

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

Ciencia y Tecnología de los Alimentos



REGENERACIÓN DE PLANTAS EN CULTIVO *IN VITRO* DE TOMATE (*Solanum lycopersicum L.*)

TRABAJO FINAL DE GRADO

Autora Maestu Moraleda, Esther

Tutor: Atarés Huerta, Alejandro

Cotutor: Moreno Ferrero, Vicente

Director experimental: Sánchez López, Jorge

Curso académico 2017/2018

Valencia Julio 2018

TÍTULO

Regeneración de plantas en cultivo *in vitro* de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

RESUMEN

El tomate es la especie hortícola de mayor importancia en el mundo tras la patata. Es consumido a nivel global de una infinidad de formas, tanto fresco como procesado.

El cultivo *in vitro* de células y tejidos agrupa diversas técnicas que tienen como finalidad la multiplicación de plantas (micropropagación), el saneamiento del material vegetal (cultivo de meristemos y microinjerto) o la mejora genética (por ejemplo, la transgénesis). La base de estas técnicas es la morfogénesis *in vitro*, que es la regeneración de plantas a partir de una célula indiferenciada que es sometida a un estímulo. Existen dos métodos para lograr la morfogénesis: la embriogénesis y la organogénesis adventicia. Esta última es un proceso por el cual se desarrollan meristemos y yemas a partir de células y tejidos diferenciados. Las plantas regeneradas pueden sufrir modificaciones genéticas con respecto al material de partida. Este fenómeno es conocido como variación somaclonal y puede ser un aspecto deseado o indeseado dependiendo de la finalidad.

El objetivo de este proyecto es mejorar los métodos de regeneración mediante inducción de organogénesis adventicia en tres accesiones de tomate. Para ello se han elegido a dos variedades con las que trabajamos habitualmente, Money Maker y Micro-Tom y otra con la que nunca hemos trabajado, Tomate de colgar. En este caso se han analizado, además de la influencia del genotipo en la capacidad de regeneración, varios factores, como el medio de cultivo y el tipo de explante. Se ha medido la influencia de cada factor sobre la inducción de organogénesis adventicia y su incidencia en la aparición de plantas con un nivel de ploidía diferente al del material de partida. Esperamos que la mejora de los métodos de regeneración existentes y la creación de nuevas vías de investigación en nuestro laboratorio.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum* - Organogénesis adventicia - Cultivo *in vitro*

Autor: Dña. Esther Maestu Moraleda

Localidad y fecha: València, Julio 2018

Tutor Académico: Dr. Alejandro Atarés Huerta

Cotutor: Dr. Vicente Moreno Ferrero

Director experimental: D. Jorge Sánchez López

Tipo de licencia de autorización de acceso y difusión del TFG/M: Creative Commons: Reconocimiento – NoComercial (by-nc).

TÍTOL

Regeneració de plantes en cultiu *in vitro* de tomaca (*Solanum lycopersicum* L.)

RESUM

La tomaca és l'espècie hortícola de major importància en el món després de la creïlla. És consumit a nivell global d'una infinitat de formes, tant fresc com processat. El cultiu *in vitro* de cèl·lules i teixits agrupa diverses tècniques que tenen com a finalitat la multiplicació de plantes (micropropagació), el sanejament del material vegetal (cultiu de meristemos i microempelt) o la millora genètica (per exemple, la transgènesi). La base d'aquestes tècniques és la morfogènesi *in vitro*, que és la regeneració de plantes a partir d'una cèl·lula indiferenciada que és sotmesa a un estímul. Hi ha dues mètodes per aconseguir la morfogènesi: l'embriogènesi i l'organogènesi adventícia. Aquesta última és un procés pel qual es desenrotllen meristemos i rovells a partir de cèl·lules i teixits diferenciats. Les plantes regenerades poden patir modificacions genètiques respecte al material de partida. Aquest fenomen és conegut com a variació somaclonal i pot ser un aspecte desitjat o indesitjat depenent de la finalitat.

L'objectiu d'aquest projecte és millorar els mètodes de regeneració per mitjà d'inducció d'organogènesi adventícia en tres accessions de tomaca. Per això s'han triat dues varietats amb què treballem habitualment, Money Maker i Micro-Tom i una altra amb què mai hem treballat, Tomaca de penjar. En aquest cas s'han analitzat, a més de la influència del genotip en la capacitat de regeneració, diversos factors, com el mig de cultiu i el tipus d'explantament. S'ha mesurat la influència de cada factor sobre la inducció d'organogènesi adventícia i la seua incidència en l'aparició de plantes amb un nivell de ploidia diferent del material de partida. Esperem que la millora dels mètodes de regeneració existents i la creació de nous òbriga noves vies d'investigació en el nostre laboratori.

Paraules clau: *Solanum lycopersicum* - Organogènesi adventícia - Cultiu *in vitro*

TITLE

Plant regeneration of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by tissue culture

ABSTRACT

Tomato is the most important horticultural species behind the potato. It is consumed globally in countless forms, both fresh and processed.

Plant tissue culture groups various techniques whose aim is plant multiplying (micropropagation), sanitation of plant material (meristem culture and micrografting) or genetic improvement (e.g. transgenesis). The basis of all of them is *in vitro* morphogenesis, which is the regeneration of plants starting from an undifferentiated cell that is subjected to a stimulus. There are two methods to achieve morphogenesis: embryogenesis and adventitious organogenesis. The latter is a process by which buds or meristems are grown from cultured cells or tissues.

The aim of this project is to optimize various regeneration methods that use adventitious organogenesis induction for Money Maker and Micro-Tom species, and the creation of new ones for *Tomate de colgar*. To do so, several factors have been analysed, such as the culture medium, the type of explant or the incubation conditions. The influence of each factor on the induction of adventitious organogenesis has been measured. The improvement of existing regeneration methods and the creation of new ones opens up new avenues of investigation in our department. In addition, the techniques developed in this project can serve as a basis for the identification of key genes in future insertional mutagenesis programs.

Keywords: *Solanum lycopersicum* - Adventitious organogenesis - *In vitro* culture

AGRADECIMIENTOS

Tengo mucha gente a la que agradecer el haber llegado hasta aquí. Si me hubieran dicho hace unos años que me armaría de valor y entusiasmo para estudiar este grado, no me lo hubiera creído.

En primer lugar, quiero agradecer a Vicente Moreno la oportunidad de poder formar parte de su grupo de investigación en el laboratorio 0.07, sin él no hubiera conocido a gente maravillosa y no hubiera pasado grandes momentos que recordaré siempre. También doy las gracias a Alejandro Atarés, no solo por dirigir este trabajo, sino por estar siempre dispuesto a atender cualquier duda y por esa infinita paciencia mostrada. Marybel, más que una compañera te considero una amiga. Te tengo que agradecer todo el apoyo y ayuda recibida (sigue pendiente tu visita a Barcelona).

Sergio, este trabajo no hubiera sido posible sin ti, y sin esa muestra constante de amor, ánimo, admiración y generosidad que me has aportado cada día. Me faltan páginas para agradecer y expresar todo lo que me has ayudado. Eres una fuente constante de fuerza que me empuja a seguir y no rendirme. Te quiero.

No me gustaría olvidarme de mi familia, sois muchos a los que agradecer tanto apoyo, desde mis padres a mis suegros, pero sobretodo quiero darte las gracias a ti, Alejandra, por decirme todos los días que te sentías muy orgullosa de mí.

Pero no solo quiero agradecer este trabajo, sino dedicarlo a cuatro personas que por desgracia nunca podrán leerlo. Os lo dedico a vosotros, abuelos, que a través de vuestros valores y palabras cargadas de sabiduría me impulsasteis a seguir mis sueños a pesar de las dificultades. Habéis sido el mejor ejemplo a seguir, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Origen, domesticación y difusión del tomate.....	1
1.2	Descripción morfológica.....	1
1.3	Características edafo-climáticas	3
1.4	Importancia económica del cultivo de tomate.....	3
1.5	La mejora genética del tomate.....	5
1.6	Fundamento y aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i>	6
1.6.1	Respuesta morfogenética en cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	7
1.6.2	Regeneración <i>in vitro</i> de plantas de tomate	9
2	OBJETIVOS.....	10
3	MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1	Material vegetal	11
3.2	Tipos de explantes.....	11
3.3	Preparación y composición de los medios de cultivo	12
3.3.1	Medios organogénicos.....	13
3.4	Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i>	13
3.4.1	Trabajo en condiciones asépticas.....	14
3.4.2	Esterilización de semillas.....	14
3.4.3	Siembra y germinación	15
3.4.4	Condiciones de crecimiento.....	15
3.5	Diseño experimental	15
3.5.1	Evaluación de la respuesta organogénica.....	15
3.6	Estudio de patrón polisomático y del nivel de ploidía	16
3.6.1	Estudio del patrón polisomático del material de partida	17
3.6.2	Estudio del nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	17
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1	Evaluación de la capacidad organogénica del tomate.....	18
4.1.1	Esterilización y germinación de semillas de tomate	18
4.1.2	Evaluación de la eficacia organogénica del tomate.....	18
4.1.3	Evaluación de la capacidad de formación de brotes adventicios del tomate	24
4.2	Analizar el patrón polisomático de los explantes de partida y su influencia en el nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	30

4.2.1	Estudios sobre el patrón polisomático del material de partida.....	30
4.2.2	Nivel de ploidía de los explantes regenerados.....	33
5	CONCLUSIONES.....	35
6	BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Componentes del medio base (MB3), utilizados en los ensayos de regeneración. a(Murashige & Skoog, 1962).....	13
Tabla 2: Composición en hormonal de los medios de cultivo utilizados en el ensayo de regeneración de tomate.	13
Tabla 3: Componentes del medio de germinación, utilizados para la germinación de semillas. a(Murashige & Skoog, 1962).....	15
Tabla 4: Nivel de ploidía de plantas regeneradas procedentes de los explantes de cotiledón proximal y distal. Se muestra el error estándar.	33
Tabla 5: Nivel de ploidía de plantas regeneradas procedentes de los explantes de cotiledón proximal y distal de los tres genotipos. Se muestra el error estándar.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación más antigua de una planta de tomate en Europa (inédito) de Leonhard Fuchs (1542). (Peralta, Spooner, & Knapp, 2008).....	1
Figura 2: Principales países productores de tomate en el año 2014. Fuente: (FAOSTAT, 2017).	4
Figura 3: Producción de tomate (miles de toneladas). A) en las distintas comunidades autónomas de España en 2014. B) en las distintas provincias de la Comunidad Valenciana en 2014. Fuente: (MAPAMA, 2017).	4
Figura 4: Principales países exportadores de tomate en el año 2013 (FAOSTAT, 2017).	5
Figura 5: Esquema de la obtención de los tipos de explantes utilizados. A) Cotiledón proximal; B) Cotiledón distal; C) Ápice meristemático que se cultiva en medio MB3 para obtener una planta axénica de tomate; D) Limbo de hoja; E) Pecíolo de hoja; F) Pecíolulo de foliolo	12
Figura 6: Cabina de flujo laminar y superficie de trabajo con instrumental.	14
Figura 7: Diferentes tipos de explantes en placas Petri con medio organogénico. A) Explantes de cotiledón proximal y cotiledón distal; B) Explantes de limbo de hoja; C) Explantes de pecíolo de hoja; D) Explantes de pecíolulo.	16
Figura 8: Evolución de un explante de cotiledón proximal del genotipo Money Maker en medio organogénico. A) Inicio del cultivo, B) Tras una semana de cultivo, C) Tras dos semanas de cultivo, D) Tras tres semanas de cultivo, E) Tras cuatro semanas de cultivo. La barra representa un centímetro.	19
Figura 9: Eficacia de regeneración en función del genotipo.	19

Figura 10: Eficacia de regeneración en función del tipo de explante de cotiledón.	20
Figura 11: Eficacia de regeneración en función del tipo de explante de cotiledón y genotipo...21	
Figura 12: Eficacia de regeneración en función del tipo de explante de hoja.	21
Figura 13: Eficacia de regeneración en función del tipo de explante de hoja y genotipo.	22
Figura 14: Eficacia de regeneración en función del medio de cultivo.	23
Figura 15: Eficacia de regeneración en función del medio de cultivo y genotipo.	24
Figura 16: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con algún brote. La barra muestra el error estándar.	25
Figura 17: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para explantes de cotiledón. La barra muestra el error estándar.	26
Figura 18: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para cada genotipo. La barra muestra el error estándar.	26
Figura 19: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para explantes de hoja de planta axénica. La barra muestra el error estándar.	27
Figura 20: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para explantes de hoja del genotipo Moneymaker. La barra muestra el error estándar.	27
Figura 21: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para explantes de hoja del genotipo Micro-Tom. La barra muestra el error estándar.	27
Figura 22: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para explantes de hoja del genotipo Tomate de colgar. La barra muestra el error estándar.	28
Figura 23: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio en función del medio de cultivo. La barra muestra el error estándar.	28
Figura 24: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio en función del medio de cultivo para Moneymaker. La barra muestra el error estándar.	29
Figura 25: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio en función del medio de cultivo para Micro-Tom. La barra muestra el error estándar.	29

Figura 26: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio en función del medio de cultivo para Tomate de colgar. La barra muestra el error estándar.30

Figura 27: Patrón polisomático de explantes que tienen su origen en una planta diploide que no presenta fenómeno de endorreduplicación (A) y sí presenta endorreduplicación (B). En cada gráfica está representado al menos 5000 núcleos celulares.30

Figura 28: Patrón polisomático de los explantes de cotiledón. Representación del porcentaje de células 2C, 4C y 8C de ambos tipos de cotiledón (A) y de los tres genotipos estudiados (B). Cada muestra analizada contiene al menos 5000 núcleos celulares.....32

Figura 29: Patrón polisomático de los explantes de cotiledón distal y proximal para cada genotipo. Representación del porcentaje de células 2C, 4C y 8C. Cada muestra analizada contiene al menos 5000 núcleos celulares.....32

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ORIGEN, DOMESTICACIÓN Y DIFUSIÓN DEL TOMATE.

Las solanáceas son una familia de plantas herbáceas dentro de la cual podemos encontrar especies tan importantes en la alimentación como la patata, la berenjena, el pimiento o el tomate. Esta última recibe el nombre científico de *Solanum lycopersicum* L.

Su origen se localiza en la región compartida actualmente por Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile, siendo esta área donde se encuentra la mayor variación de plantas silvestres de tomate (Nuez, 1995).

Existe controversia en torno al lugar de domesticación. Por un lado, la hipótesis de Candolle (De Candolle, 1883) argumenta que éste debería haber sido domesticado en Perú debido a los nombres que algunos botánicos del siglo XVI le dieron al tomate: *mala peruviana* o *pomi del Perú*. Sin embargo, estos nombres no parecen tener una base fundada. Por otro lado, evidencias lingüísticas, históricas y genéticas sugieren que el tomate realmente fue domesticado en México. Por ejemplo, se sabe que el nombre “tomate” tiene su origen en el de *tomatl*, en la lengua náhuatl de México (Díaz & Nuez, 2008).

Después de la llegada de los españoles a América, el tomate fue introducido en Europa (Figura 1). El primer escrito que habla sobre la introducción del tomate proviene del botánico italiano Pier Andrea Mattioli, que en 1554 escribió que el tomate “se come en Italia con aceite, sal y pimienta”. La aceptación del tomate fue muy desigual. Mientras que en España e Italia se introdujo desde el principio en la alimentación humana, algunos países sólo lo cultivaban de manera ornamental. La razón de esta marginación eran las propiedades hemolíticas, paralizantes e incluso mortales que tenían algunas solanáceas como la “Mandrágora” o la “Belladona” con las que se relaciona al tomate (Nuez, 1995; Pérez Grajales, Márquez Sánchez, & Peña Lomelí, 1998).



