



"Enseñar la explotación de
la tierra, no la del hombre"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

REGENERACIÓN POR ORGANOGÉNESIS Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA

BASTIDA CAÑADA ITZEL VELNECI



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



Instituto de Horticultura

Chapingo, México, junio de 2016

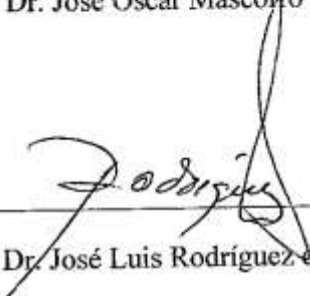
REGENERACIÓN POR ORGANOGÉNESIS Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE
TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

Tesis realizada por la **Ing. Itzel Velneci Bastida Cañada** bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

DIRECTOR: 
Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez

ASESOR: 
Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR: 
Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR: 
Dr. Jaime Sahagún Castellanos

DEDICATORIAS

Para Dafne Naomi e Ian Alexander, a su tiempo cada uno inicio esta etapa a mi lado y son el motivo por el que cada día despierto con la uerza y voluntad para seguir adelante. Los amo infinitamente.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia Y tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, las palabras no alcanzan para expresar el infinito agradecimiento, mi *alma mater* ha sido mi guía, mi fe, mi familia.

Al Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez, por su valiosa y estricta dirección, así como por el seguimiento y evaluaciones constantes en el progreso de esta investigación.

Al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo por sus grandes aciertos en el asesoramiento y la realización de la presente tesis.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por su gran aporte en la elaboración de la presente tesis.

Al Jaime Sahagún Castellanos por formar parte del comité asesor y revisor de esta tesis.

Al Dr. Juan Martínez Solís y su equipo de la Coordinación de Posgrado por brindarme el apoyo y guía durante mi estancia en la Maestría.

A mis padres: Rosario Cañada y Aurelio Bastida, por ser el pilar de mi vida, por su apoyo, comprensión y por toda la confianza que han depositado en mí.

A mis hijos, Dafne y Alexander, porque su existencia me llena de bendiciones y le da sentido a mi vida. A Juan Luis por su tiempo y apoyo.

A mis hermanos Violeta Ameyali y Olmo Axayacatl por ser mis compañeros de vida aún a kilómetros de distancia.

A Silvia Romero y Ariadna López, por su apoyo en el desarrollo de esta tesis, los días en el laboratorio fueron mejores con su compañía.

A mis amigos y familiares, porque cada experiencia vivida a su lado es aprendizaje y porque mi mundo es mejor gracias a ustedes: Cuau, Dinoh, Dani, Zuly, Alo, Mar, Yaz, Vale, Karen, Cheli, Tania, Nadya, Joel, Gama, Chris, Luz, David, Lizzy. A Ro, por cambiar mi percepción de la vida, por su amistad, apoyo y buena vibra.

A todas las personas que hicieron posible la culminación de esta tesis, gracias infinitas.

DATOS BIOGRÁFICOS

Itzel Velneci Bastida Cañada nació el 4 de Noviembre de 1989 en Iztapalapa, D.F. Realizó sus estudios de licenciatura (2007-2013) en la carrera de Horticultura Protegida de la Universidad Autónoma Chapingo; para obtener el título de Agrónomo en Horticultura Protegida con las tesis: “Aclimatización de plántulas *in vitro* de orquídeas *Paphiopedillum* en sustratos orgánicos”.

En enero de 2014 ingresó a la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola en la orientación de Ingeniería Genética de Plantas en el departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

REGENERACIÓN POR ORGANOGÉNESIS Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

REGENERATION BY ORGANOGENESIS AND GENETIC TRANSFORMATION OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.)

Itzel Velneci. Bastida-Cañada¹; Juan Enrique. Rodríguez-Pérez²

RESUMEN

El cultivo *in vitro* ha permitido el desarrollo de la ingeniería genética al asegurar la regeneración de plantas transformadas. El objetivo de la presente investigación fue diseñar un protocolo eficiente de regeneración por organogénesis que permita obtener plantas transformadas de cinco genotipos de tomate. Se probaron dos medios para regeneración (MR1 y MR2) y dos para enraizamiento (ME1 y ME2), basados en sales Murashige y Skoog al 100 %. El balance de reguladores fue para MR1: 0.9 mg·L⁻¹ BA + 0.02 mg·L⁻¹ ANA; para MR2: 2.5 mg·L⁻¹ BA + 1.0 mg·L⁻¹ AIA; para ME1: 0.02 mg·L⁻¹ ANA + 0.02 mg·L⁻¹ BA; y para ME2: 1.0 mg·L⁻¹ BA + 2.5 mg·L⁻¹ AIA. En la regeneración *in vitro* se observó desarrollo de brotes 14 días después de la siembra. El mejor medio, MR2, generó entre 6.2 y 4.0 brotes por explante. En el enraizamiento el ME2 mostro desarrollo de raíces en 100 % de brotes. Durante la etapa de aclimatación la sobrevivencia fue mayor de 97 % en todas las líneas. Se probó la efectividad de la cepa LBA4404 con el vector *p35GUSint* para la transformación; sin embargo, no se detectó expresión del gen reportero GUS.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, *Agrobacterium tumefaciens*, enraizamiento, aclimatación.

ABSTRACT

In vitro culture has allowed development of genetic engineering by assuring regeneration of transformed the plants. The objective of this rescarch was to design an efficient protocol for regeneration by organogenesis which allows obtaining transformed plants in five different tomato genotypes. Two different media for regeneration (MR1 and MR2) and two for rooting (ME1 and ME2), based on 100 % Murashige and Skoog salts, were tested. The regulator balance in MR1 was: 0.9 mg·L⁻¹ BA + 0.02 mg·L⁻¹ ANA; for MR2: 2.5 mg·L⁻¹ BA + 1.0 mg·L⁻¹ AIA; for ME1: 0.02 mg·L⁻¹ ANA + 0.02 mg·L⁻¹ BA; and for ME2: 1.0 mg·L⁻¹ BA + 2.5 mg·L⁻¹ AIA. During the *in vitro* regeneration, bud development was observed 14 days after sowing. The best medium, MR2, generated between 6.2 and 4.0 buds per explant. During rooting MR2 showed root development in 100 % of buds. In the acclimation period the survival percentage was over 97 % in all lines. The effectiveness of the strain LBA4404 was proved with the *p35GUSint* vector for transformation; however, no GUS reporter gene expression was detected.

Keywords: *in vitro* culture, *Agrobacterium tumefaciens*, rooting, acclimation.

¹ Tesista ² Director de tesis

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo General.....	2
1.2 Objetivos específicos	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Cultivo de tomate.....	3
2.2 Avances en ingeniería genética de tomate	4
2.3 Método de transformación por <i>Agrobacterium</i>	6
2.4 Genes marcadores y reporteros.....	9
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos vegetales.....	10
2.5.1. La fuente del explante	12
2.5.2 Composición del medio de cultivo	12
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> en tomate.....	14
2.7 Aclimatación	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Regeneración <i>in vitro</i> de tomate	17
3.1.1 Material vegetal	17
3.1.2 Formación de callo y brotes.....	18
3.1.3 Enraizamiento de brotes	18
3.1.4 Aclimatación.....	19
3.1.5 Análisis estadístico.....	20
3.2.1 Material vegetal	20
3.2.2 Cepas y construcciones	21
3.2.5. Selección de las células transgénicas	23
3.2.4. Tinción del gen de la β -glucoronidasa.	23
3.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25

4.1 Prueba de Medios de Cultivo para regeneración de brotes	25
4.1.1. Interacción genotipo por medio.....	30
4.2. Enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de tomate.....	34
4.3. Aclimatación de plantas obtenidas <i>in vitro</i>	35
4.4. Sensibilidad de tomate a Kanamicina.....	38
4.5. Obtención de plantas transgénicas	38
V. CONCLUSIONES.....	40
VI. ANEXO.....	41
VII. BIBLIOGRAFIA.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de participación de los estados en la producción de tomate en México	14
Figura 2. Escala para evaluar la formación de raíz. (a) Formación de raíces nivel 1. (b) Formación de raíces nivel 2.....	31
Figura 3. Proceso de transformación de explantes de tomate. a) Suspensión en <i>A. tumefaciens</i> y secado de explantes. b) Explantes de lámina foliar en medio de cultivo con acetocyringona. C) Transferencia de explantes a medio de selección.	34
Figura 4. Brotes observados durante la eliminación de clorofila, previo a la aplicación de X-gluc.....	36
Figura 5. Formación y desarrollo de callo en explantes provenientes de lámina foliar después de 14 días de cultivo	37
Figura 6. Longitud de brotes de dos medios de cultivo de regeneración de explantes de hoja de jitomate en 14 (a) y 27 (b) días después de la siembra. ..	28
Figura 7. Efecto del genotipo en la formación de brotes (a) número de brotes en 14 días de cultivo y (b) número de brotes en 27 días de cultivo	28
Figura 8. Efecto del genotipo en la longitud de brotes (a) longitud de brotes en 14 días de cultivo y (b) longitud de brotes en 27 días de cultivo	30
Figura 9. Interacción genotipo por medio para (a) Número de brotes a 14 días de cultivo y (b) Número de brotes a 27 de cultivo.	31
Figura 10. Interacción genotipo/medio para variable largo de brotes a 27 de cultivo.....	32

Figura 11. Establecimiento <i>in vitro</i> . a) Explantes establecidos en medio de cultivo día 0; b) Explantes establecidos en medio de cultivo día 27	34
Figura 12. Plantas obtenidas después de 30 días en el medio de enraizamiento dos (ME2).	35
Figura 13. Regeneración <i>in vitro</i> de jitomate. a) Formación de callo, 10 días de cultivo (ddc); b) Diferenciación de brote 14 ddc; c) Desarrollo de brotes 20 ddc; d) Brotes vía organogénesis, 40 ddc, con adecuado desarrollo para trasplante a ME; e) Planta para establecimiento <i>ex vitro</i> después de 20 días en ME	35
Figura 14. Desarrollo de plantas de jitomate aclimatadas. (a) Día 0, establecimiento de plantas <i>in vitro</i> a condiciones <i>ex vitro</i> . (b) Día 30, plantas aclimatada	36
Figura 15. Desarrollo de plantas de tomate aclimatadas. (a) Día 0, establecimiento de plantas <i>in vitro</i> a condiciones <i>ex vitro</i> . (b) Día 30, plantas aclimatadas.....	38
Figura 16. Producción de líneas de tomate obtenidas a partir de explantes de hoja por medio de cultivo <i>in vitro</i>	38

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Líneas de jitomate empleadas para la evaluación del cultivo <i>in vitro</i>	17
Cuadro 2. Comparaciones de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) para genotipos.....	38

I. INTRODUCCIÓN

El tomate es uno de los cultivos hortícolas con mayor superficie cultivada y producción a nivel mundial; en México, en el año 2014, se sembraron 52,374 hectáreas y se cosecharon 50,962 hectáreas, el valor de producción fue 15, 735.5 millones de pesos (SIAP, 2014).

El cultivo de células y tejidos como herramienta biotecnológica permite el desarrollo de la ingeniería genética al ser necesario contar con un protocolo eficiente de cultivo *in vitro* que asegure la regeneración de las plantas transformadas que integran en su genoma las características genéticas de interés (Mora, 2012).

El éxito del cultivo *in vitro* depende de la fuente del tejido (tipo de explante, posición en la planta, genotipo, edad, estado nutricional) y las condiciones del ambiente en el que se establece el cultivo (composición del medio, temperatura, humedad relativa y luminosidad) (Bhatia, 2004).

La transformación de tomate mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, se ha llevado a cabo con éxito; sin embargo, los protocolos no se aplican de la misma manera en todas las variedades debido a las diferencias existentes en la formulación de los medios de cultivo y la genética de la planta. Por lo anterior, la presente investigación tuvo la finalidad de establecer el protocolo de regeneración y de transformación genética específico para cinco líneas experimentales de tomate (L3, L47, L79, SS5, H13-37).

1.1 Objetivo General

Establecer un protocolo eficiente de regeneración por organogénesis en cultivo *in vitro*, que permita obtener plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) transformadas por agroinfección.

1.2 Objetivos específicos

Establecer un sistema eficiente de regeneración *in vitro* de cinco líneas experimentales de *Solanum lycopersicum* L

Desarrollar un protocolo de transformación genética estable, para tomate mediante *Agrobacterium tumefaciens* como sistema para la transferencia de genes.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cultivo de tomate

México es el décimo productor de tomate a nivel mundial, con una producción anual de 3 millones de toneladas; El cultivo es el segundo producto agroalimentario más exportado del país con una derrama económica de 1,818 millones de dólares (SIAP, 2015). La producción se realiza en la mayoría de los estados, entre los que destacan como principales productores: Sinaloa, Baja California, Michoacán, Jalisco, San Luis Potosí, Baja California Sur, Querétaro y el Estado de México (Figura 1) (SAGARPA, 2010). Alrededor del 86 % de las unidades de producción son inferiores a 0.5 ha, el 11.5 % de 0.51 a 5 ha, y el 2.5 % tiene más de 5 ha. (SIAP, 2015).

