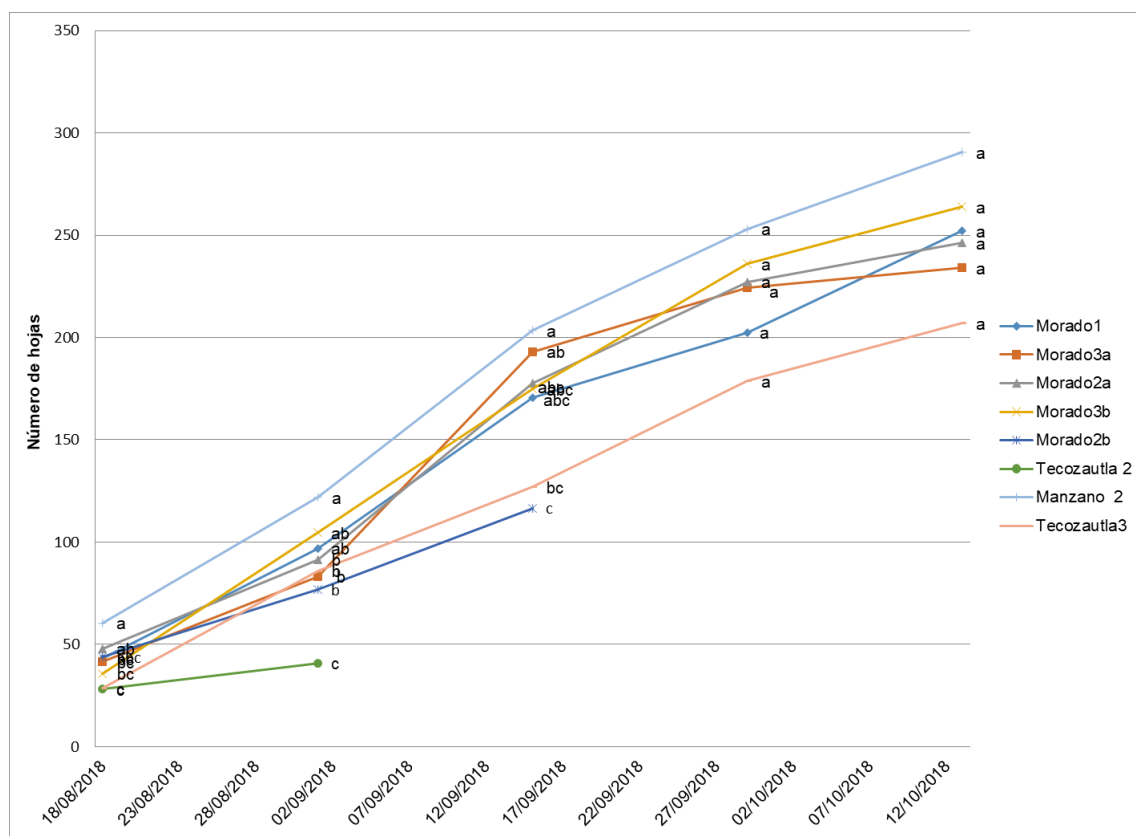


Figura 11. Comparación de medias de número de hojas de plantas de las familias de clones de las tres variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) bajo invernadero a lo largo de 75 días a partir de la aclimatización. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

De lo anterior, se puede afirmar que las variables evaluadas y su mayor expresión en cada una, obedece principalmente al hábito de crecimiento de cada variedad. Respecto al número de bolsas y flores, las familias de Morado San Miguel expresaron el mayor valor que las demás variedades, como resultado de un mayor nivel de ramificación que presentan por su hábito rastrero, lo que significa que son más productivas (Cartujano, Fernández y Jankiewics, 1987). Respecto a la altura, número de hojas y de flores expresado, se puede confirmar que las plantas provenientes de cultivo *in vitro* presentan un menor valor en comparación a las plantas provenientes de semilla (Rivera y Mercado, 2018). No obstante, el ciclo de vida de las plantas obtenidas por propagación *in vitro*, comprendió alrededor de los 98 días contados a partir del cultivo *in vitro* en el laboratorio hasta el desarrollo de los primeros frutos, comprendiendo las etapas de regeneración, enraizamiento, aclimatación y su desarrollo bajo invernadero (Figura 12), lo cual de cierta manera coincide con el ciclo de vida de las plantas provenientes de semilla (Mulato, Fernández y Jankiewics, 1987).