Figura 1: Representación más antigua de una planta de tomate en Europa (inédito) de Leonhard Fuchs (1542). (Peralta, Spooner, & Knapp, 2008).

1.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

El tomate es un cultivo anual, perenne y tiene un porte arbustivo. La planta puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Además, dependiendo de la variedad, el crecimiento puede ser determinado por la aparición de una inflorescencia terminal o indeterminado.

Semilla

Su semilla es de color grisáceo, tiene forma oval, aplastada, y un diámetro de 3 a 5 milímetros. Está compuesta por el embrión, el endospermo y la testa. El embrión está formado por la radícula, el hipocótilo, dos cotiledones y la yema apical. En el endospermo se encuentran los nutrientes necesarios para que el embrión pueda comenzar a desarrollarse. La testa, la capa externa protectora, es dura e impermeable y está recubierta de vellosidades.

Sistema radicular

El tomate tiene una raíz principal que surge de la semilla y multitud de raíces secundarias. En condiciones favorables de textura y humedad del suelo, se pueden desarrollar raíces adventicias a partir de la base del tallo, cuya estructura es similar a la de las raíces secundarias.

Tallo

El tallo crece erguido en las primeras fases de desarrollo, pero se tuerce en cuanto aumenta el peso de las ramas. Es grueso, de superficie angulosa y clorofílico. Presenta entrenudos de 1 a 6 centímetros de largo. Además, se desarrollan tallos secundarios a partir de las axilas de las hojas. La superficie del tallo es vellosa y contiene glándulas que desprenden un aroma característico.

Hojas

Las hojas son compuestas y están formadas por numerosos folíolos a lo largo del raquis, que suelen ser peciolados, de forma ovalada y con bordes dentados. Las hojas presentan el mismo tipo de vellosidades que el tallo.

Flor

La flor consta de 5 o más sépalos, de 5 o más pétalos de color amarillo, de un número igual de estambres que forman el cono estaminal y de un ovario bi o plurilocular. Las flores, en número variable, se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso que aparecen en el tallo cada 3 ó 4 fitómeros.

Fruto

El fruto es una baya con dos o más lóculos, compuesto por el pericarpo, el tejido placentario y las semillas. Su color más habitual y conocido es el rojo, aunque también puede ser amarillo o rosado dependiendo del pigmento predominante (licopeno o caroteno). Según la variedad puede presentar diversas formas (achatada, redondeada o en forma de pera) y tamaños (entre 5 y 500 gramos). La superficie suele ser lisa, aunque también puede tener surcos (R. R. Rodríguez, Rodríguez, & San Juan, 1997).

1.3 CARACTERÍSTICAS EDAFO-CLIMÁTICAS

El tomate es una planta con facilidad para adaptarse a una gran variedad de climas. Sin embargo, es importante tener en cuenta todos los factores climáticos para lograr un crecimiento adecuado del cultivo.

Temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes ya que afecta a la germinación, la fotosíntesis, la transpiración, el sistema radicular y, en general, a todas sus funciones vitales. Para lograr un cultivo rentable se necesitan al menos 110 días consecutivos sin heladas.

Por otro lado, por debajo de 12°C el desarrollo vegetativo de la planta se paraliza y por debajo de 7°C necesita calefacción artificial. Además, la maduración del fruto del tomate está fuertemente ligada a la temperatura. Tanto la velocidad como la coloración se ven afectados por este factor. Valores por debajo de 10°C o superiores a 30°C pueden originar tonalidades amarillentas con la consiguiente pérdida de calidad.

Humedad

Es recomendable una humedad relativa media que no supere el 50%. Humedades relativas muy elevadas dificultan la fecundación de las flores (por la compactación del polen), propician el agrietamiento del fruto y el desarrollo de enfermedades aéreas.

Luminosidad

El desarrollo vegetativo se ve especialmente influido por la luminosidad. Con una intensidad lumínica subóptima se generan tallos más largos sacrificando el crecimiento de otras partes de la planta. La floración también se ve afectada por la luminosidad. Si es deficiente puede retardarla e incluso provocar la caída de las flores. La duración del día afecta al tomate en menor grado que a otros cultivos, aunque es importante para la maduración homogénea del fruto.

Suelo

Este cultivo no es muy exigente respecto al suelo. No obstante, crece de manera óptima en suelos profundos y bien drenados. El pH óptimo es el neutro, aunque admite suelos ligeramente ácidos y alcalinos. También tolera suelos moderadamente salinos (Nuez, 1995).

1.4 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE TOMATE

El tomate es la hortaliza más cultivada después de la patata. La producción mundial de tomate ha ido aumentando considerablemente en la última década, debido principalmente al aumento del rendimiento propiciado por el uso de variedades más productivas, por la mejora de las condiciones de cultivo y, en menor proporción, por el aumento de la superficie cultivada. En 2014 se han producido en el mundo 170,7 millones de toneladas de tomates en un área aproximada de 5 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2017). Los mayores productores de este cultivo son China con 52,6 millones de toneladas, seguido de India (18,7) y Estados Unidos (14,5) España se encuentra en el octavo puesto, con una producción de 4,9 millones de toneladas (Figura 2).

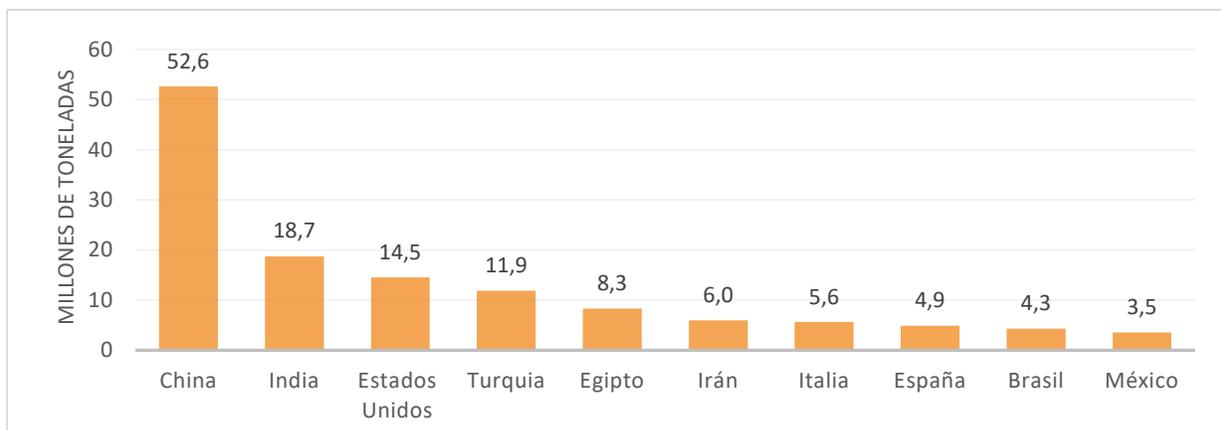


Figura 2: Principales países productores de tomate en el año 2014. Fuente: (FAOSTAT, 2017).

A nivel nacional los datos obtenidos a través del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, sitúan al cultivo de tomate como el de mayor producción hortícola en 2014, con casi 5 millones de toneladas entre producción para el consumo en fresco y en conserva, repartidas en un total 54.747 hectáreas, de las que 21.129 eran de invernadero, destacando principalmente las comunidades de Andalucía (2 millones de toneladas y 42% de la producción total) y Extremadura (1,8 millones de toneladas y 38% de la producción total) como las más importantes. La Comunidad Valenciana se encuentra en el séptimo puesto, con una producción de 74.000 toneladas (Figura 3A).

En los distintos territorios valencianos se dedican al cultivo del tomate alrededor de 1.200 hectáreas. De éstas, 544 pertenecen a la provincia de Castellón, con más del 80% del total de cultivo al aire libre, llegando a obtener una producción de 11.082 toneladas y un rendimiento de 20,6 t/ha. Alicante dispone de 594 hectáreas de tomate, la mayoría dedicadas al cultivo bajo invernadero (89%), con una producción de 56.895 toneladas y un rendimiento de 114,3 t/ha. Finalmente, en la provincia de Valencia solamente se destinan 152 hectáreas a este cultivo, obteniendo una producción de 5.108 toneladas y un alto rendimiento, que en invernadero alcanza la cifra 46,7 t/ha (MAPAMA, 2017) (Figura 3B).

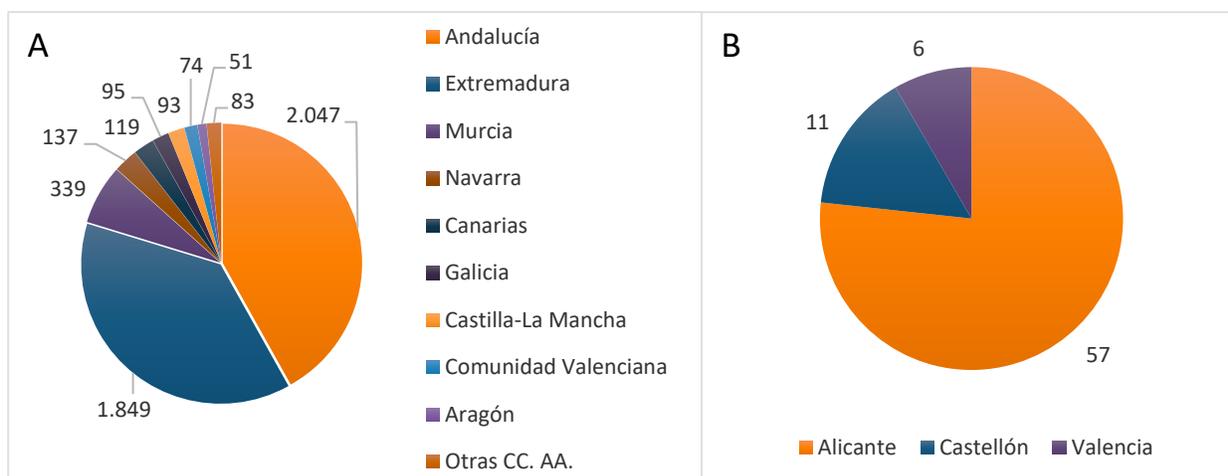


Figura 3: Producción de tomate (miles de toneladas). A) en las distintas comunidades autónomas de España en 2014. B) en las distintas provincias de la Comunidad Valenciana en 2014. Fuente: (MAPAMA, 2017).

Durante el año 2014, los hogares españoles consumieron 2.795 millones de kilos de hortalizas frescas y gastaron 4.370 millones de euros en estos productos, es decir, 62,3 kilos de consumo y 97,5 euros de gasto per cápita. El consumo más notable se asocia a los tomates (14,3 kilos por persona y año), lo que representa un 22,9% del consumo total de hortalizas frescas, seguido de las cebollas y de los pimientos. En términos de gasto, los tomates concentran el 19,5%, con un total de 19,6 euros por persona y año, seguido de las lechugas, escarolas y endivias (MAPAMA, 2017).

En cuanto al comercio exterior de tomate, según datos de la FAO, España se encuentra en el segundo puesto de países con mayor exportación de tomate fresco (923.191 toneladas) por detrás de México, que es el principal exportador con 1.093.052 toneladas. Destacan las exportaciones a países de la Unión Europea, principalmente a Alemania, Francia, Países Bajos, Reino Unido y Polonia (FAOSTAT, 2017) (Figura 4).

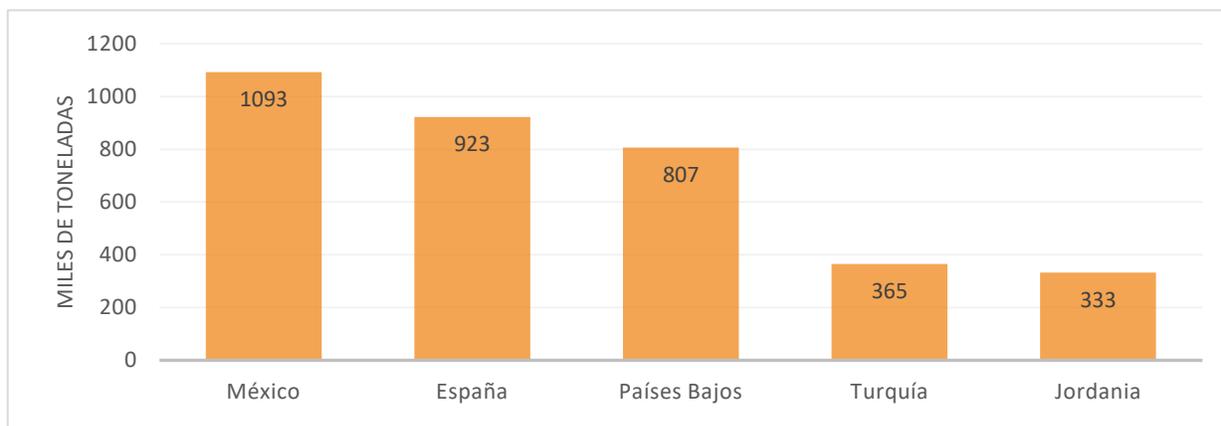


Figura 4: Principales países exportadores de tomate en el año 2013 (FAOSTAT, 2017).

1.5 LA MEJORA GENÉTICA DEL TOMATE

El mejoramiento genético de plantas no es un descubrimiento reciente, sino que se produjo con el inicio de la agricultura por parte del ser humano hace más de 10,000 años. El hombre, por medio de la observación, domesticó aquellas plantas con frutos de mayor tamaño, que presentaban mayores rendimientos o individuos con una menor susceptibilidad a factores bióticos o abióticos. Este periodo de **mejora intuitiva** produjo las primeras variedades cultivables que, aunque eran similares a las variedades silvestres, ya presentaba caracteres diferentes a los de sus ancestros.

A finales del siglo XVII se descubrió la reproducción sexual mediante cruzamientos entre variedades. A su vez, esta época estuvo marcada por una escasez de alimentos a causa de la masificación creciente de las ciudades industriales y de la despoblación simultánea del medio rural. Todo ello propició el inicio del siguiente periodo, el de **mejora científica** en la que aparecieron las casas comerciales que producían semillas y plantas de vivero. En esta etapa el agricultor se desentiende cada vez más de hacer sus propias selecciones y va delegando esta función en las empresas que se especializan en la generación de nuevas variedades con mejores características.

A principios del siglo XX la mejora genética sufrió un desarrollo espectacular debido al redescubrimiento de las leyes de Mendel y de la aplicación de diversas ciencias como la bioquímica, fisiología, biología molecular, etc. El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante abrió nuevas posibilidades ya que se dispone de una herramienta que permite modificar de forma controlada el ADN, la molécula en la que se encuentra la información genética de los seres vivos. Este periodo, en el que estamos actualmente, se conoce como **mejora biotecnológica**.

Los programas de mejora del tomate rigen sus objetivos por los distintos sectores implicados: industria alimentaria, casas de semillas, agricultores y consumidores. Por ello, no se puede establecer una única variedad que agrupe las necesidades de todos ellos, pero sí se puede mencionar algunos caracteres que son de suma importancia para la mejora genética de tomate. Uno de los objetivos más importantes es el desarrollo de variedades resistentes a plagas y enfermedades. Aunque se han identificado una serie de genes que confieren resistencia a diversas enfermedades, existen otras muchas, sobre todo virosis, que siguen causando una gran cantidad de pérdidas en el sector. Otro de los objetivos principales sería aumentar la calidad interna del fruto. En las últimas décadas los programas de mejora estaban enfocados a conseguir mayor uniformidad del fruto, mayor vida postcosecha e incrementar el rendimiento. Sin embargo, el consumidor actualmente demanda mayor valor organoléptico del fruto. Es por ello que los programas de mejora enfocados a aumentar el valor nutricional (vitaminas, carotenoides y compuestos fenólicos) tienen cada vez mayor importancia.