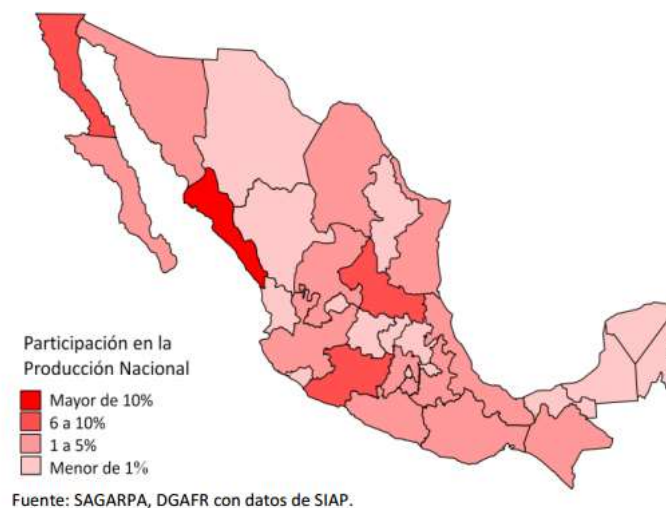


Figura 1. Porcentaje de participación de los estados en la producción de tomate en México

En la República Mexicana, se produce tomate durante todo el año, la máxima de producción se presenta en los primeros meses, principalmente en el estado de Sinaloa, el cual abastece al mercado nacional y a la mitad del mercado norteamericano. Durante el verano, son los estados del centro y Baja California

los que abastecen la demanda interna y de exportación. El tomate con tipo de fruto saladatte representa el 56 % de la producción a nivel nacional, en segundo lugar se encuentra el tipo bola, cuyo volumen de producción alcanza el 14 % del total (SIAP, 2015).

De 20,000 hectáreas de agricultura protegida en el país (12,000 ha. de invernaderos, y 8,000 ha. malla sombra y macro túnel, entre otras estructuras), en el 70 % de la superficie se cultiva tomate (SIAP, 2015).

Los principales problemas que limitan la producción y productividad del tomate en nuestro país, son: topografía accidentada en la mayor parte del territorio, condiciones adversas como bajas o altas temperaturas, granizo, lluvias excesivas, mala calidad e insuficiente cantidad de agua de riego, así como la incidencia de plagas y enfermedades (FAO, 2012).

2.2 Avances en ingeniería genética de tomate

Los avances en la Biotecnología Vegetal han facilitado el proceso de transferencia e integración de genes específicos en el genoma vegetal, la principal ventaja es el desarrollo de metodologías que permiten modificar o transferir el gen de una especie a otra. Tales avances dependen del desarrollo de nuevas tecnologías en ingeniería genética que permiten aislar, identificar y clonar genes, con el apoyo de técnicas moleculares y cultivo de tejidos (Hodson, 2005). Una característica en común que presentan las diferentes estrategias para introducir genes foráneos a plantas es lograr que el ADN transformante ingrese a la célula vegetal a través de la pared celular y la membrana plasmática y llegue al núcleo para integrarse de manera exitosa en algún cromosoma (Martínez *et al.*, 2004).

Los métodos de transferencia de genes pueden ser de dos clases: 1) Sistemas de transformación indirecta y 2) Sistemas de transformación directa.

La transferencia indirecta mediante la bacteria *Agrobacterium* es la más empleada al aprovechar la habilidad natural de la bacteria para actuar como un ingeniero genético. El bombardeo de micro proyectiles con ADN o biobalística es el segundo método más empleado. Otros métodos de transferencia directa que se han desarrollado son la electroporación, abrasión con fibrillas, tratamientos con polietilenglicol (PEG), empleo de láser y microinyección (Hodson 2005; Sharma *et al.*, 2005).

Para la obtención de plantas transgénicas los principales elementos a considerar son: a) Tener un sistema eficiente de regeneración, b) Una construcción genética, c) Un sistema de transformación eficiente, d) Recobrar y multiplicar plantas transgénicas, e) Tener una expresión eficiente y estable del gen adquirido, f) Lograr la transferencia de estos genes a variedades elite por métodos convencionales y g) Evaluar el comportamiento de estas plantas en condiciones de campo para demostrar su inocuidad (Sharma *et al.*, 2005).

Entre las características que se han introducido a tomate mediante transformación genética se pueden mencionar: resistencia a kanamicina (McCormick *et al.*, 1986), tolerancia al herbicida glifosato (Fillatti *et al.*, 1987), tolerancia al herbicida Basta (De Block *et al.*, 1987), resistencia al virus del mosaico del tabaco (Nelson *et al.*, 1988), resistencia al virus del mosaico de alfalfa (Turner *et al.*, 1987), resistencia al virus silvestre del manchado de tomate (Gielen *et al.*, 1996), resistencia a insectos (Salm *et al.*, 1994), inhibición de la resistencia de los inhibidores de proteinasa I y II hacia *Manduca sexta* (Orozco-Cárdenas, 1993), retardar la maduración del fruto (Hamilton *et al.*, 1990), resistencia a hongos (Yoder *et al.*, 1988), resistencia a condiciones de estrés hídrico y salino (Gaxiola *et al.*, 2001).

2.3 Método de transformación por *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria patógena que infecta a plantas dicotiledóneas, coníferas y en menor grado monocotiledóneas (Cubero y López, 2004; Torney *et al.*, 2007); de forma natural causa la inducción de tumores en la parte baja del tallo en contacto con el suelo (cuello), enfermedad conocida como agalla de la corona (Hooykaas y Schilperoort, 1992). *A. tumefaciens* tiene un plásmido de más de 200 Kpb llamado Ti (inductor de tumor), que incluye un segmento de 23 kpb denominado ADN-T, el cual se transfiere y se integra de manera estable en el genoma vegetal (Hodson, 2005).

La región ADN-T está flanqueado por dos bordes repetidos de 25 pares de bases, lo que permite transferir la secuencia de ADN localizada entre estos bordes (Hooykaas y Schilperoort, 1992). Además contiene tres tipos de genes: los oncogenicos codifican para enzimas involucradas en la síntesis de auxinas (AIA) y citocininas (2-isopentil-AMP) y son responsables de la formación del tumor, los genes que codifican para la síntesis de opinas, son excretados por las células del tumor como fuente de carbono y nitrógeno para *Agrobacterium* y los genes *vir* que participan en el proceso de transferencia de ADN-T. La región *vir* incluye un total de ocho operones (*virA*, *virB*, *VirC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*) los cuales codifican proteínas que involucran el procesamiento y transporte del ADN-T a las células tanto vegetales como animales (Gelvin, 2000).

El proceso de transferencia inicia cuando VirA (proteína sensora) detecta la molécula señal (compuestos fenólicos como acetosiringona), que es liberada por las células vegetales con daños superficiales (heridas). Las condiciones de pH ácido y la presencia de glucosa o galactosa permiten la activación de la proteína VirA al amplificar la respuesta del sistema para responder a bajos niveles de compuestos fenólicos.

Una vez activada, la proteína VirA transfiere su fosfato a la proteína VirG, la cual funciona como un factor transcripcional que regula la expresión de los genes *vir*. Entonces las proteínas VirD1 y VirD2 (endonucleasas) reconocen las secuencias

borde y cortan, marcando el sitio de inicio y terminación de la cadena de ADN-T. La proteína VirD2 se une covalentemente al extremo terminal 5' y forma un complejo proteína-ADN-T, esta asociación evita el ataque de exonucleasas a la vez que distingue el extremo líder de la cadena; la molécula inicia la importación del complejo ADN-T a la célula huésped, ya que dicha proteína posee una región señal de localización nuclear (NLS) que la capacita para entrar al núcleo (Citovsky *et al.*, 2007). La proteína VirC1 funciona como amplificador, ya que una delección del operón *virC* atenúa la virulencia de la cepa de *Agrobacterium*. La proteína VirD1 es esencial para el desdoblamiento de la cadena sustrato para VirD2. La proteína transmembranal VirD4 se localiza predominantemente en el sitio citoplásmico de la membrana y su unión al complejo es dependiente de ATP, lo que favorece la translocación, es necesaria para transportar la cadena ADN-T (De la Riva *et al.*, 1998)

El complejo VirB integrado por 12 proteínas es un sistema de secreción tipo IV (T4SS) encargadas de ensamblar el canal de conjugación transcelular (T pilus) que involucra ambas membranas y que incluye desde la proteína VirB1 a la proteína VirB11, además de VirD4, VirE2, VirE3 y VirF, las cuales son fundamentales para la transferencia del VirD2-T-ADN (McCullen y Binns, 2006). El operón *virH* codifica para las proteínas VirH1 y VirH2 cuya participación no es esencial pero pueden incrementar la eficiencia de la transferencia (De la Riva *et al.*, 1998; Citovsky *et al.*, 2007).

Una vez que el complejo ADN-T está dentro del núcleo interaccionan proteínas kinasas que activan kinasas dependientes de ciclinas (CAK2M) y proteínas unidas a la caja TATA con la proteína VirD2 y la proteína VIP1 la cual se une a VirE2 y un grupo de histonas que se une a VIP1 que al parecer funcionan como cromatina blanco para el complejo ADN-T. La proteína CAK2M se une a la RNA-polimerasa II para dirigir y controlar la transcripción de la cadena de ADN complementaria. En tanto es necesaria la exposición de la cadena ADN-T que se logra con la participación de la maquinaria de proteólisis de la célula huésped llamada SCF (ubiquitina ligasas) que identifican a VIP1 para desestabilizarla y

consecuentemente a VirE2 que es la proteína más abundante del complejo ADN-T, que puede representar el mecanismo para exponer la cadena T y permitir que la maquinaria de reparación de ADN de la célula huésped forme la cadena complementaria y la integre al genoma (McCullen y Binns, 2006; Citovsky *et al.*, 2007). VirE2, lo que previene el ataque de nucleasas y reduce el diámetro del complejo facilitando el paso por los canales de la membrana en la célula vegetal. La proteína VirE2 contiene dos señales de localización al núcleo de la planta y VirD2 una, lo que indica que dichas proteínas juegan un papel importante en la conducción de la cadena de ADN-T al núcleo de la célula vegetal (De la Riva *et al.* 1998).

La integración del ADN-T al genoma de la planta es la culminación del proceso de transformación, se sugiere que ocurre vía recombinación ilegítima; es decir, que solo pocas bases presentan homología (micro homologías), este apareamiento en unas cuantas bases es suficiente para el pre alineamiento entre el complejo ADN-T y el ADN vegetal, este contacto forma la unión 3'-5' y subsecuentemente la cadena de ADN de la planta es cortada en la posición 3' y sustituida, e inmediatamente el extremo 5' es atado por VirD2 y el otro extremo del complejo (3') se une el corte de la cadena fundamental de ADN de la planta. Una vez que la introducción de la cadena ADN-T al ADN de la planta ha terminado se activan los mecanismos de reparación de la célula vegetal y la cadena complementaria es sintetizada usando como molde la cadena ADN-T insertada (Chilton y Que, 2003).

Al eliminar el ADN-T del plásmido Ti los genes asociados con la patogénesis son reemplazados mediante técnicas moleculares con genes de características deseadas (Hodson, 2005).

La eficiencia de la transformación se mide por el número de plantas obtenidas después de la infección con *A. tumefaciens*. La transformación genética depende de las células vegetales, que difieren en su capacidad para responder a señales externas, fenómeno denominado "competencia". Las células con potencial para producir plantas transgénicas han de ser competentes no sólo para la

regeneración, sino para la transformación integrativa; en los tejidos vegetales organizados, sólo una mínima parte de las células son competentes para estos procesos, mientras que el resto, si bien es capaz de responder adecuadamente al tratamiento, inicialmente sólo presentan competencia en uno de los procesos (Birch, 1997).

2.4 Genes marcadores y reporteros

La eficacia de cualquier tejido y el método de inserción del gen son dependientes del marcador de selección y de los promotores para la regeneración de las células transformadas (Vain *et al.*, 1993).

Usualmente un sistema de selección comprende dos componentes: (1) el agente químico como es el caso del herbicida o antibiótico y (2) el gen incorporado en el cassette que confiere la ventaja de la selección bajo condiciones particulares del medio de cultivo (Jones y Sparks, 2009).