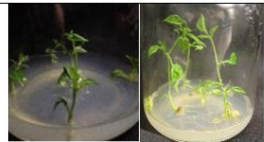
														
Conteos						1°		2°		3°		4°		5°
semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Cultivo y enraizamiento <i>in vitro</i> (regeneración)				Aclimatación		Desarrollo vegetativo y reproductivo bajo invernadero							
					Aparición de botones, flores y bolsas		Formación de botones, flores y bolsas							
							Polinización y desarrollo de frutos							

Figura 12. Fenología de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) de plantas obtenidas *in vitro*.

El vigor expresado por las plantas obtenidas *in vitro* en relación a las de semilla, puede deberse a los cambios anatómicos y fisiológicos que experimentaron, principalmente en las hojas, en la etapa de transición de condiciones *in vitro* a *ex vitro*, lo que provoca un desarrollo lento (Driver y Suttle, 1986). Además, se realizó una polinización controlada manualmente para la cruce interclonal entre cinco familias para producir frutos con semilla híbrida, obteniendo un amarre normal al principio (Figura 13). Sin embargo, debido a la presencia de fitopatógenos en el invernadero se presentó aborto de muchos frutos, por lo cual solo fue posible obtener muy poca semilla híbrida provenientes de estos frutos. Por esta razón, en el cruzamiento se descartaron 3 familias clonales, las cuales presentaron un desarrollo anormal, con enchinamiento y clorosis intervenal en hojas, mismas que fueron eliminadas del invernadero (Figura 14).

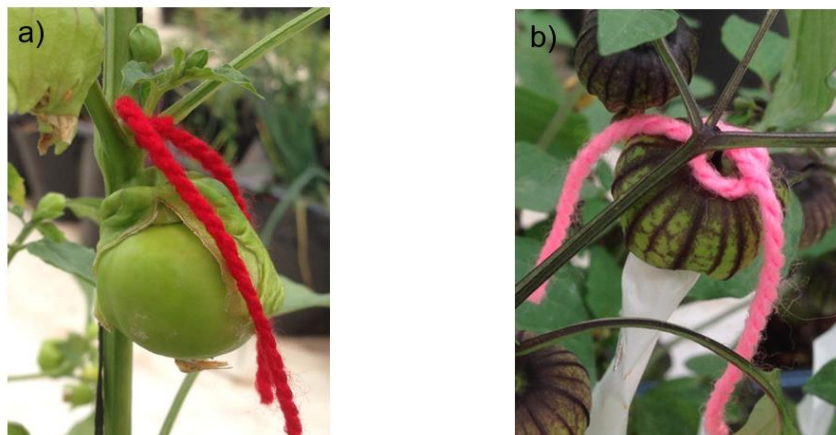


Figura 13. Frutos amarrados de cruza interclonales. a) Fruto de la cruce interclonal entre la familia 3 de Tecozautla 04 y 2 de Manzano Tepetlixpa. b) Fruto de la cruce interclonal entre la familia 1 y 2a de Morado San Miguel.



Figura 14. Planta obtenida *in vitro* de la familia 2a de Morado San Miguel con síntomas de enfermedad.

3.4 Conclusiones

Se estableció con éxito el protocolo de cultivo *in vitro* y aclimatización, obteniendo un porcentaje de sobrevivencia del 100 % para todas las familias de clones de las tres variedades. La respuesta al cultivo *in vitro* en las familias clonales dependió del genotipo, sobresaliendo las familias clonales de las variedades Tecozautla 04 y Manzano Tepetlixpa y de menor respuesta las familias clonales de la variedad Morado San Miguel. La fenología de las familias clonales presentó un desarrollo normal de acuerdo al tipo de crecimiento a la variedad de origen y similar a la fenología de plantas de semilla.

3.5 Literatura citada

- Abdul, M. Md., Ashraful, H. M., Abdul, K. M. Md., & Abdullah, Y. A. Md, 2016. Regeneration efficiency based on genotype, culture condition and growth regulators of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Agriculture and Natural Resources*, 50, 38-42. doi: 10.1016/j.anres.2014.10.001
- Andrade, R. M., López, P. M. C., González, H. V. A., García, V. A., y Peña, L. A. 2005. Efecto del genotipo en la micropropagación de tomate de cáscara. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(1),31-37.