Para alcanzar estos objetivos las casas de semillas siguen empleando métodos de hibridación y selección. Para tener éxito con este abordaje es necesario disponer de fuentes de variación para el carácter que se pretende mejorar en la propia especie o en especies sexualmente compatibles con ésta. Así, se ha recurrido al cruce con diferentes especies silvestres relacionadas con tomate como *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum var. cerasiforme* por su elevado contenido en sólidos solubles (Jones, 1990; G. R. Rodríguez, Cárdenas, & Sánchez, 2010), *S. pennellii* por su contenido en flavonoides (Rousseaux et al., 2005) y *S. habrochaites* por su contenido en β -caroteno (Zhang & Stommel, 2000).

El principal inconveniente de las técnicas de mejora antes mencionadas es que necesita fuentes de variabilidad que sean sexualmente compatibles con la especie que se pretende mejorar. Un modo de solventar este problema es recurrir a técnicas de cultivo *in vitro* con las que se puede ampliar los recursos filogenéticos disponibles para un programa de mejora (técnicas de hibridación interespecífica) e incluso introducir genes aislados procedentes de cualquier otro organismo (técnicas de transformación genética).

1.6 FUNDAMENTO Y APLICACIONES DEL CULTIVO *IN VITRO*

El cultivo *in vitro* es el conjunto de técnicas utilizadas para inducir el crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales en un medio aséptico (libre de microorganismos) con nutrientes y bajo condiciones ambientales controladas (Calva & Ríos, 1999; Street, 1973). Estas técnicas se basan en el principio de totipotencia, es decir, la capacidad que poseen algunas células vegetales, independientemente de su función o posición en ella, de regenerar una nueva planta

completa (Feri & Paul, 2000). Esta característica celular fue anunciada por Haberlandt en 1902, dando lugar a las primeras investigaciones sobre el cultivo *in vitro*. En 1904, Hännig desarrolló una metodología para la obtención de plántulas viables de algunas crucíferas mediante el cultivo de embriones, en el que aislaba embriones inmaduros. En 1934, White pudo mantener indefinidamente en medios líquidos (que contenían sales minerales, extracto de levaduras y azúcar), el crecimiento de raíces de tomate a partir de ápices del tallo. Skoog y Tsui demostraron en 1948 que existía una regulación química en la parte aérea y en la raíz mientras trabajaban con cultivos de callo de tabaco (Pierik, 1997). El descubrimiento y utilización de los reguladores de crecimiento como las auxinas (e.g. ácido 3-indolacético) y las citoquininas (e.g. kinetina), dieron lugar a grandes avances en el desarrollo de las técnicas en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Lorente, 2012).

El cultivo *in vitro* de células y tejidos agrupa diversas técnicas que tienen como finalidad la multiplicación de plantas (micropropagación), el saneamiento del material vegetal (cultivo de meristemos y microinjerto) o la mejora genética (por ejemplo, la transgénesis). En muchas especies de plantas ornamentales y árboles frutales se han sustituido las técnicas convencionales de multiplicación vegetativa por la micropropagación gracias a su eficacia y calidad de las plantas obtenidas. Además, esta técnica permite la conservación del germoplasma para variedades con dificultad en la obtención de semillas y, más específicamente, la conservación y multiplicación de genotipos que se encuentran en peligro de extinción. El cultivo *in vitro* permite la obtención de plantas sanas a partir de material enfermo. En concreto se puede obtener material sano, libre incluso de virus, utilizando técnicas como el cultivo de meristemos y el microinjerto. Uno de los ejemplos más evidentes del impacto de estas técnicas es el empleo del microinjerto para obtener variedades de cítricos libres de la enfermedad de la tristeza.

Por lo que respecta a la mejora genética, se han desarrollado diferentes metodologías basadas en cultivo *in vitro* que han permitido la mejora de multitud de especies. Algunos ejemplos son: la obtención de plantas haploides a partir del cultivo de anteras, microesporas, óvulos u ovarios para la obtención de líneas puras en un periodo corto de tiempo; el rescate de embriones de cruces interespecíficos para superar las barreras de incompatibilidad sexual; el aumento de la variabilidad genética mediante el aprovechamiento de la variación somaclonal; la fusión de protoplastos de dos parentales diferentes para conseguir la regeneración de plantas híbridas; y la transformación genética, que permite transferir uno o varios genes que pueden aportar características deseables a las plantas huésped.

Ninguna de las aplicaciones nombradas anteriormente sería posible sin la morfogénesis *in vitro*, que es la base de todas ellas, desde las alternativas biotecnológicas enfocadas al saneamiento y la producción de plantas hasta gran parte de las metodológicas dirigidas a la mejora genética.

1.6.1 Respuesta morfogenética en cultivo *in vitro* de plantas

Se define como morfogénesis a la regeneración de plantas a partir de una célula indiferenciada que es sometida a un estímulo. La respuesta morfogenética puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: la embriogénesis y la organogénesis.

La embriogénesis es el proceso por el cual se obtienen embriones a partir de tejidos somáticos. La diferencia de los embriones somáticos con los embriones cigóticos es que aquellos no provienen de la fecundación de los gametos. La otra vía morfogenética es la organogénesis, un proceso por el cual a partir de células o tejidos diferenciados se produce la formación de nuevos meristemas. Cuando se produce un meristemo apical su desarrollo puede dar lugar a una planta.

Las plantas regeneradas mediante organogénesis adventicia pasan por varias fases en su desarrollo: la formación de callo desorganizado, producto del crecimiento y dediferenciación de células en las zonas de corte de los explantes; la formación de yemas adventicias, que se caracterizan por la aparición de pequeñas zonas de color verde intenso en las zonas de corte o en los callos desorganizados originados a partir de éstos; el desarrollo de brotes, que surgen a partir de las yemas adventicias y se caracterizan por ser estructuras completas (hojas y tallo elongado).

Las plantas regeneradas por esta vía pueden sufrir modificaciones genéticas con respecto al material de partida. Este fenómeno, que ocurre frecuentemente en las especies vegetales, es conocido como variación somaclonal, y se produce cuando la regeneración implica la formación de una fase callosa, tanto si ocurre a través de organogénesis o por embriogénesis. Los factores que influyen en la aparición de esta variación son múltiples, desde el genotipo, el tipo de explante, las condiciones de cultivo, el efecto de los reguladores del crecimiento, hasta el nivel de ploidía (número de complementos cromosómicos de una célula u organismo) de las células a partir de las cuales se inicia el proceso.

La variación somaclonal resulta ser una ventaja en programas de mejora de plantas para ampliar la base genética de cultivos de interés agronómico, particularmente para cultivos con base genética estrecha y que son difíciles de mejorar a través de técnicas tradicionales. Además, puede utilizarse para mejorar especies de propagación sexual y vegetativa y las tasas de mutación son más elevadas en comparación con las tasas de mutaciones espontáneas. Un ejemplo de la utilización de este fenómeno es la obtención de sandías sin pepitas. Éstas proceden del cruzamiento de una planta normal (diploide) y otra con cuatro complementos cromosómicos (tetraploide) que tiene como resultado una planta triploide cuyo trío de juegos de cromosomas no pueden dividirse correctamente para crear células sexuales, por lo que no producen semillas. Cuando el objetivo es la micropropagación, altas tasas de variación somaclonal son consideradas como un problema importante, especialmente en operaciones comerciales a gran escala. También es un inconveniente en métodos de transformación genética, donde la única variación deseada es el gen introducido en la especie huésped.

Los mecanismos involucrados en estas mutaciones son variados y están relacionados con cambios nucleotídicos puntuales, la expresión de los genes mediante activación de los trasposones, pérdida de cromatina, incluso cambios en el número y estructura de los cromosomas (delecciones, translocaciones y duplicaciones). El método más eficaz para evaluar alteraciones que afecten al número de cromosomas de los individuos regenerados, una de las mutaciones más frecuentes, es la citometría de flujo, que es una técnica que permite cuantificar en muy poco tiempo diversas características (tamaño, emisión de fluorescencia, etc.) de partículas suspendidas en un medio fluido. En este caso se emplea la citometría para analizar

núcleos celulares teñidos con un fluorocromo que se une específicamente al ADN. De esta forma se puede saber muy rápidamente el contenido en ADN de múltiples células de un tejido.

1.6.2 Regeneración *in vitro* de plantas de tomate

Se han publicado varios estudios de regeneración de tomate a partir de diferentes órganos y tejidos procedentes tanto de variedades silvestres como de cultivadas. Se ha logrado la regeneración mediante embriogénesis (por vía embriogénica) a partir de protoplastos (Chen & Adachi, 1994), hipocótilos (Newman, Krishnaraj, & Saxena, 1996) y del cultivo en medio con elevada concentración de citoquinina (Gill, Malik, Sanago, & Saxena, 1995; Kaparakis & Alderson, 2002). Aunque la principal vía de regeneración en esta especie es por organogénesis, a través de la diferenciación de callo desorganizado originado de explantes de hoja, de raíz, de cotiledones o de hipocótilo (Geetha, Venkatachalam, Sairam Reddy, & Rajaseger, 1998; Koornneef, Hanhart, & Martinelli, 1987; Locy, 1983; Meredith, 1979).

El proceso de regeneración se ve influenciado por los reguladores de crecimiento añadidos, los nutrientes del medio, los regímenes de luz y temperatura de las cámaras, el tipo de tejido, y en gran medida, por el genotipo (Bhatia, Ashwath, Senaratna, & Midmore, 2004; El-Farash, Abd-Alla, Taghian, & Ahmed, 1993). Existen múltiples trabajos en los que se ha experimentado de manera empírica cuál era la mejor combinación de estos factores para lograr la regeneración (Mamidala & Nanna, 2011; Namitha & Pradeep, 2013; Sherkar & Chavan, 2014; Wayase & Shitole, 2014). Aun así, hoy en día se conoce muy poco acerca de las bases genéticas de la capacidad de regeneración. Profundizar en ellas sería de gran ayuda para mejorar la comprensión sobre los mecanismos inherentes a este proceso y, como consecuencia, aplicar estos conocimientos a la mejora de las metodologías que necesitan de la regeneración adventicia de plantas.

Uno de los factores que más puede influir en la capacidad de regeneración de un material es el tipo de explante. Evidentemente hay tipos celulares que tienen una mayor capacidad morfogénica. El descubrir en que explante están esos tipos celulares y permitir que expresen dicha capacidad es clave para tener éxito en estas metodologías. El caso de la regeneración a partir de explantes de arroz es un claro ejemplo de cómo se puede pasar de considerar a una especie recalcitrante (prácticamente era imposible regenerar plantas) a poder regenerar a partir de ella un gran número de plantas. Este cambio se produjo gracias a que unos investigadores encontraron el explante adecuado para este objetivo, en este caso, el escutelo (Hiei, Ohta, Komari, & Kumashiro, 1994).

2 OBJETIVOS

En nuestro grupo hemos utilizado diferentes técnicas de cultivo *in vitro* para la mejora genética del tomate (aprovechamiento de la variación somaclonal, hibridación interespecífica, transformación genética, etc.). Para eso es necesario poner a punto métodos de regeneración ajustados a cada variedad, técnica y tipo de explante utilizando, lo que permite trabajar de forma más eficiente con las técnicas de cultivo *in vitro*.

Por otra parte, estamos llevando a cabo trabajos para determinar cuáles son los genes clave que controlan el proceso de regeneración. La detección de algunos mutantes afectados en su capacidad morfogénica nos está permitiendo profundizar en el conocimiento de la regeneración adventicia en tomate.

Por todo ello planteamos los siguientes objetivos:

- Profundizar en el conocimiento de la capacidad de regeneración de diferentes genotipos de tomate, en distintos medios y partiendo de diversos tipos de explantes.
- Poner a punto un método de regeneración adecuado para la variedad Tomate de colgar con la que no hemos trabajado previamente en nuestro grupo.
- Analizar el patrón polisomático de los explantes de partida y su influencia en el nivel de ploidía de las plantas regeneradas para establecer las condiciones que permitan la regeneración de plantas diploides en el caso de querer minimizar la aparición de variación somaclonal.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

En el presente trabajo se han empleado tres variedades diferentes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.):

- Moneymaker: Esta variedad es de crecimiento indeterminado y sus frutos se comercializan para consumo en fresco. En nuestro grupo es el genotipo con el que más hemos trabajado para la obtención de plantas transgénicas.
- Micro-Tom: Esta variedad, muy utilizada en investigación, produce plantas enanas y de crecimiento determinado. El pequeño tamaño de la planta permite ser cultivada con altas densidades. Además, el tiempo de generación desde la siembra hasta la cosecha de semillas es más corto que el de otras variedades de tomate ya que en menos de tres meses se puede completar todo su ciclo (70-90 días).
- Tomate de colgar: Esta variedad debe su nombre a la forma de conservar los frutos tradicionalmente. Estos se cuelgan en lugares frescos y aireados con el objetivo de alargar su conservación. La planta es de crecimiento indeterminado y, en este caso, no tenemos experiencia previa de su comportamiento *in vitro*.

3.2 TIPOS DE EXPLANTES

En este trabajo se han utilizado cinco tipos de explantes: dos proceden directamente de plántulas obtenidas en condiciones axénicas, tras la germinación de semillas previamente esterilizadas y tres explantes proceden de plantas axénicas jóvenes, producto del crecimiento del ápice meristemático de la plántula cultivado en medio MB3.

Cotiledones proximal y distal

Estos explantes no se había probado previamente en nuestro grupo. Para su obtención, se separaron ambos cotiledones de la plántula y se desecharon sus extremos. La parte central del cotiledón se divide en cuatro explantes de tamaño similar mediante un corte longitudinal, por el nervio, y otro transversal. Los dos explantes más cercanos al ápice son los proximales y los más lejanos son los distales (Figura 5A y 5B).

Limbo de hoja

A partir del cultivo del ápice meristemático (Figura 5C) se obtuvo una planta axénica. A partir de este material se seleccionaron las hojas expandidas que no presentaban ningún daño. Se realizaron dos cortes transversales y otros dos longitudinales sobre el nervio central de la hoja a una distancia aproximada de 0,5 cm (Figura 5D).

Peciolulo de foliolo

En una hoja compuesta como la de tomate, el peciolulo es lo que une un foliolo al eje central de la hoja. Para obtener estos explantes se separó un foliolo del resto de la hoja y se realizó un corte a unos milímetros del raquis (Figura 5E).

Peciole de hoja

El peciole es la parte de la hoja que está entre el tallo y el limbo. Para este tipo de explante se realizaron cortes transversales, produciendo explantes de 4 mm de longitud aproximadamente (Figura 5F).