Los genes marcadores de selección sirven para distinguir las células transformadas de las no transformadas y son introducidas al genoma vegetal en el proceso de transformación, éstos son integrados junto con el gen de interés, por lo que es posible monitorear su expresión; el propósito es ofrecer una ventaja selectiva a las células transformadas mediante la expresión de una nueva característica que en condiciones normales no tendría. Tales genes marcadores confieren resistencia a antibióticos, herbicidas, altas concentraciones de azúcares, etc.; generalmente expresan una proteína con actividad enzimática (Brasileiro y Aragao, 2001).

Uno de los genes marcadores más comúnmente usados es el gen *ntp II*, que confiere resistencia a los antibióticos aminoglicosidos como la kanamicina A, B Y C, neomicina, paramomicina y geneticina. Codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II (NPT II), ésta fosforila al antibiótico y lo inactiva.

Otro de los genes marcadores es el gen *hpt* que confiere resistencia a higromicina, codifica para la enzima higromicina fosfotransferasa (HPT), la cual cataliza la fosforilación del antibiótico y lo inactiva (Brasileiro y Aragao, 2001).

Dentro de los genes que proporcionan resistencia a herbicidas están, *aroA*, que confiere resistencia al glifosato, el gen *bar* que confiere resistencia a la L-fosfonitricina (Brasileiro y Aragao, 2001).

Los genes reporteros son los que permiten de manera visual identificar células, tejidos o plantas completas transformadas (Brasileiro y Aragao, 2001). El gen *GUS* y GFP han sido ampliamente utilizados para evaluar la expresión transitoria en tomate y así evaluar algunos parámetros de transformación (Bohorova *et al.*, 1999).

El gen reportero *gusA* (gen *uidA*) aislado de *Escherichia coli* es ampliamente usado en la transformación de plantas y codifica para la enzima β -glucoronidasa, en este sistema la enzima cataliza el rompimiento de una amplia variedad de glucorónidos. En presencia del sustrato X-gluc (5-bromo-4 cloro-3 indolis glucuronide) produce un precipitado azul, lo que permite la localización espacial del gen (Brasileiro y Aragao, 2001).

El gen *gfp* codifica para la proteína verde fluorescente (GPF); es una molécula reportera usada para monitorear la expresión del gen vivo y en tiempo real. La proteína GFP emite luz verde (-509 nm) cuando se excita con luz UV (-395 nm) (Kitts *et al.*, 1995).

El gen *luc* es un sistema marcador basado en la bioluminiscencia; las enzimas responsables de la producción de luz se llaman luciferasas, que emiten luz a una longitud de onda de 547 hasta 593 nm (Vázquez *et al.*, 1995).

2.5 Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* refiere a la obtención y propagación artificial de plantas en forma asexual mediante técnicas controladas en laboratorio. En su acepción amplia, el

cultivo de tejidos es un grupo de técnicas mediante las cuales un explante, que puede ser un fragmento de tejido u órgano de cualquier parte de la planta ya sea tallo, hoja, raíz, yemas, primordios florales, anteras u otros se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (George *et al.*, 2008; Pérez, 2009; y Mora, 2012). El cultivo *in vitro* es utilizado para micropropagar, producir y mantener plantas libres de patógenos y es considerada como una técnica de clonación (Estopà, 2005; George *et al.*, 2008 y Pérez, 2009).

Este tipo de propagación es posible debido a la *totipotencia* de las células vegetales, es decir, su capacidad para desdiferenciarse y bajo condiciones controladas *in vitro*, regenerar una planta completa a partir de una célula aislada o un tejido vegetal. La formación de nuevos meristemos involucra dos fases distintas de crecimiento: la primera inicia con la aceleración de la división celular, lo que produce una masa de células indiferenciadas y en la segunda ocurre la desdiferenciación de dichas células a órganos especializados (Casarrubias y Delgado, 1998).

En el cultivo *in vitro* hay dos rutas generales por las que puede desarrollarse exitosamente un tejido u órgano cultivado: organogénesis y embriogénesis somática. La organogénesis es la capacidad de formar nuevos órganos vegetales a partir de explantes como raíces y brotes adventicios, y puede ser de dos tipos; la organogénesis directa consiste en la formación de los órganos en el lugar del explante original y la organogénesis indirecta se origina primero el tejido calloso a partir del cual se comienzan a originar los órganos (Pérez, 2009 y Olmos *et al.*, 2010).

La respuesta de embriogénesis y organogénesis dependen del origen del explante (tipo de tejido, posición en la planta, especie, edad, etc.) y de las condiciones del cultivo (composición del medio y factores físicos) (Ochoa, 1990).

2.5.1. La fuente del explante

La elección de un explante apropiado es el primer problema a resolver para el establecimiento del cultivo; si el objetivo final es organogénesis se utilizan tejidos vegetales jóvenes como: cambium vascular, órganos de reserva, endospermo, cotiledones, mesófilo de hojas, semillas, tallos, hojas y tejidos provasculares, estas estructuras se caracterizan por tener altas concentraciones de reguladores de crecimiento endógenos; además, los tejidos deben provenir de plantas sanas y libres de patógenos (Torres, 1989). El estado de desarrollo y edad ontogénica de los explantes es una fuente de variabilidad en la respuesta del cultivo *in vitro*: la condición de juvenildad es indispensable debido a que las células de menor edad presentan mayor capacidad para formar callos, brotes y raíces (Smith, 2000).

Es importante considerar la variabilidad asociada con el genotipo; es muy frecuente que en condiciones idénticas del medio ambiente, las respuestas *in vitro* del cultivo de un determinado explante difieran entre variedades. El tamaño del explante debe tenerse en cuenta para el establecimiento del cultivo *in vitro*; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello puede favorecer la contaminación con microorganismos. Existe un tamaño mínimo debajo del cual no es posible obtener proliferación callosa u otras respuestas deseables (Smith, 2000).

Por otra parte se debe tener en cuenta la incidencia de otros factores que a menudo alteran las respuestas de los explantes cultivados; entre ellos se pueden mencionar: época del año en que se realizan los cultivos, los pretratamientos y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos (campo, invernadero, laboratorio).

2.5.2 Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo se integra de compuestos orgánicos e inorgánicos, que permiten el desarrollo del explante en múltiples respuestas *in vitro*, actualmente

se utilizan distintas sales inorgánicas para formular los medios, entre las que destacan: B5 (Gamborg, Miller y Ojima, 1968), y MS (Murashige and Skoog, 1962); los compuestos químicos que se suministran son carbohidratos (glucosa, sacarosa), minerales (nitrógeno, fósforo, potasio, etc.), sustancias reguladoras de crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico) y vitaminas (tiamina, inositol, L-cisteína). Como materiales inertes de soporte, en el caso de medios semisólidos, se emplea agar.

Las auxinas se sintetizan característicamente en el ápice del tallo (en el meristemo terminal o cerca de él) y en tejidos jóvenes, forman un gradiente desde el ápice del tallo hasta la raíz. Desempeñan una función importante en la expansión de las células de tallos y coleóptilos, estimulan la división celular y fomentan el desarrollo de callos de los que se desprenden crecimientos similares a raíces, por lo cual son muy efectivas en iniciar la formación de raíces de varias especies vegetales (Weaver, 1980). La célula o estructura puede exhibir respuestas opuestas de acuerdo a la concentración de AIA, por lo cual los tejidos responden a concentraciones distintas de auxinas: las raíces son estimuladas con concentraciones inferiores a las que estimulan los tallos (Bidwell, 1983).

La función principal de la auxinas en el cultivo *in vitro* de células y tejidos, es la estimulación celular y el desarrollo de callos. Las citocininas inducen la división celular y regulan la diferenciación de los tejidos cultivados. Dependiendo el balance entre auxinas y citocininas se obtienen expresiones diferentes del desarrollo y crecimiento. En 1957 Skoog y Miller reportaron que el balance auxina-citocinina era muy importante para el crecimiento de las células en el cultivo: con niveles relativamente altos de auxinas y niveles relativamente bajos de citocininas, ocurría el crecimiento indiferenciado de callo. Por el contrario, niveles relativamente altos de citocininas respecto a auxinas inducían la aparición de ramas diferenciadas (Pierik, 1990; Castillo, 2001 y Mora, 2012).

Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación (Hughes, 1981) así como por la calidad, intensidad y duración de la

luz (Seibert *et al.*, 1980), por ello los cultivos deben ser incubados en ambientes controlados.

En el establecimiento de los cultivos, se utiliza una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes (del tipo “luz de día”) y lámparas incandescentes que brindan entre 1000 y 4000 lux de iluminación, con fotoperiodo/escotoperiodo de 16/8 h y temperaturas que oscilan entre 25-28 °C (Mroginski, 1989).

2.6 Cultivo *in vitro* en tomate

El cultivo *in vitro* se utiliza en tomate en diferentes aplicaciones biotecnológicas: propagación clonal (Chen *et al.*, 2006), producción de plantas libres de virus (Moghaieb *et al.*, 1999), transformación genética (Park *et al.*, 2003) y en programas de investigación fundamental (Gubis *et al.*, 2004).

El potencial de regeneración de plantas de tomate ha sido reportado por varios autores (Gubis *et al.*, 2003; Sharma y Srivastava, 2005; Devi *et al.*, 2008; Harish *et al.*, 2010;) donde utilizaron diferentes concentraciones de citoquininas y auxinas en combinación o solos, diferentes tipos de explante o cultivar para la regeneración de brotes.

Las principales auxinas empleadas en cultivo *in vitro* de tomate son: ácido indol-3acético (AIA), ácido-3-butírico (AIB), ácido naftanelacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); entre las citocininas más empleadas se encuentran: 6-Furfurilaminopurina (Kin), Zeatina (Zea) y benciladenina (BA), también conocida como 6-benziladenina y 6-benzilaminopurina (Mamidala y Nanna 2011; Zhang *et al.*, 2012; Namitha y Negi 2013).

En el mantenimiento y la multiplicación de los callos es importante la presencia de varios aminoácidos en el medio de cultivo, los más utilizados son glicina, arginina, glutamina, asparagina o una mezcla de varios de ellos como caseína hidrolizada, extracto de malta, agua de coco o suplementos orgánicos (Smith, 2000).

Para inducir el desarrollo de brotes en tomate se han empleado diferentes tipos de explantes: lamina foliar, cotiledones, hipocotílos secciones de tallo, pedicelos, peciolos e inflorescencias (Khouidi *et al.*, 2009; Namitha y Negi 2013).

El tamaño del explante es un factor importante en la regeneración de brotes, por lo cual para cotiledones y hojas se reporta el uso de segmentos de 5.0 mm a 9.5 mm (Ishag *et al.*, 2009; Chaudry *et al.*, 2010;). Se ha demostrado que el tipo de explante determina la frecuencia de organogénesis y el número de brotes por explante (Bahurpe *et al.*, 2013).

Mediante modificaciones en el medio de cultivo se ha logrado inducir regeneración de brotes de tomate en diferentes variedades, el tipo de medio basal utilizado MS o B5 afecta la velocidad del proceso de regeneración (Ashakiran *et al.*, 2011).

2.7 Aclimatación

El objetivo de la fase de aclimatación es lograr que plantas provenientes de un microambiente sin estrés y condiciones cuasi óptimas para el desarrollo, se adapten a condiciones *ex vitro*, donde factores como luz, temperatura y humedad no están controlados y las condiciones del ambiente no son asépticas.

La aclimatación es una fase crítica debido a varios factores entre los que destacan la falta de funcionalidad de los estomas; estudios con microscopía de scanner electrónico han indicado que la estructura estomática presente en especies de plantas cultivadas *in vitro* difieren marcadamente de las establecidas en invernadero o suelo, las primeras presentan estomas de mayor tamaño y más redondos lo que favorece la pérdida de agua, a diferencia de las cultivadas en condiciones *ex vitro* que presentan estomas pequeños y elípticos.

Otros factores que influyen en la deshidratación de plántulas *in vitro* son: cutícula delgada de hojas debido a la exposición de altos niveles de luminosidad, menor

proporción de clorofila y la composición de la cera epicuticular tiene una proporción más alta de esteres y de componentes polares, pero presenta cadenas de hidrocarburos mucho más cortas que las plantas desarrolladas en condiciones *ex vitro* (Debergh y Zimmeran, 1991; Pierik 1990).

Las plantas sufren un cambio radical cuando son removidas de cultivo *in vitro*, ya que son forzadas a cambiar de heterotróficas a autotróficas. Las hojas de las plantas *in vitro* no están formadas para hacer fotosíntesis es decir, para la fijación de carbono, ya que en la cámara de incubación no se produce un fuerte intercambio gaseoso, debido a que la sacarosa es entregada a través del medio de cultivo. En otras ocasiones, el problema estriba en que las raíces que crecen en agar son defectuosas, carecen de pelos radicales y suelen necrosarse durante el trasplante, lo que provoca que el crecimiento de la planta se detenga momentáneamente (Deberg y Zimmeran, 1981).