- Cartujano, E. F., Fernández, O. V.M., y Jankiewicz, L. S. 1987. Tomate de cáscara variedad rendidora: desarrollo y fenología. *Revista Chapingo*, 56-57,48-50.
- Cheng, Y., Ma, R., Jiao, Y. Qiao, N., & Li, T. 2013. Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *South African Journal of Botany*, 88,306-309. doi: 10.1016/j.sajb.2013.08.012
- Chu, C.C. 1981. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*, 1978. Pitman Pub. Ltd. and The Science Press. Peking, China. pp. 35-42.
- Drew, A. P., Kavanagh, K. L., & Maynard, C.A. 1992. Acclimatizing micropropagated black cherry by comparison with half-sib seedlings. *Physiol. Plant*, 86, 459–464. doi:10.1111/j.1399-3054.1992.tb01344.x
- Driver, J. A., & G. R. L. Suttle.1986. Nursery handling of propagules. In J. M. Bonga and D. J. Durzan, eds. *Cell and tissue culture in forestry*, 2nd ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. pp. 320-31
- Dore, C. 1987. Application of tissue culture to vegetable crop improvement. In C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer, eds. *Plant tissue and cell culture*. New York: Alan R. Liss. pp. 419-32.
- García, O. H.T., Escobedo, B. L., Robledo, T. V., Benavides, M. A., y Ramírez, G. F. 2018. Germinación y micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) tetraploide. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (12), 2301-2311. doi: 10.29312/remexca.v0i12.763
- Grout, B. W. W., Millam, S. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Ann Bot*, 55, 129–131. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a086872
- Kallak, H., Reidla, M., Hilpus, I., & Virumäe, K. 1997. Effects of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 127-135. doi:10.1023/A:1005932229770
- Manzo, G. A., Ledesma, H. A., Villatoro, L. J. C., Álvarez-Escareño, I., Rodríguez De La O., J. L., y Peña, L. A. 1997. Regeneración in vitro de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 4, 45-49. doi: 10.5154/r.rchsh.1997.06.044
- Mulato, B. J., Fernández, O. V.M., y Jankiewicz, L. S. 1987. Tomate de cáscara: desarrollo y fenología. *Revista Chapingo*, 56-57,44-47.

- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163,85-87. doi: 10.1126/science.163.3862.85
- Nowak, J., & Pruski, K. 2004. Priming tissue cultured propagules, in: *Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, 26–30 August 2002*, pp. 68–81.
- Ortuño, O. L., Manzo, G. A., y Peña, L. A. 1997. Cultivo de anteras en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 4, 39-43. doi: 10.5154/r.rchsh.1997.06.045
- Pandey, K. K. 1957. Genetics of self-incompatibility in *Physalis ixocarpa* Brot. A new system. *American Journal of Botany*, 44, 879-887. doi: 10.1002/j.1537-2197.1957.tb08275.x
- Peña, L. A., y Márquez, S. F. 1990. Mejoramiento genético de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo*, 71-72, 84-88.
- Ramírez M. R., & Ochoa A. N. 1991. Adventitious shoot formation and plant regeneration from tissues of tomatillo (*Physalis ixocarpa*, Brot.). *Plant Cell and Organ Culture*, 25, 185-188. doi: 10.1007/BF00036209
- Rivera, C. C., y Mercado, G., D. A. 2018. Micropropagación *in vitro* de cultivares selectos de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Chapingo, México. 93 p.
- Santiaguillo, H. J. F., Cervantes, S. T., y Peña, L. A. 2004. Selección para rendimiento y calidad de fruto de cruces planta x planta entre dos variedades de tomate de cáscara. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 1(27), 85-91.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2018. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do (consultado 06 de febrero de 2019).
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). 2018. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/401833/CNVV3erTrim18_web.pdf (consultado 06 de febrero de 2019).

- Shekhawat, M., Kannan, N., Manokari, M., & Ravindran, C.P. 2015. *In vitro* regeneration of shoots and *ex vitro* rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13, 209-214. doi: 10.1016/j.jgeb.2015.08.002
- Steiner, A. A. 1984. The universal solution. Proceedings of 6th International Congress on Soilless Culture. ISOSC. Lunteren, The Netherlands. pp. 633-649.
- Teixeira da Silva, J. A., Hossain, M. M., Sharma, M., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Zeng, S.J. 2017. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*, 3 (3), 110-124. doi: 10.1016/j.hpj.2017.07.009
- Torres, K. C. 1957. Tissue culture techniques for horticultural crops. Van Nostrand Reinhold. New York. pp. 1-69
- Van, G. J., De Kroon, H. 1990. Clonal Growth in Plants: Regulation and Function. S.P.B. Academic Publishing. The Hague, The Netherlands. 196 p.