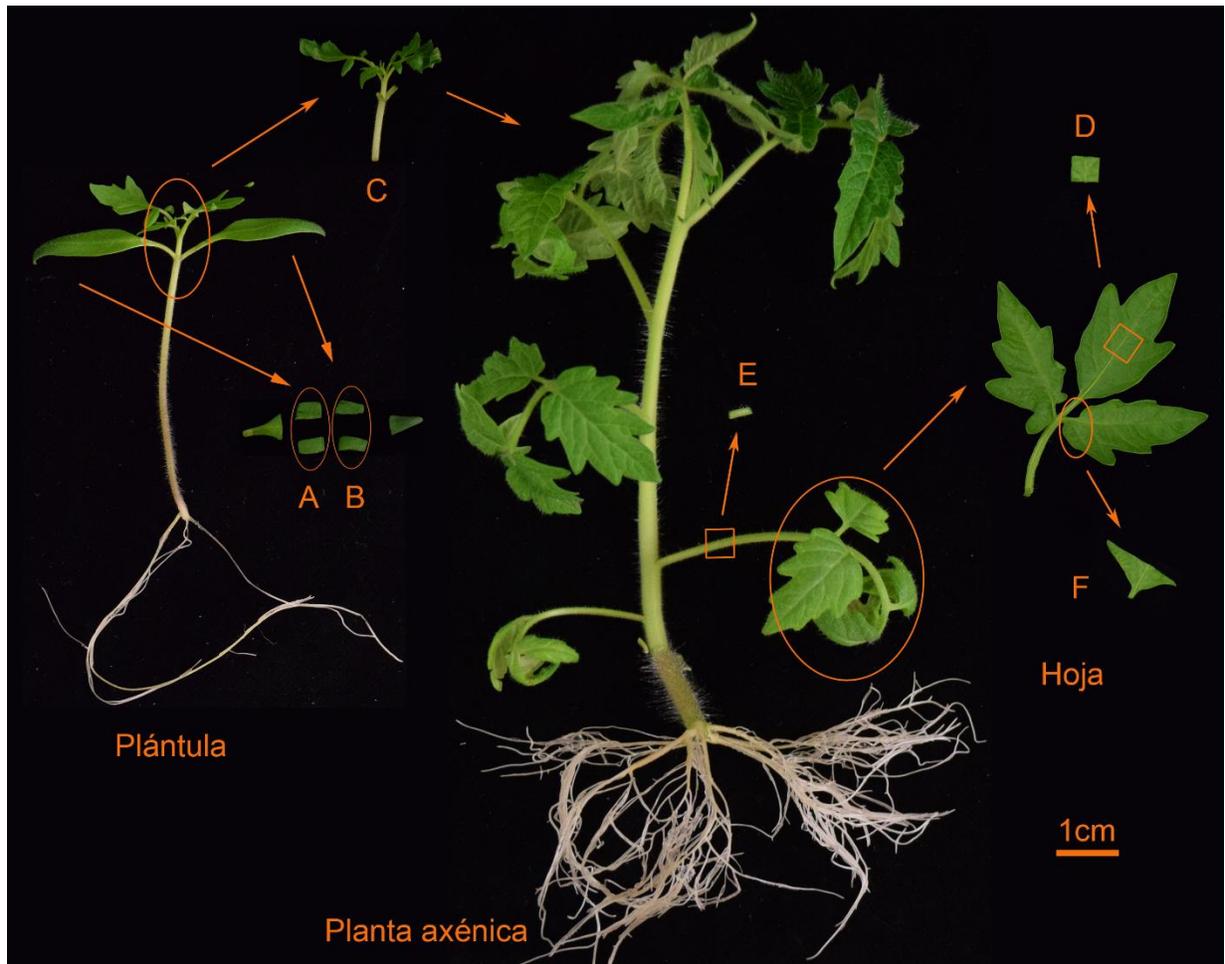


Figura 5: Esquema de la obtención de los tipos de explantes utilizados. A) Cotiledón proximal; B) Cotiledón distal; C) Ápice meristemático que se cultiva en medio MB3 para obtener una planta axénica de tomate; D) Limbo de hoja; E) Peciole de hoja; F) Peciolulo de foliolo

3.3 PREPARACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo empleados en este trabajo están compuestos por un medio base (MB3) que contiene sales minerales, sacarosa y vitaminas (Tabla 1).

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
<i>Sales minerales</i>	MS ^a
<i>Sacarosa</i>	30 g.L ⁻¹
<i>Inositol</i>	100 mg.L ⁻¹
<i>Tiamina clorhídrica</i>	1 mg.mL ⁻¹

Tabla 1: Componentes del medio base (MB3), utilizados en los ensayos de regeneración. ^a(Murashige & Skoog, 1962)

Se diluyen en agua desionizada los componentes previamente pesados. Una vez diluidos todos los componentes se ajusta el pH a 5,7 añadiendo HCl o KOH según convenga. Se reparte la disolución en matraces, se añaden 7 g.L⁻¹ de agar bacteriológico (Pronadisa®). Después de fundirlo, se distribuye en los recipientes asignados para el experimento y se esterilizan en el autoclave.

3.3.1 Medios organogénicos

Una vez preparado este medio base se le añaden concentraciones variables de distintos reguladores del crecimiento (auxinas y citoquininas). Se evaluaron 7 medios de cultivo diferentes donde variaba el tipo de regulador de crecimiento para inducir la respuesta morfogénica. Para ello se utilizaron medios en los que se adicionaron la auxina AIA con tres citoquininas, Kinetina (K), Zeatina (Z) y 6- benciladenina (B), combinadas o por separado y en diferentes concentraciones. La nomenclatura de los medios de cultivo hace alusión al tipo de hormonas y proporciones adicionadas (Tabla 2).

COMPONENTES (mg·L⁻¹)	MEDIO DE CULTIVO						
	IKZ 4,0 4,0 1,0	IKZ 2,0 2,0 1,0	IKZ 1,0 1,0 1,0	IKZ 0,5 0,5 1,0	IBZ 0,5 1,0 2,0	IB 0,5 2,0	IZ 1,0 1,0
<i>Ácido indolacético</i>	4,0	2,0	1,0	0,5	0,5	0,5	
<i>Kinetina</i>	4,0	2,0	1,0	0,5			
<i>Zeatina</i>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		1,0
<i>6-benciladenina</i>					2,0	2,0	1,0

Tabla 2: Composición en hormonal de los medios de cultivo utilizados en el ensayo de regeneración de tomate.

3.4 TÉCNICAS BÁSICAS DE CULTIVO *IN VITRO*

Para poder trabajar con las técnicas de cultivo *in vitro* es necesario crear un entorno libre de contaminación. Por ello, todo el material (instrumental y vegetal) utilizado en el experimento debe ser esterilizado según los protocolos establecidos. Además, es necesario trabajar en condiciones asépticas gracias al empleo de las cabinas de flujo laminar.

3.4.1 Trabajo en condiciones asépticas

La cabina de flujo laminar es un equipo que dispone de un ventilador que fuerza el paso de aire a través de un filtro HEPA o ULPA para eliminar todas las partículas de hasta 0,1 μm de tamaño. El aire filtrado se dirige hacia el panel frontal de la cabina, generando una corriente de aire estéril que va desde el interior al exterior y dificultando la entrada de contaminantes ambientales. Tanto la superficie como los frontales y laterales de la cabina se limpian antes de cada uso con etanol para mejorar las condiciones de esterilidad.

Para trabajar con el material vegetal sin contaminarlo, se precisan herramientas de acero inoxidable tales como bisturís y pinzas de diferentes tamaños que previamente han sido esterilizados mediante flameado. Este método consiste en introducir los instrumentos en un bote de vidrio con etanol al 96% y prenderlos con un mechero. Además, se utiliza papel de filtro que ha sido esterilizado en el autoclave (121°C durante 20 minutos) para poder manipular el material vegetal sin que se contamine (Figura 6).



Figura 6: Cabina de flujo laminar y superficie de trabajo con instrumental.

3.4.2 Esterilización de semillas

El material vegetal, en este caso las semillas de tomate, se deben esterilizar superficialmente. Primero, se prepara una disolución de hipoclorito sódico comercial al 50% con unas gotas de Tween 20 (agente tensoactivo que mejora el contacto entre el material vegetal y la disolución esterilizante). En la cabina de flujo laminar se sumergía las semillas en el bote que contenía la disolución esterilizante durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se pasaban las semillas a tres botes con agua desionizada estéril durante 5 minutos el primero, 10 minutos el segundo y 15 minutos el tercero. Tras haber eliminado la lejía las semillas se cultivaban en placas con dos discos de papel de filtro estéril y agua para su pregerminación.

3.4.3 Siembra y germinación

Las placas Petri que contenían las semillas esterilizadas se envolvían en papel de aluminio, dejándolas entre dos y tres días en una cámara a 28°C. Finalizado ese tiempo las semillas que habían emitido su radícula, es decir, habían comenzado a germinar, se sembraban en el medio de germinación (Tabla 3).

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
<i>Sales</i>	MS ^a
<i>Sacarosa</i>	10 g.L ⁻¹

Tabla 3: Componentes del medio de germinación, utilizados para la germinación de semillas. ^a(Murashige & Skoog, 1962)

3.4.4 Condiciones de crecimiento

Las semillas en medio de germinación se mantenían en la cámara de cultivo con iluminación. Esta cámara proporcionaba un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, una intensidad lumínica de 70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ aportada por tubos fluorescentes GRO-LUX y una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. En estas mismas condiciones se llevaron a cabo todos los experimentos del presente trabajo.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

En este trabajo se han realizado ensayos de regeneración para evaluar el desarrollo de callo desorganizado, yemas y brotes adventicios a partir de explantes sin meristemas preexistentes. Se han evaluado tres genotipos, siete medios de cultivo y cinco explantes diferentes (Figura 7). En cada una de esas 105 condiciones se han cultivado un mínimo de 30 explantes por condición en diferentes placas Petri.

3.5.1 Evaluación de la respuesta organogénica

Tras 30 días de cultivo en las placas se realizó la lectura del desarrollo de los explantes. El método de evaluación consistió en distinguir entre las tres fases que ocurren durante la regeneración adventicia mediante organogénesis: el crecimiento de callo desorganizado, la formación de yemas adventicias y el desarrollo de brotes a partir de ellas.

En primer lugar, se evaluó si habían desarrollado callo desorganizado. Este tipo de callo es producto del crecimiento y desdiferenciación de células en las zonas de corte de los explantes. Se distinguió por la formación de un tejido blanquecino sin estructuras definidas. En segundo lugar, se comprobó la existencia de callo organogénico, el cual comienza con la formación de las yemas adventicias. Éstas se caracterizan por la aparición de pequeñas zonas de color verde intenso en las zonas de corte o en los callos desorganizados originados a partir de éstos. Por último, los brotes adventicios, que surgen a partir de las yemas adventicias se caracterizan por ser estructuras completas (hojas y tallo elongado). En este caso se anotaban el número de

brotos que se había desarrollado en cada explante. Por último, como método adicional para evaluar el crecimiento global, se pesaron todos los explantes evaluados.

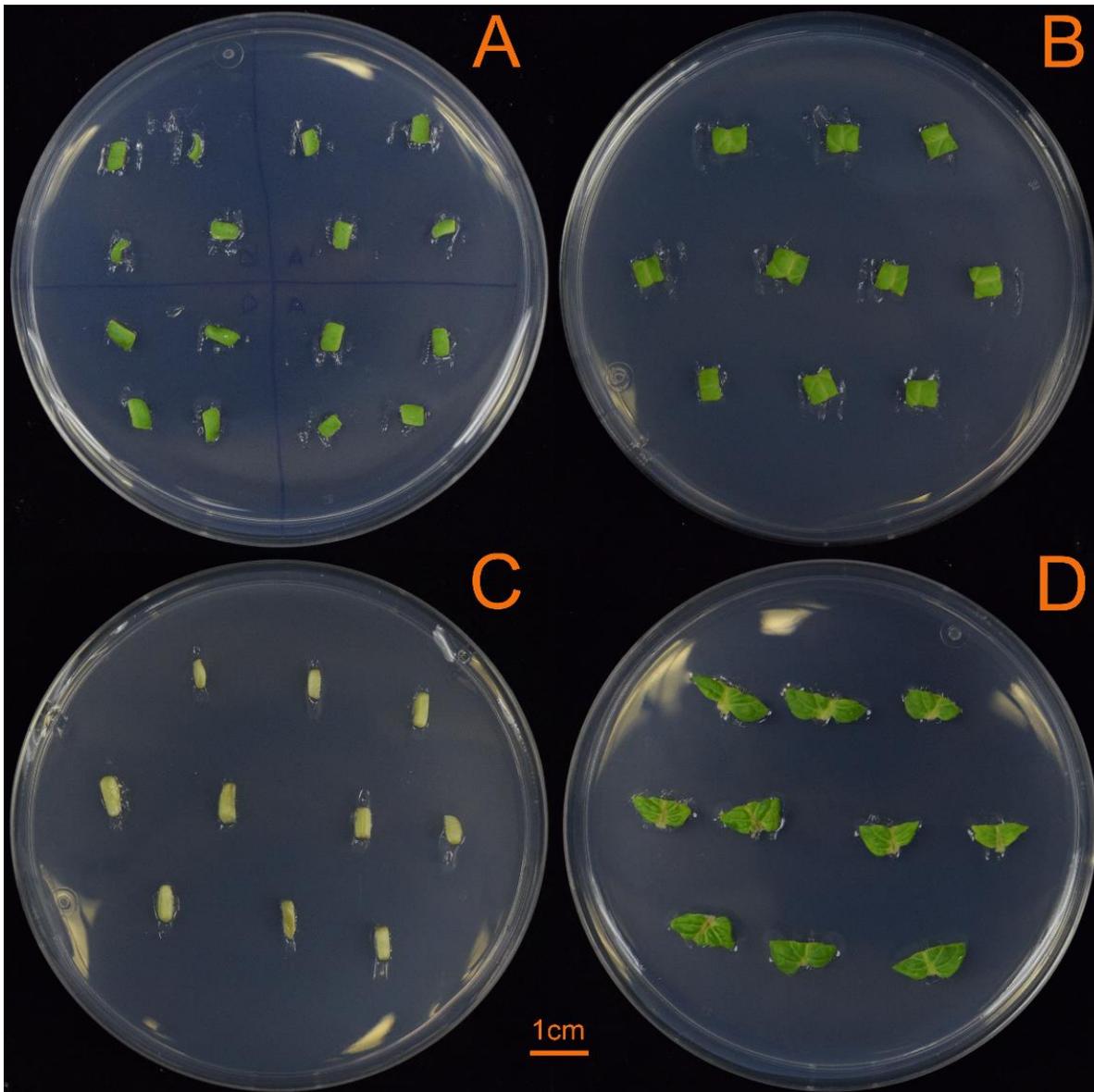


Figura 7: Diferentes tipos de explantes en placas Petri con medio organogénico. A) Explantes de cotiledón proximal y cotiledón distal; B) Explantes de limbo de hoja; C) Explantes de peciolo de hoja; D) Explantes de peciolulo.

3.6 ESTUDIO DE PATRÓN POLISOMÁTICO Y DEL NIVEL DE PLOIDÍA

En el presente trabajo se cuantificó mediante citometría de flujo el contenido de ADN nuclear de diferentes materiales siguiendo el método de Smulders (Smulders, Rus-Kortekaas, & Gilissen, 1994). Para ello, se trocea con una cuchilla el material vegetal a analizar en una placa Petri posteriormente se añade 200 μ L de tampón de extracción de núcleos (Nuclei extraction

solution, Partec, Münster, Germany). Las enzimas y detergentes de dicho tampón degradan las membranas celulares a excepción de la del núcleo. A continuación, se añaden 800 μL de una disolución 1 mgL^{-1} de DAPI (4,6-diaminofenilindol) (DAPI staining solution, Partec) para teñir los núcleos. La solución resultante se recoge y se filtra, utilizando filtros de nylon de $50 \mu\text{m}$ que permiten el paso de los núcleos celulares teñidos.