Debido a la anatomía y la condición fisiológica de las plantas desarrolladas *in vitro*, donde se ha mantenido una alta humedad relativa, es necesario regar al momento del traslado y mantener una humedad constante para obtener una alta sobrevivencia; se recomienda mantener las plantas con 50 % de sombra para reducir la transpiración y evitar excesivas pérdidas de agua, además de que el exceso de luz destruye las moléculas de clorofila. Posteriormente las macetas deben ser ubicadas de manera gradual hacia el nivel de luz al cual serán llevadas para su desarrollo final (Debergh y Zimmerman, 1991).

Todas estas deficiencias o disfunciones provocadas por o durante la incubación *in vitro* es necesario corregirlas de forma gradual, e incluso como ya hemos citado comenzar la adaptación en condiciones *in vitro*, incluso induciendo fotoautotrofía *in vitro* mediante incrementos de la tasa de CO₂ y de irradiancia en los contenedores de cultivo, al objeto de mejorar la calidad de la planta, los niveles de producción y los costos del proceso de micropropagación. (Debergh y Zimmerman, 1991).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Regeneración *in vitro* de tomate

3.1.1 Material vegetal

Se emplearon cinco variedades experimentales proporcionadas por el proyecto de Mejoramiento Genético de Tomate de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) (Cuadro 1). Las semillas fueron germinadas en invernadero, se empleó como sustrato una mezcla de turba con vermiculita (1:1) el cual fue esterilizado (120 °C, 1.5 lb² de presión, durante 20'). El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Células y Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia de la UACH; durante el periodo comprendido de junio 2014 a diciembre 2015.

Cuadro 1. Líneas de tomate empleadas para la evaluación del cultivo *in vitro*.

Línea	Tipo de fruto	Tipo de crecimiento
L47	Saladatte	Indeterminado
H13-37	Cereza	Indeterminado
L3	Saladatte	Indeterminado
L79	Bola	Indeterminado
SS5	Riñón (Silvestre)	Indeterminado

Se utilizó como explante tejido proveniente de lámina foliar de plantas con cuatro semanas de edad. Las hojas se lavaron con la mezcla de jabón comercial, tween 20 y agua estéril. Posteriormente se sumergieron en alcohol al 70 % durante 1 min. y se transfirieron a hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 min.; dentro de una campana de flujo laminar se enjuagaron tres veces con agua estéril, finalmente se sumergieron en solución de 150 mg·L⁻¹ de ácido cítrico y 100 mg·L⁻¹

¹ de ácido ascórbico donde permanecieron hasta su disección y establecimiento en el medio de cultivo.

3.1.2 Formación de callo y brotes

Se emplearon dos medios de cultivo para la obtención de brotes *in vitro*, con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100 % suplementado con vitaminas Gamborg $2.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Gamborg *et al.*, 1968), $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ácido cítrico, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ácido ascórbico, 3 % de sacarosa. El medio uno (MR1) fue adicionado con $0.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA + $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA. El medio dos (MR2) se formuló con $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA + $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIA. En ambos medios el pH se ajustó a 5.7 ± 1 y se agregó $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar.

Los explantes se obtuvieron de la primera y segunda hoja verdadera, se cortaron con bisturí estéril en segmentos de 1 cm^2 de la parte más cercana al pedúnculo incluyendo nervadura central y se colocaron con el envés de la hoja en contacto con el medio (polaridad normal). Los frascos permanecieron en el área de incubación por 4 semanas, con un fotoperiodo de 24 horas luz, $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, e intensidad lumínica de 1000 luxes.

Los tratamientos ensayados correspondieron a un factorial completo al considerar dos medios de cultivo y cinco genotipos. La unidad experimental fue un explante; se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 20 repeticiones. Se realizaron evaluaciones en 14, 21 y 27 días de cultivo donde se registró el porcentaje de formación de callos (PC), número de brotes formados por explante (NB14, NB21 y NB27), longitud de brotes (LB14, LB21 y LB27) y porcentaje de explantes que formaron al menos un brote (PB).

3.1.3 Enraizamiento de brotes

Los brotes obtenidos en la etapa anterior de las líneas L3, L47, L79 y SS5 mayores a 3 cm de altura, fueron separados del tejido calloso y trasplantados a

dos medios para enraizamiento de brotes (ME1 y ME2) que consistieron de sales MS al 100 % suplementado con vitaminas Gamborg $2.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ácido cítrico, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ácido ascórbico, 3 % de sacarosa y $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar. El balance de reguladores en el ME1 fue: $0.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA + $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA y en el medio ME2 fue de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA + $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIA.

Se estableció un diseño completamente al azar con 10 repeticiones, la unidad experimental fue un brote. Se evaluó el número de brotes que formaron raíces (FR) con la escala: 0 (ausencia de raíces), 1 (Menos de diez raíces) y 2 (Diez raíces o más) (Figura 2). Se realizaron observaciones cada 5 días, desde la fecha en que se establecieron los brotes hasta 20 días después del trasplante.

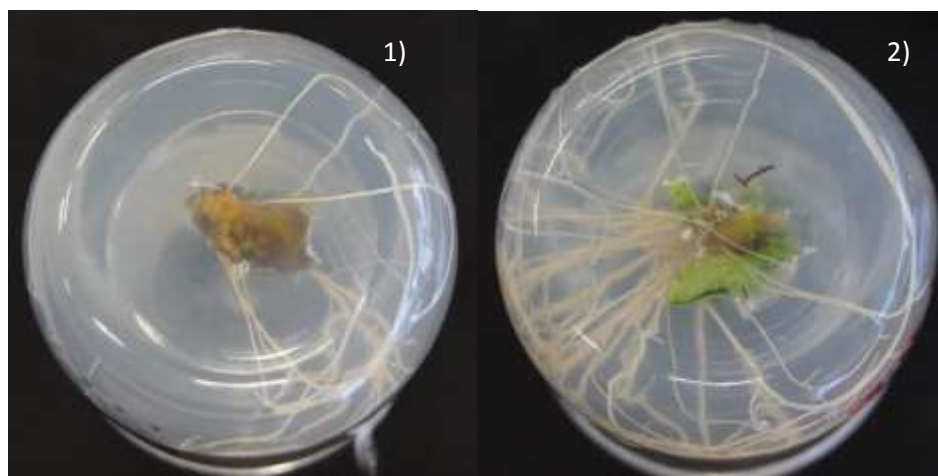


Figura 2. Escala para evaluar la formación de raíz. (1) Menos de 10 raíces; (2) Diez raíces o más.

3.1.4 Aclimatación

Se evaluó la respuesta de las líneas que presentaron desarrollo de raíces en la fase de enraizamiento: SS5, L3, L47 y L79.

Se utilizó turba negra como sustrato, previamente esterilizado (120 °C, 1.5 lb² de presión, durante 20'). El trasplante consistió en retirar las plantas de los frascos de cultivo, sumergirlas en agua con solución fungicida (Captan 1 g·L⁻¹) y colocarlas en los contenedores con sustrato; se utilizaron bolsas de poliestireno transparente para cubrir las plantas, las cuales permanecieron en condiciones de laboratorio con luz solar indirecta durante la primera semana; a partir de la segunda semana se trasladaron a condiciones de invernadero y se retiró la bolsa durante dos horas diarias; cinco horas la tercera semana y finalmente, la bolsa fue retirada completamente en la cuarta semana posterior al trasplante.

Los riegos se realizaron cada tres días con solución nutritiva Steiner al 50 %. Las condiciones ambientales dentro del invernadero fueron 25 °C ± 5 °C, 80 % ± 5 % de HR y luz diurna del 50 %.

La unidad experimental fue una planta. En los días 0, 30 y 60 después del trasplante (ddt), se evaluó el porcentaje de sobrevivencia (PS), número de hojas (H0, H30, H60) y altura de planta (AP0, AP30, AP60).

3.1.5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos consistieron de análisis de varianza, comparaciones de medias y en la prueba de Kruskal y Wallis (Infante y Zarate, 1986), de acuerdo con las etapas descritas.

3. 2 Ensayos de transformación genética por agroinfección

3.2.1 Material vegetal

Para la transformación genética se utilizaron las líneas L3 y L47, las cuales en la etapa de regeneración *in vitro* formaron el mayor promedio del número de brotes

por explante. El procedimiento de siembra fue el mismo que se empleó en el protocolo de regeneración de explantes en cultivo *in vitro*.

Las semillas fueron germinadas en invernadero, se empleó como sustrato una mezcla de turba con vermiculita (1:1) esterilizado (120°C, 1.5 lb² de presión, durante 20'). Hojas de plantas de cuatro semanas de edad se lavaron con la mezcla de jabón comercial, tween 20 y agua estéril. Posteriormente se sumergieron en alcohol al 70 % durante 1 minuto y se transfirieron a hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 minutos; finalmente, dentro de una campana de flujo laminar, se enjuago tres veces con agua estéril. Las hojas se sumergieron en solución de 150 mg·L⁻¹ de ácido cítrico y 100 mg·L⁻¹ de ácido ascórbico como método para evitar la oxidación de los tejidos.

3.2.2 Cepas y construcciones

En los experimentos de transformación genética se utilizó la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (p35GUSint) (Vancanneyt *et al.*, 1990), como gen de selección incluye el gen *nptII* (neomicina fosfotransferasa), que confiere resistencia frente a antibióticos aminoglucósidos como la kanamicina y se encuentra bajo el control del promotor *nos* (nopalina sintasa) y el gen *gusA* bajo el control del promotor CaMV35S (virus del mosaico de la coliflor) y la región terminadora NOS.

De las cepas de *A. tumefaciens* almacenadas a -20 °C, se tomó una muestra y se cultivó en medio LB (Luria-Bertani) selectivo suplementado con 50 mgL⁻¹ Kanamicina y 100 mg L⁻¹ Rifampicina durante 3 días a 27 °C ±1. Posteriormente se tomó una colonia y se cultivó en medio LB líquido con los mismos antibióticos para prevenir el crecimiento de bacterias no transformadas durante 48 h y 28 °C. Para finalizar se tomó una colonia y se cultivó en medio LB líquido con antibióticos. El cultivo fue centrifugado a 4000 rpm y re-suspendido en el medio de infección a OD₆₀₀= 0.1.

3.2.3 Medio de cultivo y condiciones de transformación

Los explantes se obtuvieron de la primera y segunda hoja verdadera, del área más cercana al pedúnculo incluyendo nervadura central, se cortaron con bisturí estéril en segmentos de 1 cm² y se sumergieron en suspensión de *A. tumefaciens* de 10 a 20 min. Se utilizó papel filtro para secar el exceso de bacterias, posteriormente los explantes se transfirieron a un medio de infección con acetosiringona para aumentar la inserción de ADN-T, los explantes permanecieron dos días en el área de incubación, con un fotoperiodo de 24 horas luz, 25 ± 2 °C, e intensidad lumínica de 1000 luxes de iluminación. Al finalizar el tiempo establecido los explantes se transfirieron a los medios de selección con 50 y 100 mg·L⁻¹ kanamicina y 25 mg·L⁻¹ de meropenem para evitar la proliferación de bacterias no-transgénicas.

El desarrollo del protocolo de transformación genética consistió en 4 experimentos sucesivos que ensayaron las concentraciones de Kanamicina (100 y 50 mg·L⁻¹).

El proceso de transformación se llevó a cabo en las siguientes etapas: (a) Cocultivo de los explantes con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (p35GUSint) con el vector con los genes quiméricos y (b) Incubación en medio selectivo MS con kanamicina por 4-8 semanas (Figura 3)



Figura 3. Proceso de transformación de explantes de tomate. a) Suspensión en *A. tumefaciens* y secado de explantes. b) Explantes de lámina foliar en medio de infección con acetosiringona. c) Transferencia de explantes a medio de selección.

Para el desarrollo del protocolo de transformación genética se realizaron 4 experimentos sucesivos en los que se ensayaron los siguientes factores: Las concentraciones de Kanamicina (100 y 50 mg·L⁻¹).

Previo a la infección, *Agrobacterium* se cultivó en un medio de inducción (MI) con el fin de aumentar su virulencia. Los cultivos se centrifugaron y resuspendieron en MI hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.1. Este MI fue idéntico en composición al medio empleado para el crecimiento (MR2), pero suplementado con acetosiringona (AS) y glucosa. Para la realización de los experimentos se ensayaron dos combinaciones de acetosiringona: 100 y 200 micromolar. En ambos casos, las suspensiones bacterianas se cultivaron a 28 °C y 180 rpm durante 4-5 horas. El cultivo generalmente se hizo por 20-24 horas, de un día para el otro partiendo de un cultivo fresco.

3.2.5. Selección de las células transgénicas

Posterior a la agroinfección, los explantes transfirieron al medio de selección. Los callos se subcultivaron cada dos semanas a medio selectivo fresco hasta que las células del tratamiento testigo murieron o se observó crecimiento de posible tejido transgénico.

3.2.4. Tinción del gen de la β-glucoronidasa.

Se llevó a cabo una caracterización con el sistema reportero GUS, para evaluar la expresión estable de este gen en el tejido sometido al protocolo de transformación (Jefferson *et al.*, 1987). La prueba se realizó 25 días después de la agroinfección; se incubaron segmentos de callo y brotes en la solución X-Gluc (5 bromo-4-cloro-3 indolil B-D glucoroido) durante 48 h, 37 °C en condiciones de oscuridad para llevar a cabo la reacción histoquímica. Las observaciones se realizaron con el microscopio estereoscópico. Después de 48 horas de

incubación se eliminó la solución X-Gluc y se realizaron tres lavados con etanol 70 %, con el fin de eliminar la coloración verde de la clorofila del tejido y visualizar la tinción azul que produce la expresión del gen GUS (Figura 4); en caso de observarse esta coloración se realizaron dos lavados más con etanol puro y por último, para el mantenimiento de las muestras, estas se sumergen en una solución con glicerol al 50 %.

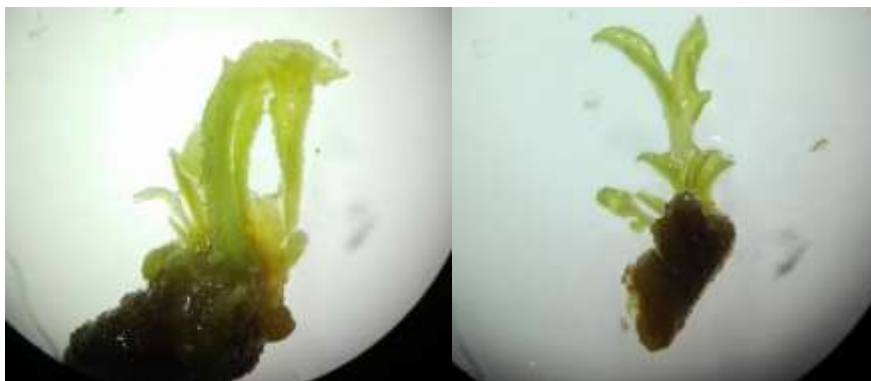


Figura 4. Brotes observados durante la eliminación de clorofila, previo a la aplicación de X-gluc

3.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Para los experimentos de transformación genética se empleó un diseño experimental completamente al azar con 50 repeticiones en arreglo factorial, de dos factores: líneas experimentales de tomate (dos) y medios de cultivo (2); las variables analizadas fueron: porcentaje de explantes que formaron callo, número y longitud de brotes por explante a los 14, 21 y 27 días en medio selectivo, presencia de coloración azul en posibles brotes transgénicos. Los análisis estadísticos consistieron de análisis de varianza, comparaciones de medias y en la prueba de Kruskal y Wallis para variables no paramétricas. (Infante y Zarate, 1986).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Prueba de Medios de Cultivo para regeneración de brotes

Se observó desarrollo de callo (DC) de forma compacta y esférica con coloraciones blancas, amarillas y verdes a partir del día 10 de siembra. Al día 14 de cultivo, se contabilizó 100 % de tejido calloso en las cinco líneas evaluadas (SS5, L3, L47, L79 y H13-33) en ambos medios de cultivo (ME1 y ME2); en esta fecha también se registró el inicio de brotación en las líneas SS5, L3, L47, L79 (Figura 5). La formación de tejido calloso se debe a la elongación y división de células que dan lugar a la ruptura de la dermis y la multiplicación masiva de nuevas células indiferenciadas, lo cual concuerda con lo varios autores (Vikram *et al.*, 2011; López *et al.*, 2015) quienes observaron desarrollo de callo en medio de cultivo complementado con citocininas y auxinas, al obtener mayor inducción de callo en medios que contienen BA 3 mg·L⁻¹+ AIA 1.0 mg·L⁻¹.

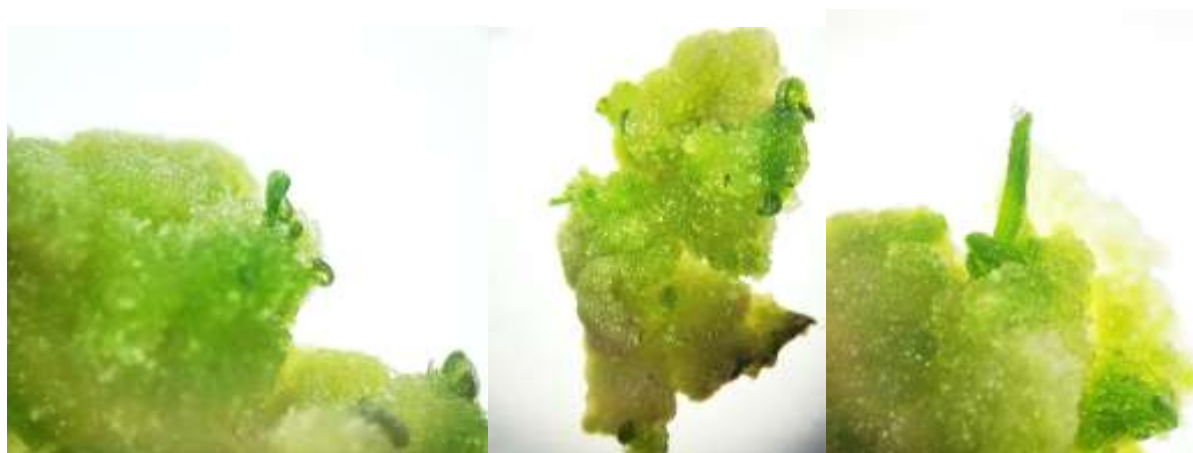


Figura 5. Formación y desarrollo de callo en explantes provenientes de lámina foliar después de 14 días de cultivo

Las auxinas al controlar el alargamiento celular, tropismos, activación cambial, diferenciación vascular, reposo apical, senescencia y abscisión, promueven el desarrollo de yemas y la formación de raíces aunque inhiben su alargamiento (Skoog y Miller, 1967). Por otra parte, las citocininas controlan la morfogénesis y

promueven división celular dando lugar a una gran masa de tejido indiferenciado (Letham y Palni, 1983). Se sabe que con niveles similares de auxinas y citocininas, ocurre el crecimiento indiferenciado de callo. Por el contrario, niveles relativamente altos de citocininas respecto a auxinas inducían la aparición de brotes diferenciadas (Pierik, 1990; Castillo, 2001 y Mora, 2012).

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que en los MR1 y MR2 se tiene una concentración similar de auxinas y citocininas lo que favorece el desarrollo de tejido calloso, posteriormente se observó desarrollo de brotes lo cual indica que las células indiferenciadas, respondieron a la concentración de auxina, debido a que las raíces son estimuladas a concentraciones inferiores a las que estimulan los tallos (Bidwell, 1983), es decir, las concentraciones de auxinas en los medios evaluados fueron las adecuadas para estimular el desarrollo de brotes aunado al desarrollo de tejido calloso.

En el mantenimiento y la multiplicación de los callos es importante la presencia de varios aminoácidos y vitaminas en el medio de cultivo (Smith, 2000) y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis; por lo cual en la presente investigación se concluye que la concentración de vitaminas Gamborg empleada favorece el desarrollo de organogénesis.

Con respecto a la formación y desarrollo de brotes, la prueba de Kruskal-Wallis determino que los dos medios de cultivo evaluados para regeneración (MR1 y MR2) tuvieron efectos diferentes ($\alpha = 0.05$) en el número y longitud de brotes. El MR2 fue superior ($\alpha = 0.05$) en la inducción y regeneración de brotes. Al día 27 de cultivo los resultados indican que la concentración de reguladores del MR1 ($0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA} + 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ANA}$) formo en promedio 2.7 brotes por explante e intervalo intercuartil (1,4); mientras que el MR2 ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA}$) fue superior con promedio de 4.6 brotes por explante, e intervalo intercuartil (3,6) (Figura 6).

En cuanto a la longitud de brotes, el MR2 formo brotes con una longitud promedio de 2.1 cm, a los 27 días de cultivo; en contraste la longitud de los brotes del MR1 fue de 1.7 cm (Figura 7).

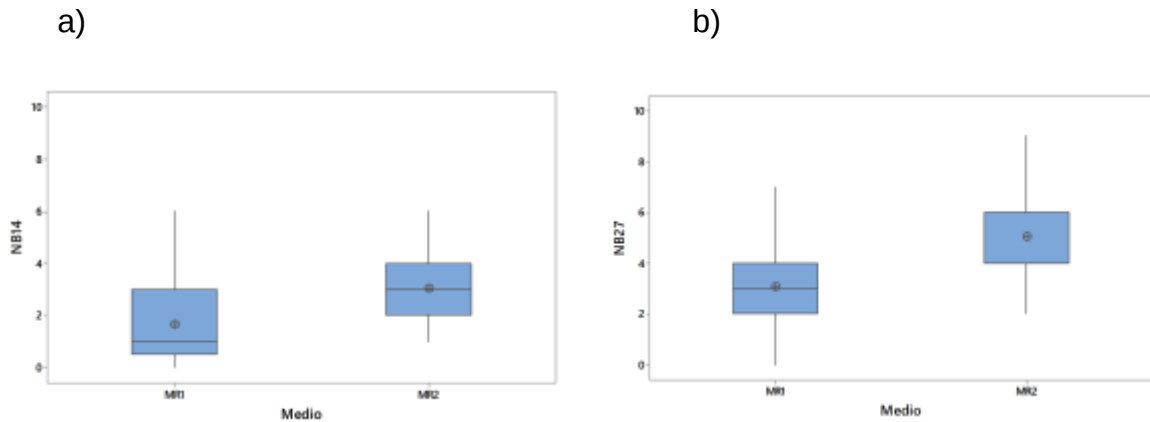


Figura 6. Número de brotes en dos medios de cultivo de regeneración de explantes de hoja de tomate en 14 (a) y 27 (b) días después de la siembra

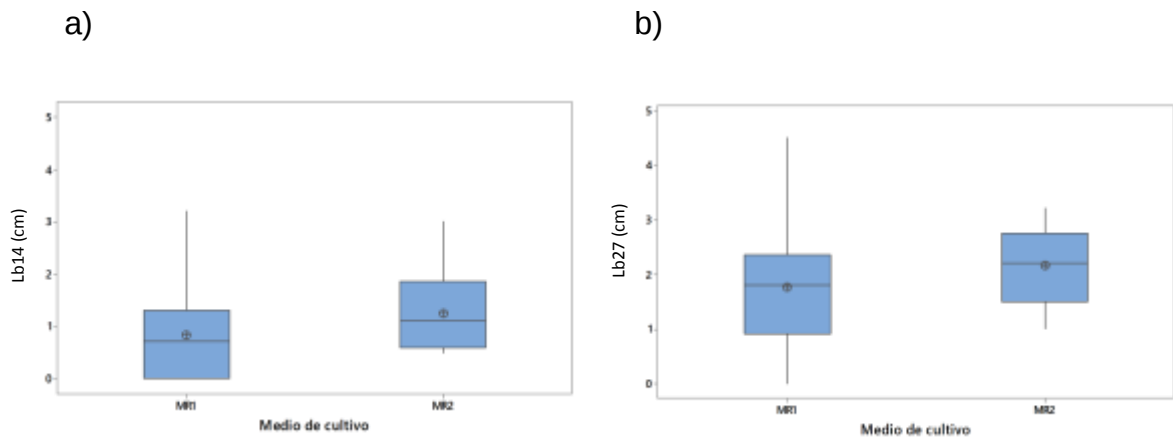


Figura 7. Longitud de brotes de dos medios de cultivo de regeneración de explantes de hoja de tomate en 14 (a) y 27 (b) días después de la siembra.

Nuestros resultados concuerdan con diversos autores (Mamidala y Nanna, 2011; Fariduddin *et al.* 2004), quienes reportan que la combinación de auxinas y

citocininas resulta eficaz en la regeneración vía organogénesis de hojas y tallos de tomate.

Namita (2013) utilizó plantas germinadas en condiciones *in vitro* de 21 días de edad, los explantes provenientes de lámina foliar presentaron brotación a partir del día 15 de cultivo y 27 días después se alcanzó el 100 % de brotación. Con la adición al medio de 2 mg·L⁻¹ BA y 0.1 mg·L⁻¹ IAA, se generaron 8.3 brotes por explante y con 3 mg·L⁻¹ BA y 0.1 mg·L⁻¹ IAA se obtuvo 6.2 brotes por explante; por su parte Vikram *et al.*, (2011) obtuvo 5.3 brotes adventicios en medio MS con 2.5 a 5.0 mg·L⁻¹ BA y 0.1 mg·L⁻¹ IAA.