La suspensión de núcleos se introduce en el citómetro de flujo (Partec PA II Ploidy Analyser). Este equipo está provisto de una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366 nm de longitud de onda que es capaz de excitar el DAPI. Cada núcleo cruza individualmente por una cámara de cuarzo, recibiendo la excitación correspondiente y emitiendo luz, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de ADN del núcleo. Como el número de núcleos evaluados es muy elevado se utiliza el software del equipo para que represente los datos obtenidos a modo de histograma. En el eje de abscisas se representan las intensidades de luz, es decir, el contenido nuclear de ADN. En el eje de ordenadas se contabiliza el número de núcleos para cada rango de intensidades.

Como el equipo no proporciona medidas absolutas es necesario calibrarlo previamente, utilizando la muestra control para fijar el pico correspondiente al contenido de ADN 2C (diploide en fase G1). De esta forma se pueden determinar los picos de las poblaciones celulares 2C, 4C, 8C, etc. Tras el calibrado se analizan las muestras problema.

3.6.1 Estudio del patrón polisomático del material de partida

Se analizaron los patrones polisomáticos de los explantes procedentes de las plántulas para cada genotipo. Para este estudio se utilizaron plántulas de 7 días contando desde su siembra. Se analizaron cinco muestras biológicas de cada condición. En cada una de ellas se evaluó el contenido de ADN de, al menos 5000 núcleos celulares

3.6.2 Estudio del nivel de ploidía de las plantas regeneradas

Tras la regeneración de brotes a partir de explantes de cotiledón se determinó su nivel de ploidía. Estos brotes se individualizaron del callo y se subcultivaron en medio IK para que elongasen y se analizó una hoja joven de cada una de ellas con el citómetro de flujo.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ORGANOGÉNICA DEL TOMATE

Para poder determinar la capacidad organogénica y disponer de un protocolo de regeneración, es necesario analizar diversas variables como el genotipo, el tipo de explante y el medio de cultivo empleado. Por ello se cultivaron para cada genotipo (Moneymaker, Micro-Tom y Tomate de colgar), cinco tipos de explantes (cotiledón distal y proximal, peciolo, peciolulo y limbo) en siete medios de cultivo diferentes donde se variaron los reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas).

4.1.1 Esterilización y germinación de semillas de tomate

Para este trabajo se han esterilizado cerca de 1600 semillas de tomate en cinco series de esterilización de tres variedades diferentes (Money Maker, Micro-Tom y Tomate de colgar). De todas ellas se ha calculado el porcentaje de contaminación y el porcentaje de germinación de las semillas no contaminadas.

La tasa de contaminación detectada en este proceso fue inferior al 5% para todas las variedades empleadas, por lo que se puede concluir que la metodología empleada es válida para esterilizar el material de partida.

El protocolo de germinación seguido para las tres variedades dio lugar a valores normales en las variedades Money Maker y Micro-Tom, obteniendo una tasa superior al 85%. Para Tomate de colgar, la tasa de germinación fue algo menor, situándose en el 65 - 70%, debido a que estas semillas procedían de una casa comercial cuyas condiciones de conservación son desconocidas. Condiciones similares de conservación y tiempos de las semillas dan lugar a tasas de germinación similares, por lo que en futuros estudios con esta variedad será mejor disponer de semillas conservadas y obtenidas de igual modo que las demás variedades. No obstante, las tasas obtenidas permiten considerar como adecuado el protocolo empleado.

Gracias a la experiencia previa que se tenía en algunas de estas líneas, se decidió que el estado ontogénico (etapa del desarrollo de la plántula) en el que se iban a obtener los explantes de cotiledón e hipocótilo era el de plántulas con siete días desde su siembra.

4.1.2 Evaluación de la eficacia organogénica del tomate

Durante los primeros días se observó como los explantes engrosaron y comenzaron la formación de un callo desorganizado en las zonas donde se realizó el corte. Entre la segunda y tercera semana ocurrió la formación de las primeras yemas adventicias en los callos organogénicos que posteriormente dieron lugar a los brotes. Finalmente, al mes del cultivo, los brotes desarrollados alcanzaron un tamaño óptimo de individualización (Figura 8).

Se evaluaron un total de 3444 explantes transcurridos 30 días desde la fecha de su siembra. Para cada agrupación, se calculó el porcentaje de explantes que no desarrollaron ningún tipo de crecimiento, el porcentaje de explantes que desarrollaron únicamente callo desorganizado y

el porcentaje de explantes que además de callo desorganizado desarrollaron crecimiento organogénico (yema, ápice o brote).

Un explante se define como organogénico cuando es capaz de formar algún tipo de estructura organogénica (yema, ápice o brote). La combinación de estas dos tasas (tasa de formación de callo desorganizado y tasa de regeneración de callo organogénico) nos ayuda a identificar qué tipo de explantes o medio de cultivo es más eficaz para cada genotipo.

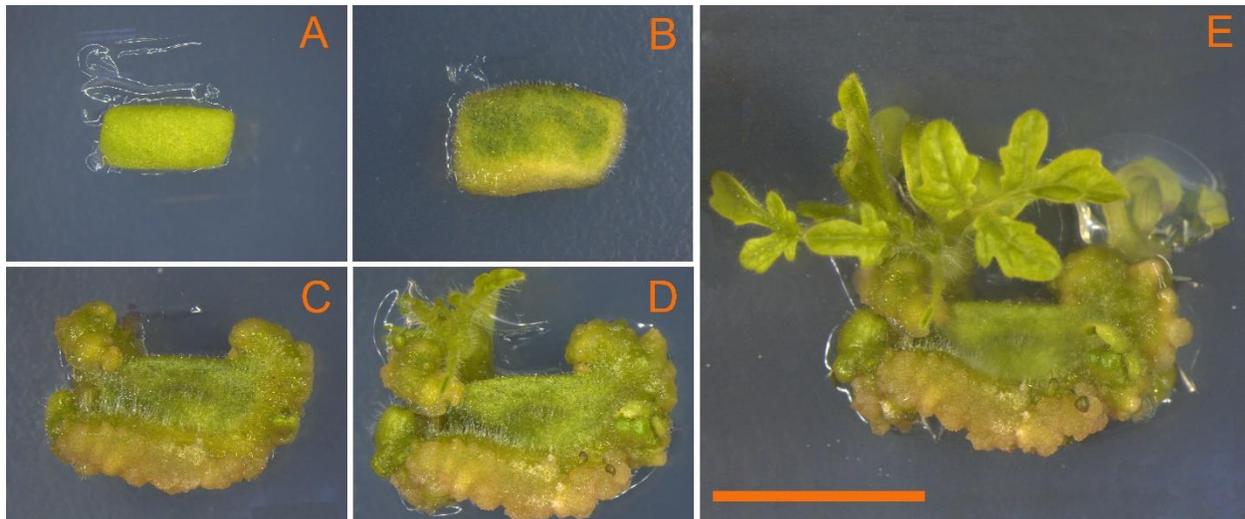


Figura 8: Evolución de un explante de cotiledón proximal del genotipo Money Maker en medio organogénico. A) Inicio del cultivo, B) Tras una semana de cultivo, C) Tras dos semanas de cultivo, D) Tras tres semanas de cultivo, E) Tras cuatro semanas de cultivo. La barra representa un centímetro.

4.1.2.1 Eficacia de regeneración en función del genotipo

La agrupación por genotipo destacó que la tasa de regeneración de callo desorganizado fue muy elevada, superando en los tres genotipos el 99%.

Por otro lado, Tomate de colgar fue el genotipo más organogénico, con un 98,9% de explantes que, además de callo desorganizado, desarrollaron organogénesis. Le siguieron Moneymaker (95,0%) y Micro-Tom (92,4%) (Figura 9).

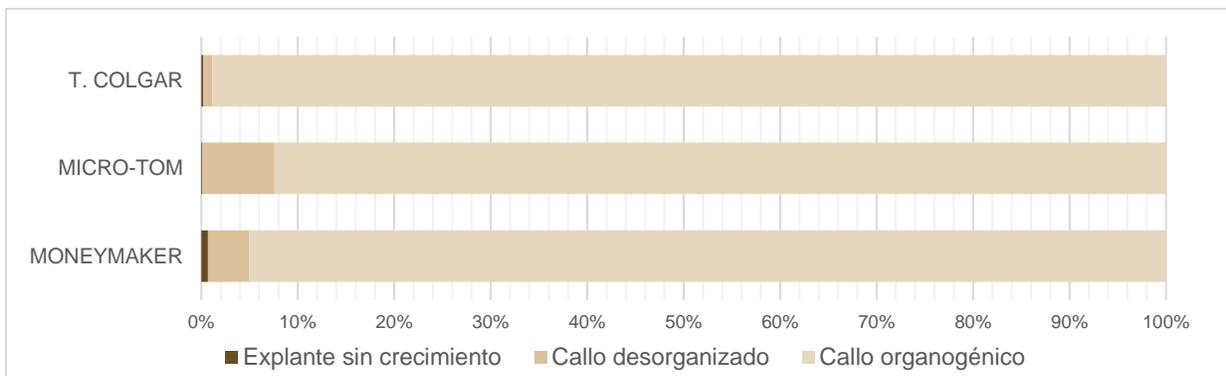


Figura 9: Eficacia de regeneración en función del genotipo.

4.1.2.2 Eficacia de regeneración en función del tipo de explante.

Es importante analizar los resultados como dos bloques diferentes. En primer lugar, se compararon los explantes de cotiledones (proximal y distal), por tener su origen en la plántula y, en segundo lugar, los explantes que tienen su origen en la hoja de una planta axénica (peciolo, peciolulo y limbo).

4.1.2.2.1 Eficacia de regeneración en función del tipo de explante de cotiledón

En este estudio se analizaron 1344 explantes de cotiledón con el fin de obtener información sobre si hay correlación entre la eficacia de regeneración y el tipo de explante de cotiledón empleado, ya que, como se ha comentado con anterioridad, este tipo de explante de cotiledón se ha llevado a cabo por primera vez en nuestro departamento.

Los resultados fueron muy similares. El cotiledón proximal es el que mayor número de explantes con desarrollo desorganizado obtuvo, llegando al 100%, frente al 99,8% del cotiledón distal. Por otra parte la eficacia de regeneración también fue muy elevada. El cotiledón proximal fue ligeramente más eficaz, obteniendo un 99,7% de explantes con organogénesis, frente al cotiledón distal que produjo estructuras organogénicas en el 98,8% de los explantes evaluados (Figura 10).

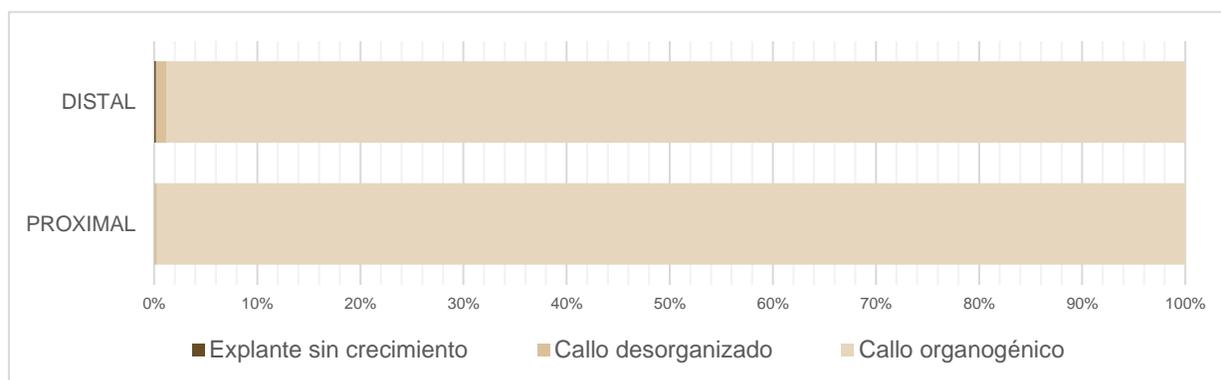


Figura 10: Eficacia de regeneración en función del tipo de explante de cotiledón.

Agrupación por tipo de explante de cotiledón y genotipo

Micro-Tom fue el genotipo que desarrolló mayor tasa de explantes organogénicos de cotiledón, tanto proximal como distal, logrando el 100% de ambos. La tasa de regeneración de callo desorganizado para Tomate de colgar fue del 100% en ambos tipos, aunque el más eficaz desarrollando callo organogénico fue el cotiledón proximal con el 99,1%. En Money Maker el cotiledón proximal mostró mayor tasa de regeneración de callo desorganizado, con un 99,7%. Además, este tipo de explante fue el más eficaz en el desarrollo de callo organogénico con un 98,6%. En resumen, aunque las tasas de regeneración fueron muy elevadas en todas las condiciones estudiadas, el cotiledón proximal, al igual que ocurría de manera conjunta, es el tipo de explante que mayores tasas de regeneración obtuvo en los tres genotipos analizados (Figura 11).

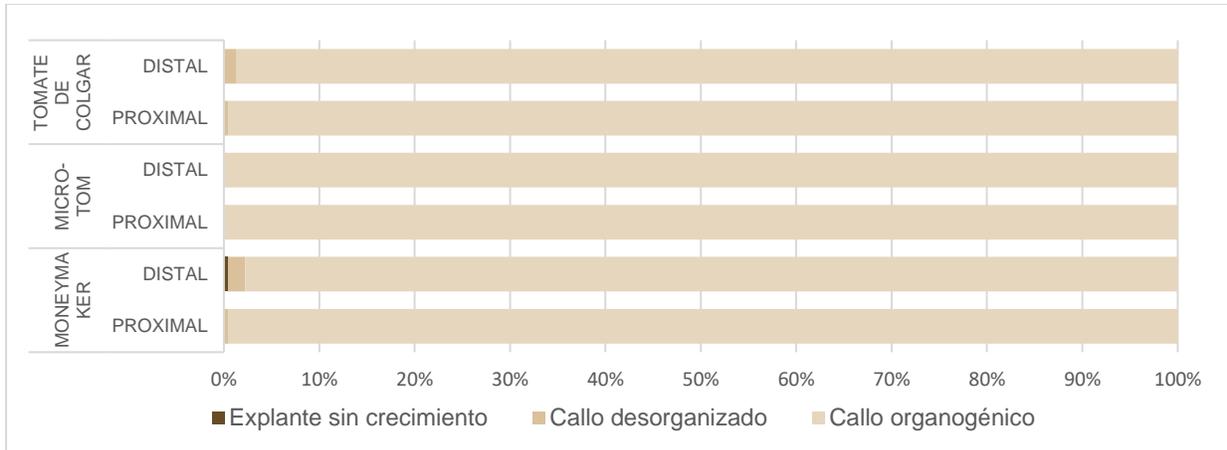


Figura 11: Eficacia de regeneración en función del tipo de explante de cotiledón y genotipo.

Las diferencias en la capacidad morfogenética entre explantes diferentes de una misma variedad podrían tener dos explicaciones: la presencia de tipos celulares con mayor capacidad de morfogénesis o una concentración de hormonas endógenas diferencial entre los explantes analizados.

4.1.2.2.2 Eficacia de regeneración en función del tipo de explante de hoja

Se analizaron 2100 explantes de hoja de planta axénica (peciolo, peciolulo y limbo). De ellos, el que presentó mayor tasa de desarrollo de callo desorganizado fue el de peciolulo con un 100%, seguido de peciolo con un 99.3% y por último de limbo con un 99.2%.

Las tasas de regeneración de callo organogénico obtenidas también fueron muy elevadas, siendo el más eficaz el peciolo, con un 96% de sus explantes desarrollando alguna estructura organogénica, muy seguido por el peciolulo con un 95% y, por último, el limbo con un 89% (Figura 12).

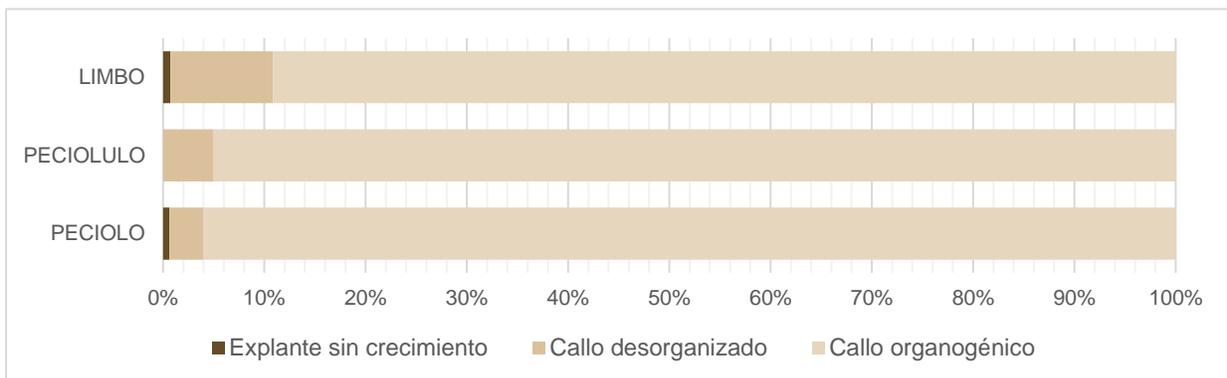


Figura 12: Eficacia de regeneración en función del tipo de explante de hoja.

Estas tasas de regeneración fueron mayores que las obtenidas en estudios anteriores, donde se analizaron seis tipos diferentes de explantes en trece genotipos de tomate diferentes a los nuestros. La eficacia del peciolo no superó el 60% y la del limbo osciló entre el 3% y el 100%

(Gubis, Lajchova, Farago, & Jurekova, 2003). De nuevo se puede observar la gran influencia que tiene el genotipo del material de partida en este tipo de respuestas.

Por otro lado, cabe destacar el resultado del peciolulo, el cual fue el más eficaz de los tres tipos de explante de hoja y, sin embargo, no se han encontrado estudios previos donde se emplee en tomate. Esto muestra la importancia de estudios como el actual, ya que nuevos tipos de explante pueden lograr mejoras significativas respecto a metodologías anteriores.

Agrupación por tipo de explante de hoja y genotipo

En cuanto a los explantes de hoja, el comportamiento observado fue diferente para cada genotipo (Figura 13). Micro-Tom fue el que obtuvo mayores tasas de formación de callo desorganizado en estos tres tipos de explantes, siendo del 100% tanto en el peciolo como en el peciolulo y del 99,6% en el limbo. Tomate de colgar obtuvo también tasas muy altas, logrando el 100% en peciolulo y el 99,6 en peciolo y limbo. Las tasas obtenidas para Money Maker fueron ligeramente inferiores en comparación con los otros genotipos, aunque siempre superiores al 98%.

En cuanto a la tasa de organogénesis, Tomate de colgar fue el que presentó mejor comportamiento. Además, las tasas fueron muy similares entre los tres tipos de explantes, casi alcanzando el 99% en los tres casos. Algo inferiores fueron los resultados de Money Maker, cuyas tasas de organogénesis rondaron entre el 91% para peciolo y limbo y el 95% para peciolulo. Por último, Micro-Tom fue el que peores resultados obtuvo entre los diferentes tipos de explantes, siendo el peciolo el más eficaz con un 97%, seguido de peciolulo con un 95% y de limbo con un 77% de explantes organogénicos.

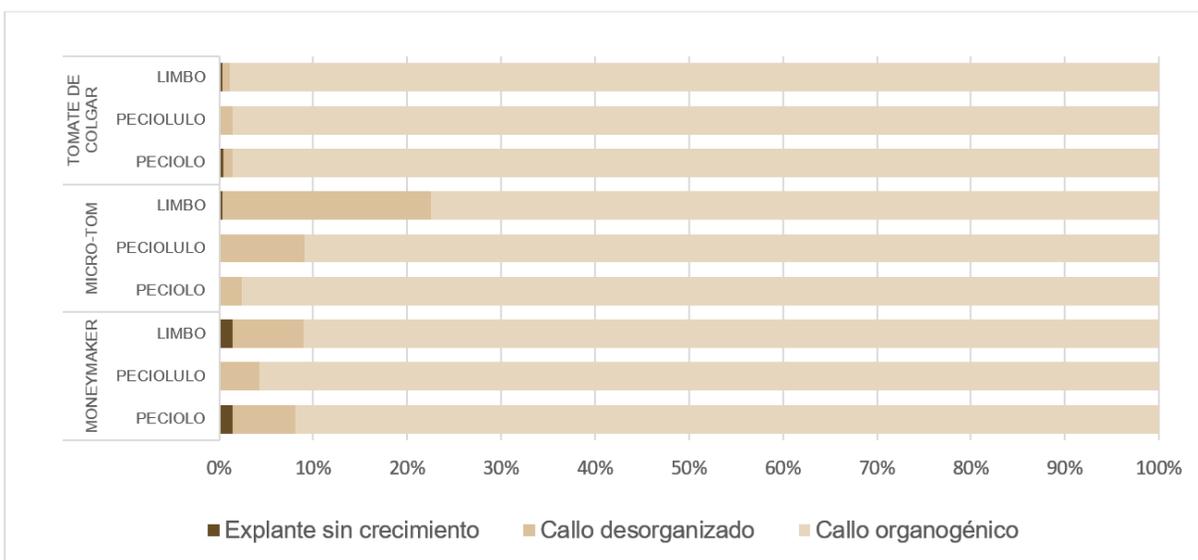


Figura 13: Eficacia de regeneración en función del tipo de explante de hoja y genotipo.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio indicaron que los cotiledones fueron los explantes que mejor se comportaron en los tres genotipos, seguidos del peciolulo y el peciolo. Otros estudios también hallaron variaciones en la tasa de regeneración dependiendo del

genotipo (Nandakumar, Ivanava, & Guseva, 1991; Ruiju, Jianhua, Yuefang, & Runmei, 1997) y del tipo de explante (Düzyaman, Tanrisever, & Guenver, 1993). En nuestro caso, las tasas de regeneración en los tres genotipos y en los cinco explantes analizados resultaron suficientemente elevadas para trabajar con ellos en diversas técnicas de cultivo *in vitro*.

4.1.2.3 Eficacia de regeneración en función del medio de cultivo

Los resultados obtenidos mostraron altas tasas de formación de callo desorganizado y de regeneración en todos los casos. De hecho en todas las condiciones se superó el 90% de eficacia de regeneración. Los valores de formación de organogénesis fueron muy similares en todos los medios, siendo el más organogénico el IZ 0,5 1,0 que logró que el 99% de los explantes desarrollaran callo organogénico. Por contra, el medio de cultivo menos eficaz con un 92% fue IB 0,5 2,0 (Figura 14).

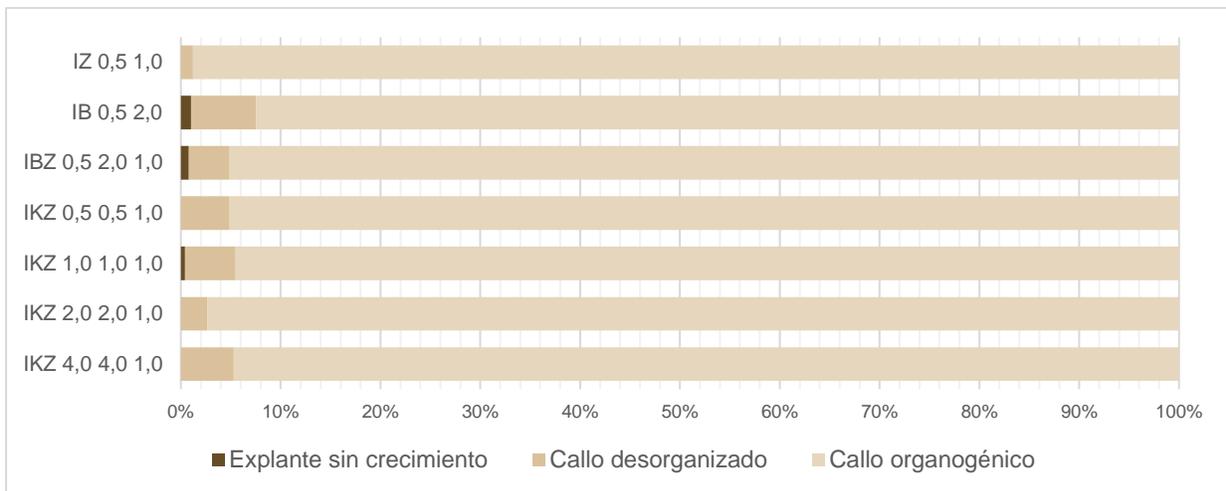


Figura 14: Eficacia de regeneración en función del medio de cultivo.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en numerosos estudios, donde concluyen que, empleando medios de cultivo que contengan alta concentración de citoquininas y niveles moderados de auxinas, es muy posible inducir la formación de callo organogénico (Gubis et al., 2003; Hille, Koornneef, Ramanna, & Zabel, 1989; Park, Morris, Park, Hirschi, & Smith, 2003; Raj, Singh, Pandey, & Singh, 2005).

Agrupación por medio de cultivo y genotipo

Los resultados de este estudio para el genotipo Money Maker demostraron que los medios que mayores tasas de regeneración de callo organogénico obtenían eran IKZ 2,0 2,0 1,0 e IKZ 0,5 0,5 1,0, cuyas tasas alcanzaron el 100%. Estos medios funcionaron igual de bien que el medio de referencia para este cultivar que se empleaba hasta ahora en este genotipo, el IKZ 4,0 4,0 1,0.

Estos datos son similares a los obtenidos en otros estudios donde se consiguió una mayor tasa de regeneración cuando se combinaron ácido indolacético y kinetina con zeatina (Fuentes, Soto, Alfonso, & Oramas, 1998).

Sin embargo, con el genotipo Micro-Tom los resultados obtenidos reflejaron que aquellos medios que contenían kinetina obtenían peores resultados que aquellos medios que no la contenían. De hecho, el medio IZ 0,5 1,0 fue el que obtuvo la mayor tasa de regeneración de callo organogénico.

Por último, en Tomate de colgar el comportamiento fue excelente en todos los medios, destacando el 100% de eficacia en IBZ 0,5 2,0 1,0 (Figura 15).

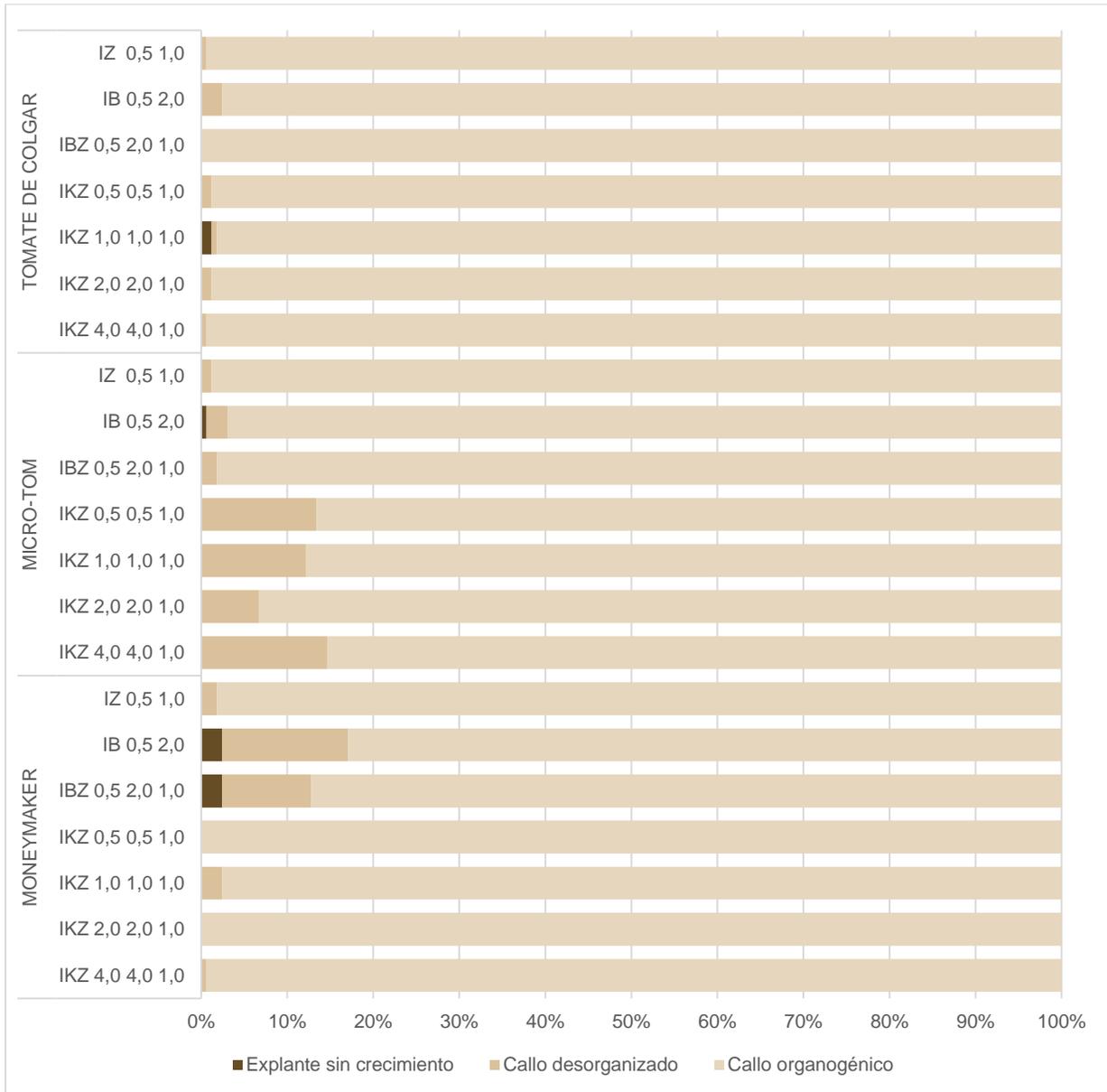


Figura 15: Eficacia de regeneración en función del medio de cultivo y genotipo.

4.1.3 Evaluación de la capacidad de formación de brotes adventicios del tomate

Como se ha comentado en el apartado anterior, un explante con callo organogénico puede regenerar yemas, ápices o brotes adventicios. Es por ello que, para establecer un protocolo de

regeneración, es necesario conocer la capacidad que tienen los explantes de generar brotes adventicios ya que es la fase final del proceso y lo que permite, en último término, obtener una planta completa a partir del callo organogénico. Conociendo esta información, se puede estimar cuántos explantes serían necesarios cultivar para obtener un número deseado de plantas. Esta variable se determinó como el número de brotes por explante cultivado. Además, se calculó la misma variable, pero teniendo en cuenta únicamente los explantes organogénicos que habían generado brotes adventicios. La combinación de ambas variables determina la capacidad de formación de brotes y el tipo de callo organogénico que se obtiene, es decir, si un callo organogénico produce muchos o pocos brotes.

4.1.3.1 Capacidad de formación de brotes por genotipo

Tras analizar los 3444 explantes totales en este estudio, se apreció la influencia del genotipo en la capacidad de formación de brotes. El genotipo que logró más brotes por explante cultivado fue Micro-Tom (casi 6 de cada 10), seguido de Tomate de colgar y Money Maker. Micro-Tom también obtuvo el mayor número de brotes por explante organogénico (Figura 16).