Los resultados anteriores concuerdan con los obtenidos en esta investigación, en los ambos medios de cultivo (MR1 y MR2) se presentó brotación a partir del día 14 después de la siembra; en el medio suplementado con 2.5 mg·L⁻¹ BA + 1.0 mg·L⁻¹ IAA (MR2) el promedio fue de 5.0 brotes por explante y en el suplementado con 0.9 mg·L⁻¹ BA + 0.02 mg·L⁻¹ ANA (MR1) fue de 3.0; en estos resultados se consideran cuatro genotipos (L3, L47, L79 y SS5), debido a que el genotipo H13-37, no tuvo formación de brotes en ninguno de los medios evaluados, lo cual indica que las concentraciones de reguladores que se proponen no favorecen el proceso de organogénesis en este genotipo debido a que las concentraciones de hormonas endógenas pueden estar inhibiendo o contrarrestando a las presentes en el medio de cultivo, por lo cual, se sugiere realizar investigaciones posteriores para definir las condiciones de cultivo más adecuadas para el desarrollo de organogénesis en esta línea. Se deberá considerar que la línea H13-37, de fruto tipo cereza y de la especie *Solanum lycopersicum* var. *Ceraciforme*, a diferencia de las líneas utilizadas tiene hojas más pequeñas, que pueden ser dañadas fácilmente, al momento de ser seccionadas o durante el protocolo de desinfestación.

La prueba de Kruskal-Wallis indicó que el factor genotipos tuvo variaciones significativas ($\alpha = 0.05$) en el número y longitud de brotes.

Para NB27 los genotipos saladatte de habito de crecimiento indeterminado no presentaron diferencia estadística ($\alpha=0.05$) entre ellas, ambas líneas formaron 4.0 brotes por explante en promedio, con intervalos intercuartiles de (3,5) para la L3 y (2,5) para la L47. La L76, de fruto tipo bola y habito de crecimiento indeterminado tuvo una media de 5.3 brotes por explante e intervalos intercuartil (3.5, 7). El genotipo SS5 tipo riñón de habito de crecimiento indeterminado y proveniente de una población silvestre presento una media de 3.0 brotes por explante e intervalo intercuartil de (2,4) (Figura 8).

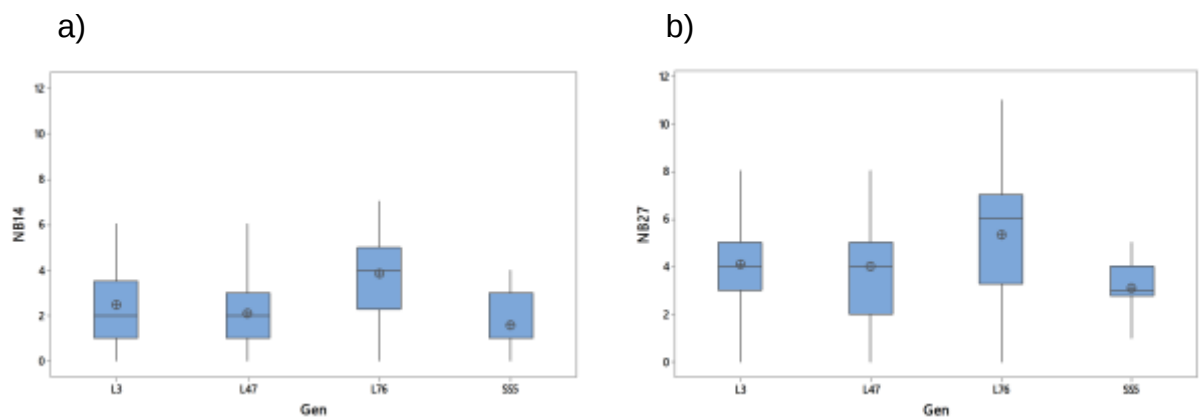


Figura 8. Efecto del genotipo en la formación de brotes (a) número de brotes en 14 días de cultivo y (b) número de brotes en 27 días de cultivo.

Diversos autores reportan que la capacidad de regeneración de explantes depende fuertemente del genotipo y del tipo de explante (Gubis *et al.*, 2004; Rashid y Bal, 2010; Harish *et al.*, 2010). Gubis *et al.*, (2004) reportó que de 224 explantes de la región del hipocotilo e epicotíleo, el 100 % tuvieron de regeneración de brotes; el promedio fue de 6.3 y 6.5 brotes por explante, respectivamente.

La línea L76 tuvo el porcentaje más alto al formar 5.3 brotes por explante, estos resultados se asemejan a lo obtenido por Vikram *et al.*, (2011) quien obtuvo 5.3 brotes en medio MS con 2.5 a 5.0 mg·L⁻¹ BA y 0.1 mg.

Para LB27 los genotipos saladatte de habito de crecimiento indeterminado no presentaron diferencia estadística ($\alpha = 0.05$) entre ellas, la longitud promedio de brotes de la línea L3 fue de 1.9 cm y para la L47 fue de 1.7 cm. La L76 tuvo una longitud promedio de 2.4 cm. y el genotipo SS5 formo brotes de 1.9 cm. (Figura 9).

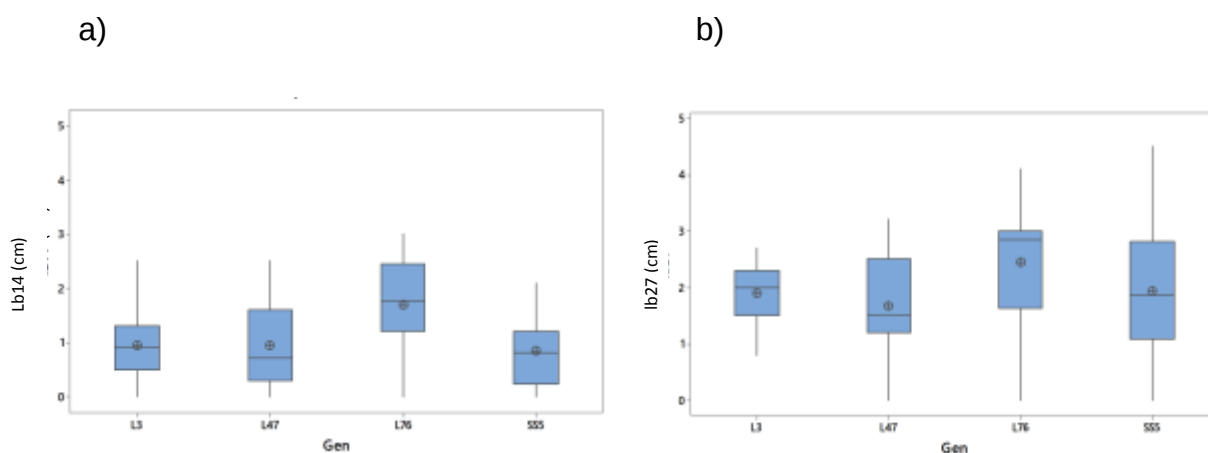
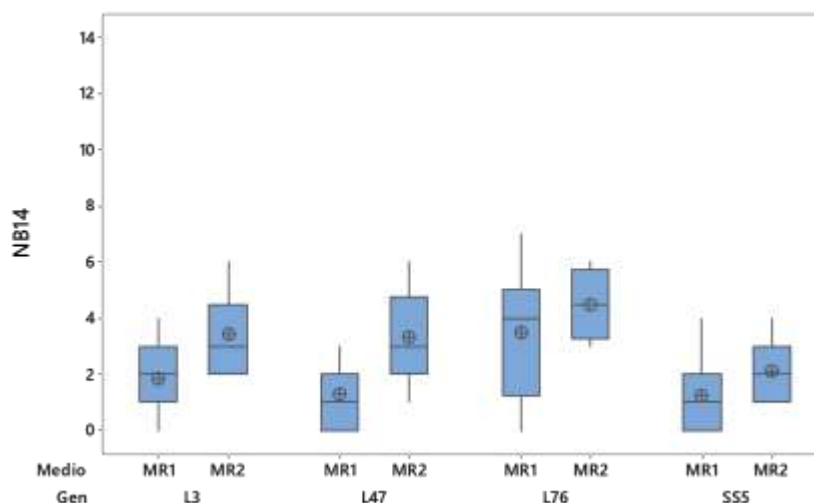


Figura. 9. Efecto del genotipo en la longitud de brotes (a) Longitud de brotes en 14 días de cultivo y (b) Longitud de brotes en 27 días de cultivo

4.1.1. Interacción genotipo por medio

Los resultados de la interacción genotipo por medio (G*M) indican que el desarrollo y crecimiento de brotes dependen tanto de la variedad implicada (características genéticas), como de la composición del medio de cultivo (nutrientes y balance de hormonas vegetales); en este contexto los genotipos L47, L76 y SS5 tuvieron mejor respuesta en el medio MR2; en tanto que L3 tuvo el mismo comportamiento en ambos medios. Con respecto al número de brotes que se formaron a los 27 días de cultivo, la línea SS5 formo 2.6 brotes por explante en el MR1 y 3.8 brotes por explante en el MR2. La línea L3 formo 3.3 brotes por explante en el MR1, y 5.3 brotes por explante en el MR2; de manera similar la línea 43 formo 2.5 brotes por explante en el MR1 y 6.2 en el MR2. (Figura 10).

a)



b)

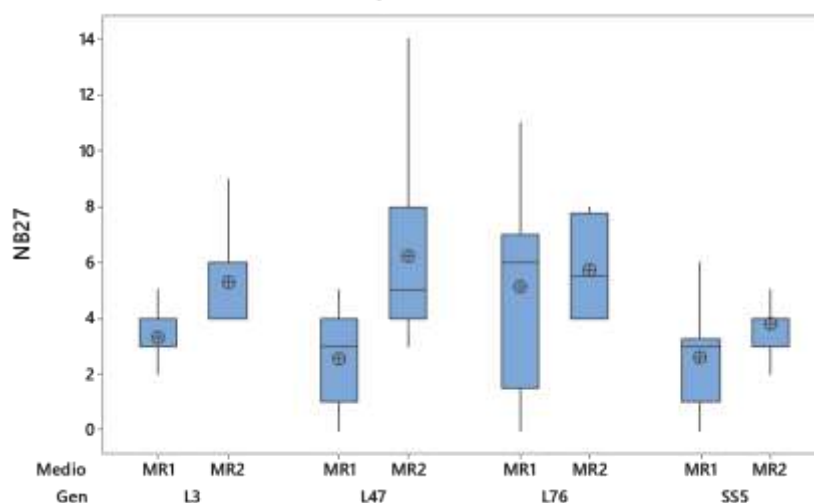


Figura. 10. Interacción genotipo por medio para (a) Número de brotes a 14 días de cultivo y (b) Número de brotes en 27 días de cultivo.

Las líneas con tipo de fruto arriñonado, saladatte y bola el medio más adecuado para la regeneración de brotes es el MR2 compuesto con $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA. Para la línea H13-37 con tipo de fruto cereza no se obtuvieron respuestas positivas en ninguno de los dos medios evaluados (MR1 y MR2).

La concentración de hormonas fueron las requeridas para establecer el nivel hormonal endógeno adecuado que influyó positivamente en las células de la lámina foliar en su capacidad para regenerar plantas. Lo anterior obedece a que la respuesta del explante está en función de los niveles hormonales endógenos de este durante el cultivo *in vitro* (Feher *et al.*, 2003)

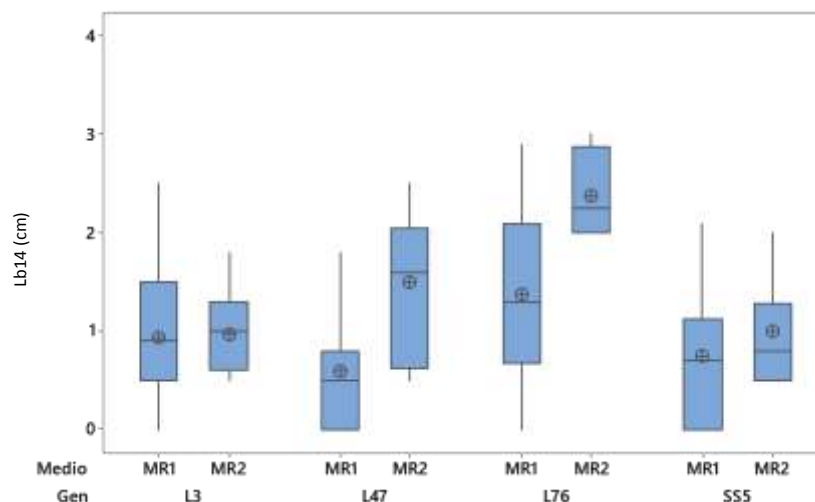
Nuestros experimentos apoyaron los resultados de otros autores (Nogueira *et al.*, 2001; Gubis *et al.*, 2004) donde el medio más eficaz para la regeneración *in vitro* de tomate fue suplementado con una citocinina. Devi *et al.* (2008), estudio de la morfogénesis en 4 cultivares de tomate en respuesta a reguladores del crecimiento encontraron que medios MS suplementados con 3 mg·L⁻¹ BA y 2.5 mg·L⁻¹ IAA era óptimo para la inducción de callos, regeneración y formación de brotes.