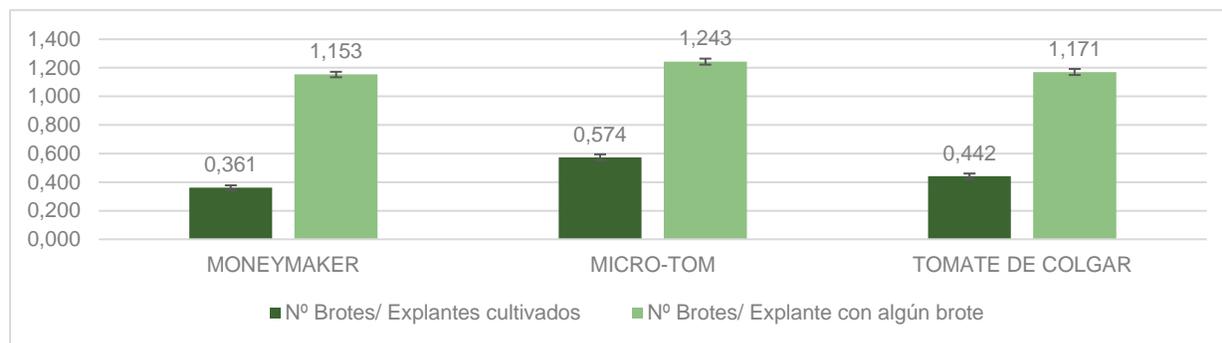


Figura 16: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con algún brote. La barra muestra el error estándar.

Aunque en el apartado anterior resultó ser Micro-Tom el genotipo menos eficaz en la formación de callo organogénico, sin embargo, es el que mayor capacidad de regeneración de brotes obtuvo tras 30 días de cultivo. Este hecho se puede explicar por el mayor ritmo de crecimiento de Micro-Tom. En un mismo periodo de tiempo, un genotipo con la misma eficacia de regeneración que otro, pero con mayor ritmo de crecimiento de sus estructuras organogénicas desarrollará brotes antes y por tanto dará unos valores superiores de las variables aquí analizadas.

4.1.3.2 Capacidad de formación de brotes por tipo de explante

4.1.3.2.1 Capacidad de formación de brotes en función del tipo de explante de cotiledón

Tras analizar la eficacia de regeneración de los explantes de cotiledón, se calculó la capacidad que tienen de regenerar brotes adventicios. Al igual que pasara en el apartado anterior, el cotiledón proximal, aunque por poco, fue el que mayor capacidad de formación de brotes obtuvo (Figura 17).

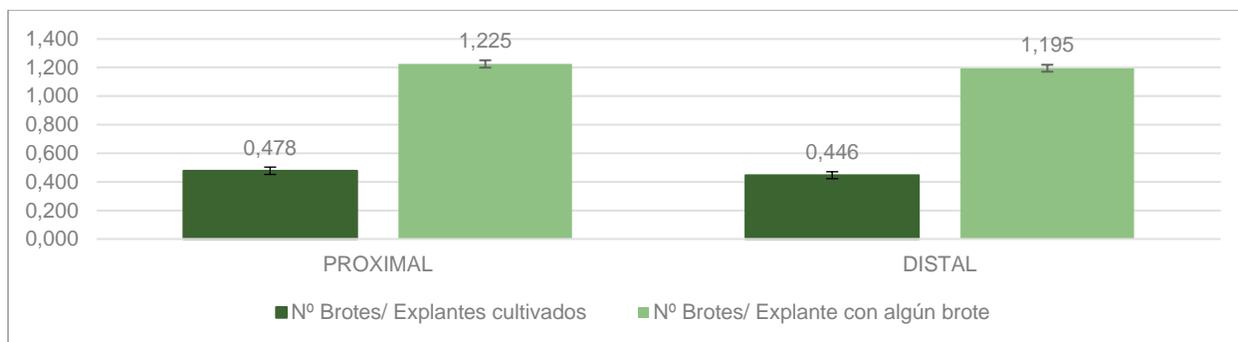


Figura 17: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para explantes de cotiledón. La barra muestra el error estándar.

Este resultado demuestra la importancia de la elección del explante cuando se busca la mayor capacidad posible de regeneración de brotes. De hecho, en nuestro laboratorio, para algunos genotipos ya se emplea únicamente los cotiledones proximales, descartando los distales.

Agrupación por tipo de explante de cotiledón y genotipo

Micro-Tom obtuvo la mayor capacidad regenerativa de los tres. Para este genotipo, el cotiledón proximal logró el mejor resultado (7 de cada 10 explantes cultivados desarrollaron brotes adventicios). Money Maker y Tomate de colgar no mostraron grandes diferencias en la capacidad regenerativa entre los cotiledones proximal y distal (Figura 18).

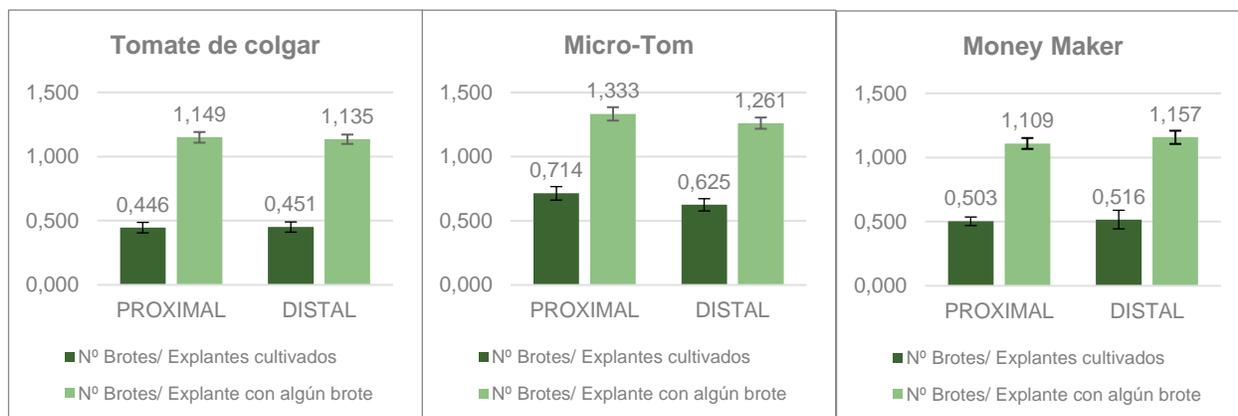


Figura 18: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para cada genotipo. La barra muestra el error estándar.

4.1.3.2.2 Capacidad de formación de brotes en función del tipo de explante de hoja

En cuanto a los resultados obtenidos de los explantes procedentes de hoja de planta axénica, el peciolo fue el de mayor capacidad regenerativa. Este explante consiguió regenerar 5 brotes por cada 10 explantes cultivados. Además, fue el explante más prolífero de los tres, obteniendo el mayor número de brotes adventicios por explante organogénico (Figura 19).

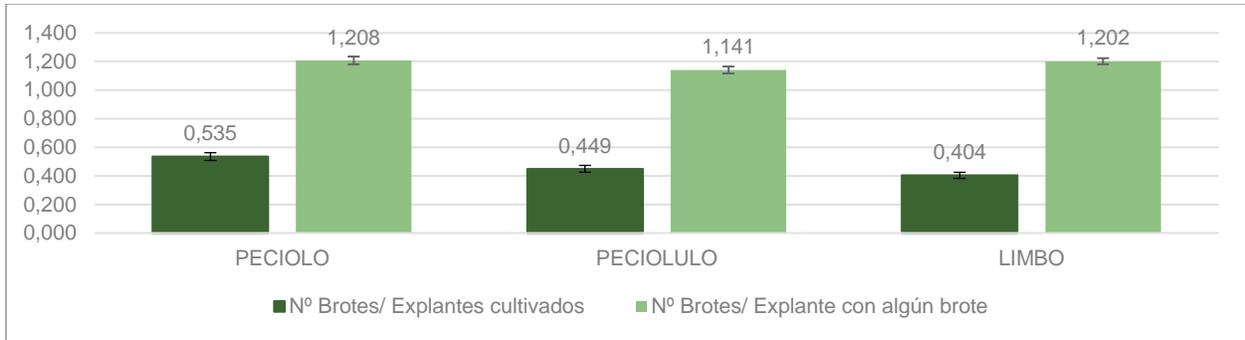


Figura 19: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para explantes de hoja de planta axénica. La barra muestra el error estándar.

Agrupación por tipo de explante de hoja y genotipo

El análisis individualizado de cada genotipo en función del tipo de explante reveló que para Money Maker el explante de mayor capacidad regenerativa fue el peciolulo y el limbo con más de 4 brotes por cada 10 explantes cultivados (Figura 20).



Figura 20: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para explantes de hoja del genotipo Money maker. La barra muestra el error estándar.

En el caso del genotipo Micro-Tom destaca la alta tasa obtenida en la capacidad de formación de brotes, pues se alcanzaron valores muy superiores en comparación con los otros dos genotipos. El peciolo es el que mejores resultados obtuvo y duplicó el valor de Money Maker alcanzando los 8 brotes por cada 10 explantes cultivados (Figura 21).



Figura 21: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para explantes de hoja del genotipo Micro-Tom. La barra muestra el error estándar.

Estos resultados se pueden deber a que Micro-Tom tiene mayor velocidad de desarrollo que los otros genotipos de este estudio. Al establecer un tiempo de estudio de 30 días, el de mayor velocidad de desarrollo presentó un mayor número de brotes. Sin embargo, eso no quiere decir que los demás genotipos no pudieran alcanzar tasas parecidas si estableciéramos un periodo más largo de estudio.

En el Tomate de colgar el explante que mayor capacidad de formación de brotes presentó fue el limbo, que por cada 10 explantes cultivados se obtuvieron 5 brotes adventicios (Figura 22).



Figura 22: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio, para explantes de hoja del genotipo Tomate de colgar. La barra muestra el error estándar.

Al contrario de lo que pasó con los demás genotipos, este explante no resultó ser el más eficaz en la regeneración de callo organogénico, pero sin embargo fue el de mayor capacidad de formación de brotes adventicios. Este resultado es importante para entender que para poner a punto un método de regeneración es necesario tener en cuenta todas las variables. No es suficiente con encontrar el tipo explante más eficaz en la formación de callo organogénico, sino que, además, éste debe tener una alta capacidad de formación de brotes adventicios.

4.1.3.3 Capacidad de formación de brotes para cada genotipo en función del medio de cultivo

Se analizaron 492 explantes por cada medio de cultivo. El que propició una mayor capacidad de formación de brotes fue el IZ 0,5 1,0, con casi 6 brotes por cada 10 explantes cultivados. En general, los medios que contenían kinetina lograron resultados similares. Los que contenían 6-benciladenina (IBZ 0,5 2,0 1,0 e IB 0,5 2,0) obtuvieron tasas algo inferiores al resto (Figura 23).

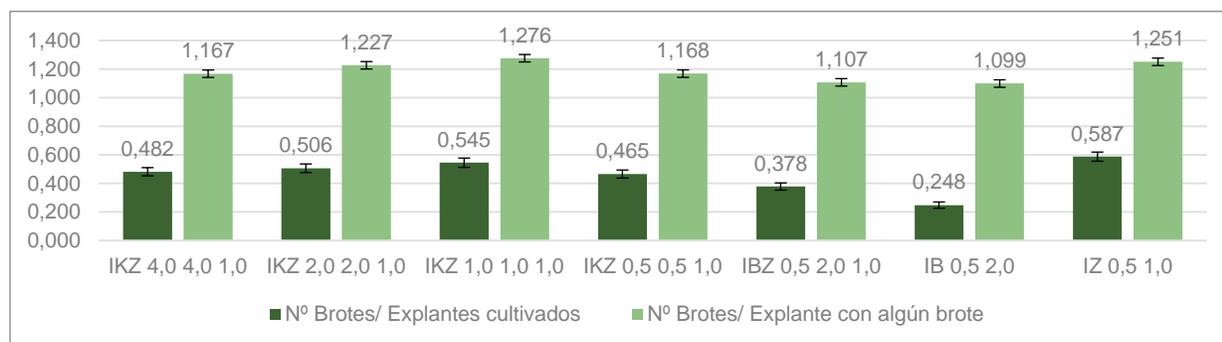


Figura 23: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio en función del medio de cultivo. La barra muestra el error estándar.

Estos datos generales nos aportan información sobre la tendencia de cada medio para regenerar brotes. Aun así, es necesario agrupar los resultados por genotipo si se quieren mejorar las metodologías actuales o poner a punto nuevos protocolos.

Agrupación por medio de cultivo y genotipo

Para Money Maker el medio de cultivo con mejor respuesta fue IKZ 4,0 4,0 1,0 con 5 brotes por cada 10 explantes cultivados y más de un brote y medio por cada callo organogénico que da brotes. Asimismo, este medio fue el más prolífero de los siete (Figura 24). Como se ha mencionado anteriormente, éste es el medio empleado en nuestro laboratorio para la regeneración de este genotipo por lo que se confirma que son unas condiciones excelentes para la morfogénesis de esta accesión. Además, en este estudio se buscaba encontrar las mejores condiciones de regeneración para los genotipos Micro-Tom y Tomate de colgar.

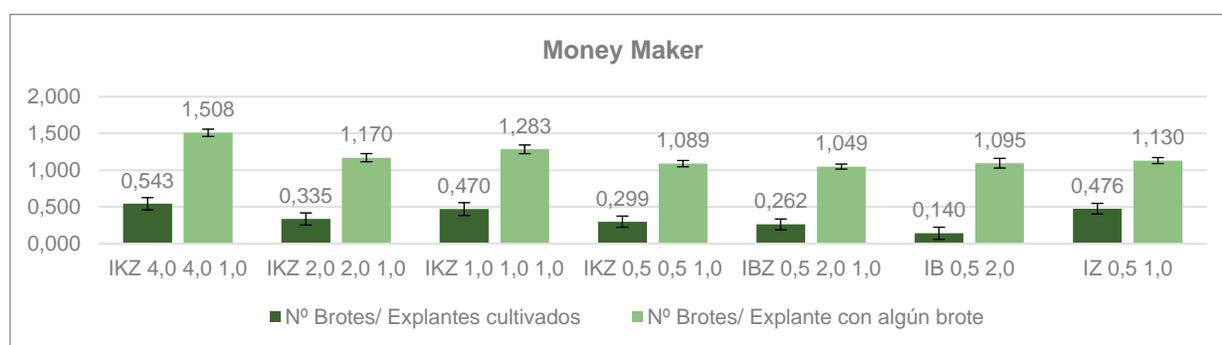


Figura 24: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio en función del medio de cultivo para Moneymaker. La barra muestra el error estándar.

El medio de cultivo con mayor capacidad de formación de brotes para Micro-Tom fue IZ 0,5 1,0, logrando una tasa muy elevada. Tras 30 días, 9 de cada 10 explantes cultivados en este medio regeneraron algún brote. Además, este medio obtuvo más brotes por explante con algún brote que el resto, casi 1,4 (Figura 25).