Otro factor importante que determina el desarrollo de los organismos autótrofos es la cantidad de luz (irradiación) y la calidad de la luz (espectro) con los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye que las condiciones brindadas a los explantes (fotoperiodo de 24 horas luz, 25 ±2 °C, e intensidad lumínica de 1000 luxes de iluminación) fue la adecuada para favorecer el desarrollo de brotes.

La interacción genotipo por medio en longitud de brotes en 27 días de cultivo (LB27), indica que las líneas L3, L47 y SS5 tienen mayor elongación celular en el medio compuesto por 2.5 mg·L⁻¹ BA + 1.0 mg·L⁻¹ AIA. (MR2)

La línea L76, formo brotes con mayor longitud en el MR1. La línea 47 al ser establecida en el MR1 presento altura promedio de 1.3 cm por brote, en contraste la misma línea en el MR2 presento 2.2 cm. por brote. SS5 en MR1 tuvo longitud promedio de 1.7 cm por brote, mientras que la misma línea en combinación con el MR2 presento altura promedio de 2.7 cm por brote. (Figura 11).

a)



b)

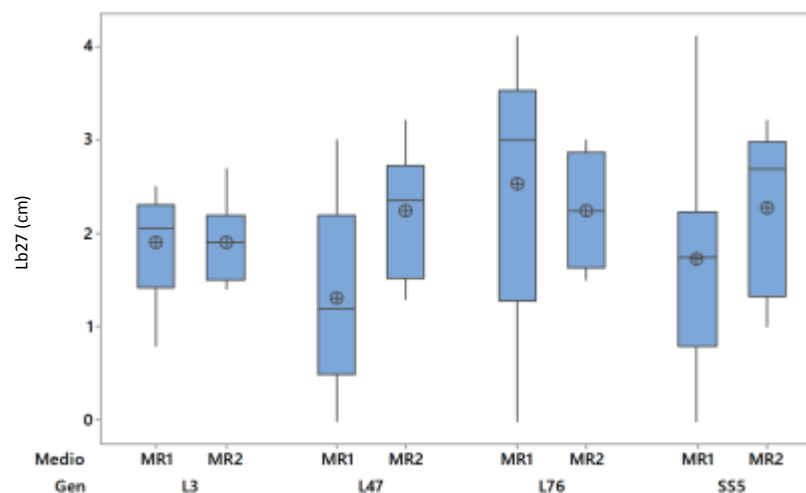


Figura. 11. Interacción genotipo por medio para (a) Largo de brotes a 14 días de cultivo y (b) Largo de brotes a 27 de cultivo.

Los resultados de longitud de brote no fueron contrastados con trabajos anteriores ya que la mayoría de los informes se basa en contabilizar el número de brotes por explante, y no en su longitud. (Rashid y Bal, 2010).

Se concluye que para las líneas SS5, L3, L47 y L79 se pueden regenerar plantas listas para enraizamiento en 27 días, sin necesidad de transferir los explantes a otro medio de cultivo (Figura 12).



Figura 12. Establecimiento *in vitro*. a) Explantes establecidos en medio de cultivo día 0 de siembra. b) Explantes establecidos en medio de cultivo día 27

4.2. Enraizamiento *in vitro* de brotes de tomate

El enraizamiento de las plántulas *in vitro* ocurrió 8 días después del trasplante, lo que indica adecuada división celular de los inóculos (brotes obtenidos en la etapa anterior); la frecuencia de enraizamiento en el ME2 fue de 100 %, lo anterior coincide con Lentini y Escobar (2010) quienes utilizaron $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ANA para enraizar brotes *in vitro*.



Figura. 13. Plantas obtenidas después de 20 días en el medio de enraizamiento los (ME2).

El ME1 que contenía $0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ANA al día 20 de cultivo no presentó desarrollo de raíces, lo cual indica que las bajas concentraciones de ANA en combinación con BA no resulto eficaz para la regeneración de raíces.

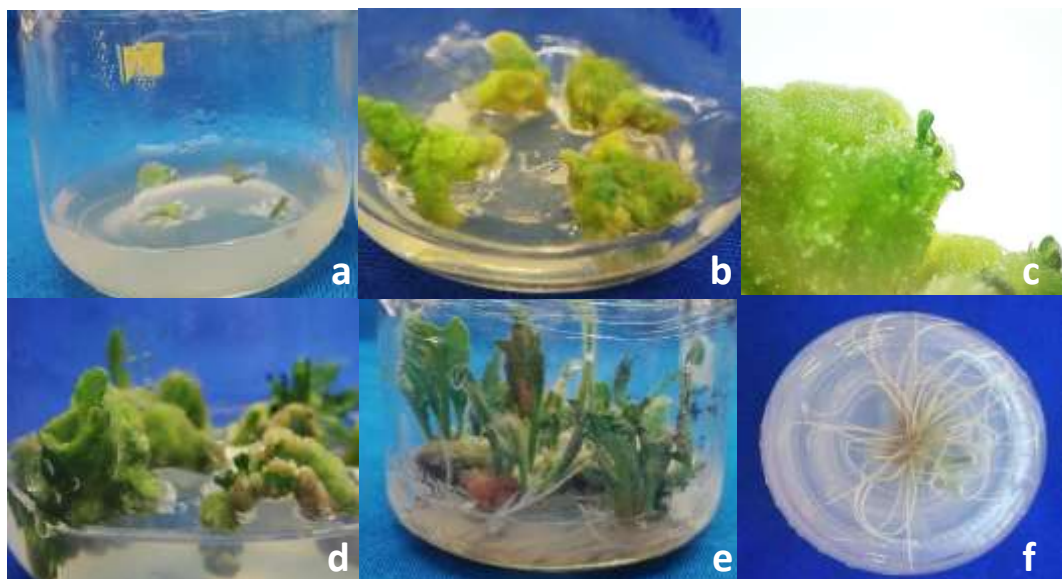


Figura 14. Regeneración *in vitro* de tomate. a) Establecimiento *in vitro* de explantes de lámina foliar; b) Formación de callo, 10 días de cultivo (ddc); c) Diferenciación de brote 14 ddc; d) Desarrollo de brotes 20 ddc; e) Brotes vía organogénesis, 30 ddc, con adecuado desarrollo para trasplante a ME; f) Enraizamiento de brotes después de 20 días en ME.

Se observó que el periodo de enraizamiento fue mayor al necesario (20 días) (Figura 13), las plantas se etilaron y tenían tallos doblados, por lo cual se sugiere disminuir el periodo de enraizamiento en función de la aparición y desarrollo de raíces. Se concluye que para las líneas SS5, L3, L47 y L79 se pueden regenerar plantas listas para aclimatación en 45 días (Figura 14).

4.3. Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro*

Las plantas obtenidas del cultivo *in vitro* fueron transferidas a condiciones de invernadero en turba como sustrato. El desarrollo de hojas nuevas se observó a partir del día diez en la etapa de aclimatación. Las comparaciones de medias de

Tukey ($\alpha = 0.05$) para genotipos indicaron la presencia de dos grupos de significancia en los caracteres AA30, NH0 y NH30. Los genotipos que ocupan el primer grupo: L3 y L43 obtuvieron mayor número de hojas con respecto al tipo bola y arriñonado, lo cual se puede atribuir a las características genéticas de las variedades, al ser establecidas bajo las mismas condiciones presentan diferencias propias de su genotipo.

Se realizó la evaluación porcentual de plantas obtenidas *in vitro* a condiciones *ex vitro*, al término del experimento, 45 días después del trasplante. Los resultados obtenidos indican que la línea L3 tuvo 97.17 %; de sobrevivencia. Las líneas L43, SS5 y L79 tuvieron 100 % de sobrevivencia (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparaciones de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) para genotipos

GEN	AA0	AA30	R0	NH0	NH30	(%)	Desv.
	-----	(cm) ----	-----			Aclimatación	Estandar
SS5	4.7 a	6.1 b	6.3 a	11.6 ab	20.12 b	97.1	0.889
L3	6.9 a	12.6 a	8.2 a	16.0 a	33.3 a	97.1	0.76
L43	5.9 a	11.7 a	9.7 a	9.8 ab	23.8 ab	100	1.12
L76	3.9 a	8.6 ab	6.9 a	7.5 b	23.4 ab	100	0.77

Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha=0.05$); DMSH: Diferencia mínima significativa honesta; AA0: Altura hasta ápice al día 0 de aclimatación; AA30: Altura hasta ápice al día 30 de aclimatación; R0: NH0: Número de hojas al día 0 de aclimatación; NH30: Número de hojas al día 30 de aclimatación.

Lo anterior sugiere que las condiciones ambientales de temperatura y humedad en las que se llevó a cabo el proceso de aclimatación fueron adecuadas para la adaptación gradual de las plantas de tomate, al no presentarse estrés postrasplante (Figura 15).

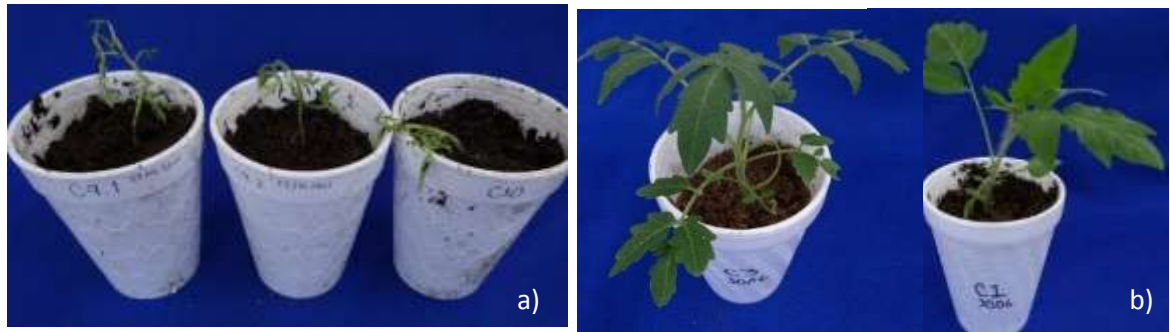


Figura 15. Desarrollo de plantas de tomate aclimatadas. (a) Día 0, establecimiento de plantas *in vitro* a condiciones *ex vitro*. (b) Día 30, plantas aclimatadas.



Figura 16. Producción de líneas de tomate obtenidas a partir de explantes de hoja por medio de cultivo *in vitro*

La aplicación preventiva de fungicida y el monitoreo de la condición de humedad en el sustrato evitaron el desarrollo de hongos, bacterias o virus en las plantas de tomate. Se realizaron aplicaciones preventivas y de control para mosquita

blanca, debido a que se observó la presencia de este insecto en el módulo de aclimatación, sin embargo las plantas no presentaron daños significativos.

Posterior a la etapa de aclimatación las plantas fueron llevadas a condiciones de invernadero con manejo convencional, se observó desarrollo y fructificación adecuada en todas las líneas (Figura 16). Sin embargo es necesario desarrollar mayor investigación para obtener datos de rendimiento, calidad, incidencia de plagas y enfermedades.

4.4. Sensibilidad de tomate a Kanamicina

La evaluación de tolerancia a la Kanamicina, demostró que los dos genotipos de tomate utilizadas fueron sensibles al reactivo; ya que desde la concentración más baja ($50 \text{ mg} \cdot \text{litro}^{-1}$) se inhibió totalmente la formación de callo y cualquier intento de desarrollo morfogénético en los explantes. La resistencia al antibiótico varía enormemente entre especies, pero el efecto final es el mismo; hay reducción significativa o total del crecimiento y amarillamiento del tejido, debido a que la kanamicina afecta la traducción durante la síntesis de proteínas, lo que provoca errores en la lectura (Alberts *et al.*, 1983). Los explantes establecidos en medio con $50 \text{ mg} \cdot \text{litro}^{-1}$ de kanamicina, presentaron un ligero aumento en su volumen; pero mediante la observación al microscopio estereoscópico, se corrobora que este aumento se debió al incremento de volumen en las células y no por división celular. Pocos de estos explantes mostraron un desarrollo morfogénético lento y la mayoría presentaron amarillamiento respecto a los testigos; por lo que se consideró conveniente disminuir la concentración del antibiótico para seleccionar los brotes transformados.

4.5. Obtención de plantas transgénicas

Para el desarrollo del protocolo de transformación genética de tomate se realizaron diferentes experimentos en los que se ensayaron varios factores, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos de esta memoria.

La expresión transitoria del gen *gus A* en las células sometidas con *Agrobacterium* con los distintos plásmidos fue evaluada después de 48 horas. El tejido sometido con los plásmidos no mostró expresión transitoria en ninguno de los casos analizados. Las células no transformadas se tornaron blancas.

Las clonas presuntamente transgénicas no mostraron incremento en su biomasa, por lo tanto se considera conveniente reducir la concentración de los antibióticos en el medio de cultivo.

Aunque el protocolo para regeneración *in vitro* de tomate reportado en el presente trabajo obtuvo cinco plantas promedio por explante, no fue posible igualar esa respuesta en plantas transgénicas. Es probable que la capacidad de regeneración disminuye debido al estrés ocasionado por la transformación (tiempos de infección, daños mecánicos, temperatura, etc.), lo que pudo afectar la capacidad de regeneración (Feher *et al.*, 2011)

La transferencia del T-DNA es un proceso conocido y regulado, cuyo éxito depende de múltiples factores relacionados tanto con la propia bacteria como con el material vegetal a infectar (Birch, 1997). En esta investigación se observó que la cepa LB4404 no es efectiva para agro infectar las líneas de tomate estudiadas, ya que en experimentos posteriores que están fuera de los objetivos de la presente, se demostró que la cepa C58C1 tiene la capacidad de agro infectar las líneas de tomate estudiadas.

V. CONCLUSIONES

Se estableció un sistema de regeneración *in vitro* a partir de segmentos de lámina foliar de 4 semanas de edad que permitieron obtener plantas de cuatro líneas de tomate, la mejor respuesta se obtuvo en el medio con la concentración de reguladores BA 2.0 mg·L⁻¹ y IAA 0.1 mg·L⁻¹

Las condiciones para la regeneración adecuada de plantas dependen del genotipo, explante y composición de medio; dos líneas (L3 y L79) mostraron mejor respuesta.

No se logró expresión transitoria ni transformación estable de las líneas de tomate con la cepa LBA4404 (*pGUSint*)

VI. ANEXO

6.1 Medios para regeneración

Reactivos	MR1	MR2
Sales MS 100 % suplementado con vitaminas Gamborg	2.2 g·L ⁻¹	2.2 g·L ⁻¹
Ácido cítrico	150 mg·L ⁻¹	150 mg·L ⁻¹
Ácido Ascórbico	100 mg·L ⁻¹	100 mg·L ⁻¹
Sacarosa	30 g·L ⁻¹	30 g·L ⁻¹
Benciladenina	0.9 mg·L ⁻¹¹	2.5 mg·L ⁻¹
Ácido Indolacético	0.02 mg·L ⁻¹	1.0 mg·L ⁻¹

MR1: Medio de Regeneración uno. MR2: Medio de Regeneración dos

6.2 Medios para enraizamiento de brotes

Reactivos	ME1	ME2
Sales MS 100 % suplementado con vitaminas Gamborg	2.2 g·L ⁻¹	2.2 g·L ⁻¹
Ácido cítrico	150 mg·L ⁻¹	150 mg·L ⁻¹
Ácido Ascórbico	100 mg·L ⁻¹	100 mg·L ⁻¹
Sacarosa	30 g·L ⁻¹	30 g·L ⁻¹
Benciladenina	0.02 mg·L ⁻¹	1.0 mg·L ⁻¹
Ácido Indolacético	0.9 mg·L ⁻¹	2.5 mg·L ⁻¹

ME1: Medio de Enraizamiento uno. ME2: Medio de Enraizamiento dos.

6.3 Solución de X-Gluc

Solución X-Gluc	Concentraciones
X-GLUC (Disolver en DMSO 1%)	1.0 mM
Tampón Na ₂ HP0 ₄	100 mM
Tampón NaH ₂ P0 ₄	100 mM
EDTA	10 mM
K-Ferrycyanide (Fell)	0.5 mM
K-Ferrycyanide (Fell)	0.5 mM
Triton X-100	0.1 % mM
Agua destilada	Hasta 1L

6.4 Preparación del sustrato X-gluc.

1. Pesar 50 mg de X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-glucurónico) y disolver en 1 mL de DMSO (dimetisulfoxido)
2. Aparte preparar 100 mL de amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.0:
 1. Fosfato de sodio pH 7.0, 100 mM
 2. EDTA pH 8.0, 10 mM
 3. Ferrocianuro de potasio 0.5 mM
 4. Tritón X 100 al 0.1 %
 5. Disolver y aforar a 100 mL y ajustar a pH 7.0
3. Agregar x-gluc disuelto en DMSO al amortiguador de fosfatos, esterilizar por ultrafiltración y guardar en la solución a 4 °C.

VII. BIBLIOGRAFIA

- BIDWELL, R.G. 1979. Fisiología Vegetal. Ed. Cn Español. AGT. México, D.F. 496-497, 624.
- BIRCH, R.G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:297-326.
- BOHOROVA, N.; ZHANG, W.; JULSTRUM, P.; MCLEAN, S.; LUNA, B.; BRITO, R.M.; DIAZ, L.; RAMOS, M.E.; ESTANOL, P.; PACHECO, M.; SALGADO, M. Y HOISINGTON, D. 1999. Production of transgenic tropical maize with *cryIAb* and *cryIAc* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. *Theor Appl Genet* 99:437-444
- BHATIA P, NANJAPPA A TISSA S, DAVID M (2004). Estudios de cultivo de tejidos en tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Planta celular Tiss Org Cult* 78:1-21
- BRASILEIRO, A.C.M. Y ARAGÃO J.L.F. 2001. Marker genes for in vitro selection of transgenic plants. *Journal of Plant Biotechnonology* 3: 113-121. 68
- CASTILLO, A. 2001. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). Las Brujas, Argentina.
- CHANDEL, G. AND KATIYAR, S.K. 2000. Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Advances in Plant Science* **13**: 11-17.
- CHILTON, M. M. AND Q. QUE. 2003. Target integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiology* 133:956-965.
- CHEN L. Z. SILVA L.M. DA JAT. 2006 Somatic embryogenesis, Plant regeneration and clonal propagation in different tissue sources of different flowering plants: monocots and dicots, 299:304 p. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Global Science Books Ltd. Middlesex UK.
- CUBERO J, LOPEZ M. 2005. Agrobacterium tumefaciens Persistence in Plant Tissues after Transformation. In *Methods in molecular Biology*, volumen 286,

- Peña L. (ed.) transgenic Plants Methods and Protocols, Humana Press, Inc. Totowa, NJ.
- DE BLOCK M, DE SONVILLE A, DEBROUWER D. 1995. The selection mechanism of phosphinothricin is influenced by the metabolic state of the tissue. *Planta* 197:619–26
- DE LA RIVA, G. A., J. GONZALEZ-CABRERA, R. VÁZQUEZ-PARDON Y C. AYRA-PARDO. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1: 118-133.
- DEBERGH, P Y R. H. ZIMMERMAN, 1991. Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands p. 71-93
- DEVI, R., M.S. DHALIWAL, S.S. GOSAL. 2013. In vitro direct plant regeneration protocol for tomato genotypes. *Indian Journal of Horticulture* 70(3): 369-372.
- DEVI KAUR EN R, DALIWAL EM, A, SS BANSAL 2008. Efecto de reguladores de crecimiento en *la vitro* la respuesta morfogénica de tomate. *Indian J Biotechnol* 7:526-530.
- ESTOPÁ, M. 2005. El cultivo in vitro en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. *Revista Extra* 2005. Consultado 2016-01-20
- FARIDUDDIN M, TAHER A ISLAM SMA, HOSSAIN MZ 2004. Efecto de reguladores del crecimiento de variedad y de la planta en medio MS sobre la inducción de brotes de virus infectado callos de tomate. *J Biol Sci* 4:52-526.
- FEHÉR, A., T. P. PASTERNAK, AND D. DUSITS. 2003. Transition of somatic plants cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and organ Culture* 74:201-228
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp Cell Res* 50: 150-158
- GAXIOLA RA, LI J, UNDURRAGA S, DANG LM, ALLEN GJ, ALPER SL, FINK GR 2001. Drought-and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺ -pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11444-11449

- GEORGE, E. F.; DEBERGH, P.C. 2008. Micropropagación: Uses and Methods. En: George, E. F.; Hall, M.; De Klerk.; G. Plant propagation b tissue culture 3a edición. Vol 1. The Background. Springer, pp. 29-64.
- GELVIN, S.B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:223-256.
- GUBIS, J., ZUZANA, L. JURAJ, F. AND ZUZANA. J. 2003. Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Biologia Brastislava* **59**: 405-408.
- GUBIS, J., LAJCHOVA, Z. FARGO, J. AND JUREKOVA, Z. 2003. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in vitro. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **39**: 9-14.
- HARISH, M.C., RAJEEV KUMAR, S. AND SATHISH KUMAR. R. 2010. Efficient in vitro callus induction and regeneration of different tomato cultivars of India. *Asian Journal of Biotechnology* **2**: 178-184.
- HODSON, DE J.E. 2005. Transformación genética de plantas para resistencia virus. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 29 (110): 5-24. Hood, E.E.; Helmer, G.L.; Fraley, R.T. y Chilton, M. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 Is Encoded in a Region of pTiBo542 Outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology* 168 (3): 1291-1301
- HOOYKASS, P. J. J. AND R. A. SCHILPEROORT. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* 19:15-38
- ISHAG S. OSMAN M. G. SANTHOSHA H. M. 2012 Effects of growth regulatores, explant and genotype on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicum esculentum* cv. Omduram). *Int J Sustain Crop Pro* 4:7-13
- INFANTE G., ZÁRATE, DE L., G.P. 1989. Métodos Estadísticos. Editorial Trillas. México. 643 p
- JEFFERSON RA. 1987 Assaying chimeric genes in plants. The gus gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:287–405.
- KHOUDI, H., NOURI-KHEMAKHEM, A. GAUIAA, S. AND MASMOUDI, K. 2009. Optimization of regeneration and transformation parameters in tomato and

- improvement of its salinity and drought tolerance. *African Journal of Biotechnology* **8**: 6068-6076.
- KITTS, P., M. ADAMS, A. KONDEPUDI, D. GALLAGHER AND S. KAIN. 1995. Green Fluorescent protein (GFP): a novel reporter for monitorin gene expresion in living cells and organisms. *Clontechniques*. X (1): 1-3
- MAMIDALA P. NANA R. S. 2011. Effect of genotype explant source and medium on in vitro regenerationof tomato. *Int J Genet Mol. Biol.* 3-45-50
- MCCORMICK, S., NIEDERMEYER, J., FRY J., BARNASON, A., HORSCH, R., FRALEY, R. 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell*. 5: 81-84
- MCCORMICK, S., 1991. Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. P 1-9, In: Lindsey, K. (ed). *Plant culture manual*. The Netherlands; Kiewer Academic Publishers.
- MCCULLEN, C. A. AND A. N. BINNS. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interaction and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 101-127.
- MORA, C. 2012. Manejo *in vitro* y caracterización molecular de Ahuehuete (*Taxodium mucronatum* Ten). Tesis Profesional de Maestría. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologic Plantarum*.15: 473-497.
- NAMITA K. K. NEGI P. S. 2010. Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Crit Rev. food Sci. Nutr.* 50:728-760
- NAMITA K. K. NEGI P. S. 2013. Morphogenetic Potential of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. "Arka Ahuti" to Plant Growth Regulators. *Not. Scl. Biol.* 5 (2) 220-225.
- OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. 2010. Parte V, Métodos de propagación y conservación de germoplasma. *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Ediciones INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. 643p.

- OROZCO-CÁRDENAS M, RYAN CA. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and system via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6553-6557
- PÉREZ, E. (2009). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 185p.
- PIERIK, R.L.M.; 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. España. 326p.
- RASHID, R. AND BAL, S.S. 2010. Effect of hormones on direct shoot regeneration in hypocotyl explants of tomato. *Notulae Scientia Biologicae* 2(1): 70-73.
- SAGARPA.<http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/pablo/documentos/monografias/jitomate.pdf>
- SHARMA, P. AND SRIVASTAVA, D.K. 2013. In vitro plant regeneration from leaf and petiole tissues of tomato (*Solanum lycopersicon* cv. Solan vajr.). *Journal of Cell and Tissue Research* 13(3): 3913-3920.
- VAIN, P., WORLAND, B, THOLE., MCKENZIER, N., ALVES, S.C. OPANOWICZ, M., FISCH, L.J., BEVAN, M.W. Y SNAPE., J.W. 2008. Agrobacterium mediated transformation of the temperate grass *Bachipodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal*. 6 (3): 236-245.
- VIKRAM G, K MADHUSUDHAN, SRIKANTH K, LAXMINARASU M, RAMA SWAMY N 2011. Efecto de reguladores del crecimiento vegetal en *la vitro* organogénesis en tomate cultivado. *J Res Biol* 4:263-268.
- YODER, J.I. PALYS, J., ALPERT, K. Y LASSNER, M. 1988. Ac transposition in transgenic tomato planst. *Molecular and General Genetic*. 213 (2-3): 291-29