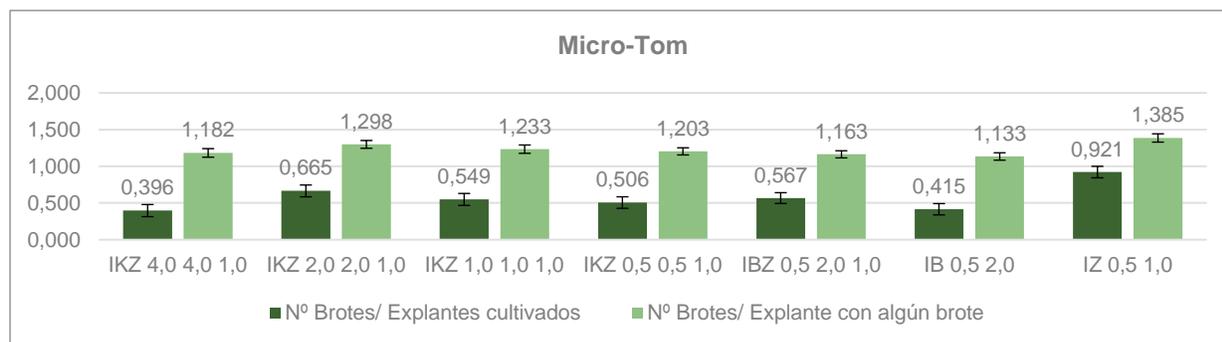


Figura 25: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio en función del medio de cultivo para Micro-Tom. La barra muestra el error estándar.

Por último, para Tomate de colgar, el medio de cultivo con mayor capacidad de formación de brotes fue IKZ 1,0 1,0 1,0, con 6 brotes por cada 10 explantes cultivados. Este medio mostró

también el mayor número de brotes por explante organogénico con algún brote, más de 1,3 (Figura 26).

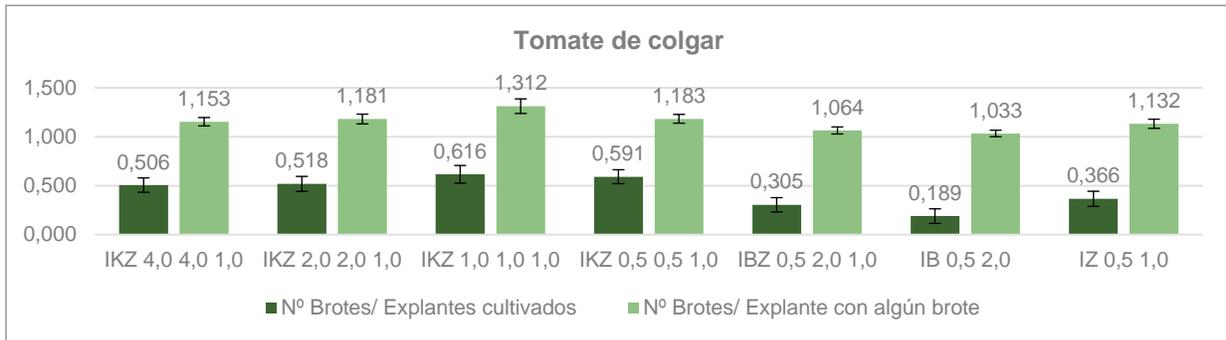


Figura 26: Número de brotes por explante cultivado y por explante organogénico con al menos un brote adventicio en función del medio de cultivo para Tomate de colgar. La barra muestra el error estándar.

Recordemos que el medio IBZ 0,5 2,0 1,0 fue el más eficaz para este genotipo, logrando que el 100% de los explantes desarrollaran callo organogénico. Sin embargo, fue uno de los medios de cultivo que menor capacidad de formación de brotes presentó, pues sólo logró 3 brotes por cada 10 explantes cultivados. De nuevo hay que resaltar la importancia de analizar tanto la eficacia de regeneración como la capacidad de formación de brotes.

4.2 ANÁLISIS DEL PATRÓN POLISOMÁTICO DE LOS EXPLANTES DE PARTIDA Y SU INFLUENCIA EN EL NIVEL DE PLOIDÍA DE LAS PLANTAS REGENERADAS

En anteriores trabajos desarrollados por nuestro grupo y por otros autores en diferentes especies (melón, sandía, pepino e incluso tomate), se ha visto que en diversos tejidos se pueden encontrar células que han sufrido el proceso de endorreduplicación. Este proceso, que ocurre principalmente en tejidos que necesitan un gran crecimiento en un corto periodo de tiempo, consiste en la duplicación de material cromosómico (Fase G2) de una célula sin que llegue a ocurrir la división celular en uno o más ciclos celulares. Como consecuencia, este material cromosómico se duplica dando células que pasan de tener 2 complementos cromosómicos a 4, de 4 a 8 y así sucesivamente dependiendo de las veces que se produzca este fenómeno. A modo de ilustración de cómo se detectan estos fenómenos de endorreduplicación (Figura 27).

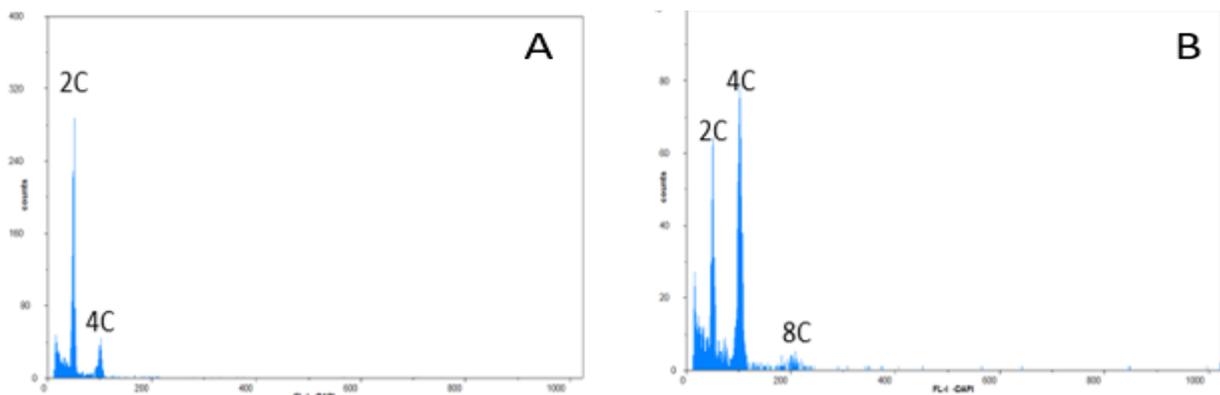


Figura 27: Patrón polisomático de explantes que tienen su origen en una planta diploide que no presenta fenómeno de endorreduplicación (A) y sí presenta endorreduplicación (B). En cada gráfica está representado al menos 5000 núcleos celulares.

Se han seleccionado dos histogramas obtenidos de un citómetro de flujo al analizar dos muestras una sin (Figura A) y otra con (Figura B) endorreducción. En la gráfica A, se ven dos picos, el más pronunciado (2C) corresponde a la población de células diploides en fase G1 mientras que el otro (4C) corresponde a la población de células diploides en fase G2. En la gráfica B, aparecen tres picos. El primer pico (2C) corresponde, al igual que en la anterior gráfica, a la población de células diploides en fase G1. Sin embargo, el segundo pico (4C), corresponde a dos poblaciones celulares, células diploides en fase G2 y tetraploides en fase G1. El tercer pico (8C) corresponde a la población de células tetraploides que se encuentran en fase G2. Mediante el estudio de las proporciones de células que pertenecen a cada población se puede establecer si un tejido ha sufrido un proceso de endorreducción en menor o mayor medida.

Como ya se ha comentado, un aspecto fundamental para la evaluación de las plantas regeneradas es ver si han sufrido algún proceso de variación somaclonal. Uno de los más frecuentes es el cambio en el nivel de ploidía respecto del material de partida (lo más habitual es observar la regeneración de plantas tetraploides a partir de material diploide). Esta variación puede deberse a que en el material de partida hayan células tetraploides producto de la endorreducción o a que durante la regeneración se produzcan variaciones *de novo*. Para saber cuál es el origen de estas variaciones es fundamental conocer el patrón polisómico de los explantes de partida y compararlo con el nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

4.2.1 Estudios sobre el patrón polisómico del material de partida.

Se evaluó el patrón polisómico de cinco explantes de cotiledón distal y cinco explantes de cotiledón proximal de los tres genotipos en un estadio temprano de desarrollo. En este trabajo sólo se han evaluado explantes de cotiledón por tener una buena capacidad de regeneración y por ser los explantes más rápidos de obtener (no es necesario obtener plantas axénicas). Además, por esos motivos son los que usamos habitualmente para regenerar plantas. El análisis de estos explantes dio como resultado un patrón polisómico que presentaba picos 2C, 4C y 8C, lo que nos indicó que se habían producido fenómenos de endorreducción y, por ende, la formación de células tetraploides.

El grupo celular mayoritario fue aquel que contenía 2 complementos cromosómicos (2C), seguido del 4C y del 8C. Este resultado coincidió en ambos tipos de cotiledón. El cotiledón distal obtuvo mayor porcentaje de células 2C frente al proximal (73% y 64% respectivamente). Además, el porcentaje de células 8C fue menor en el cotiledón distal (2%) que en el proximal (5%) (Figura 28A). Por lo tanto, podemos concluir que hubo menos procesos de endorreducción en el cotiledón distal que en el proximal.

Al analizar las diferencias observadas entre los tres genotipos evaluados se vio que el genotipo con mayor porcentaje de células 2C y, por tanto menor incidencia de la endorreducción fue Tomate de colgar (73%), seguido de Moneymaker (69%) y de Micro-Tom (63%) (Figura 28B). Los datos obtenidos en esta comparativa confirman la importancia del genotipo en este tipo de procesos.

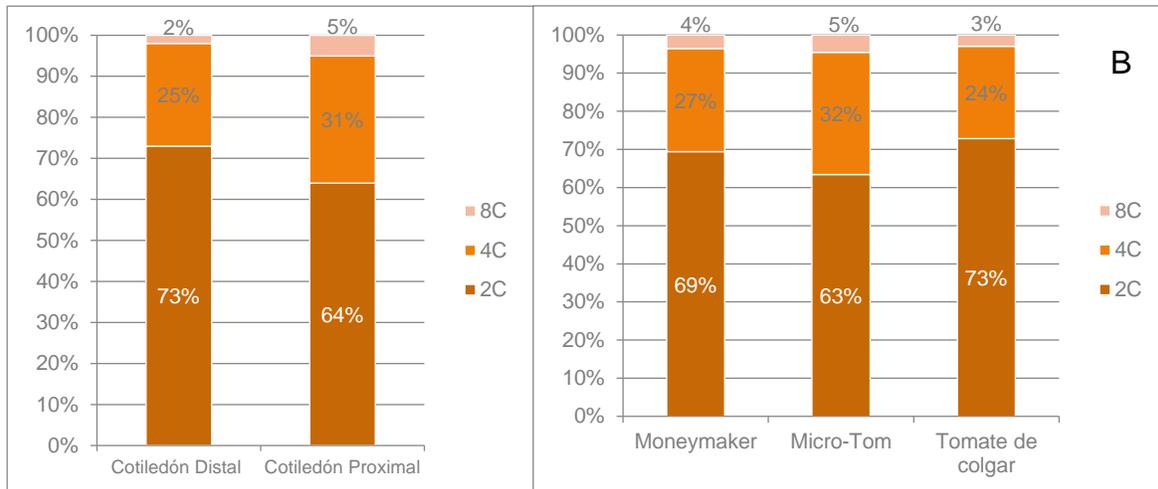


Figura 28: Patrón polisómico de los explantes de cotiledón. Representación del porcentaje de células 2C, 4C y 8C de ambos tipos de cotiledón (A) y de los tres genotipos estudiados (B). Cada muestra analizada contiene al menos 5000 núcleos celulares.

Analizando los datos con más detalle, agrupando tanto por genotipo como por tipo de explante podemos observar que el tipo de explante que mayor porcentaje de células 2C y menor porcentaje de 8C produjo y, por tanto, el que presentó menos eventos de endorreduplicación fue el distal en los tres genotipos. Tomate de colgar y Money Maker obtuvieron porcentajes muy similares de células 2C (76% y 75% respectivamente), e iguales en 8C (2% ambos) en el explante distal. Micro-Tom obtuvo un porcentaje menor con un 68% de células 2C y un 3% de células 8C (Figura 29).

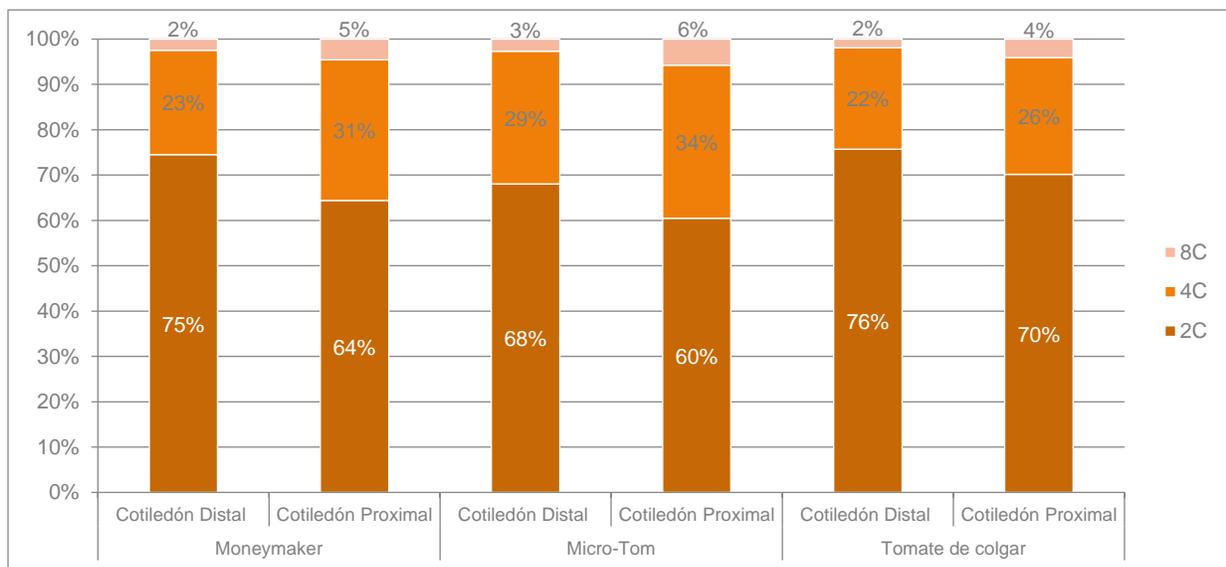


Figura 29: Patrón polisómico de los explantes de cotiledón distal y proximal para cada genotipo. Representación del porcentaje de células 2C, 4C y 8C. Cada muestra analizada contiene al menos 5000 núcleos celulares.

El patrón polisómico de los explantes puede afectar al nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de ellos. Para ver el alcance de dicho efecto analizaremos las plantas regeneradas para ver la proporción de diploides y tetraploides en cada condición.

4.2.2 Nivel de ploidía de los explantes regenerados

Se realizó el análisis del nivel de ploidía de 238 plantas regeneradas procedentes de explantes de cotiledón tanto de parte proximal como distal en el medio de cultivo más organogénico para cada genotipo. El tipo de explante que mayor porcentaje de plantas diploides obtuvo y, por tanto, el que sufrió menos eventos de endorreduplicación, fue el cotiledón distal con un 82,5% (Tabla 4).

Tipo de explante	Nº Muestras	ANÁLISIS PLOIDÍA		% Brotes diploides
		Nº Brotes 2n	Nº Brotes ≠2n	
C. Proximal.	118	93	25	78,81 ± 0,04
C. Distal	120	99	21	82,50 ± 0,03

Tabla 4: Nivel de ploidía de plantas regeneradas procedentes de los explantes de cotiledón proximal y distal. Se muestra el error estándar.

Este dato nos confirma que en este caso existe una correlación positiva entre el patrón polisomático del explante de partida (Figura 28A) y el porcentaje de plantas diploides regeneradas de éste.

Además, se analizó los datos segregando por tipo de explante de cotiledón y por genotipo (Tabla 5).

Genotipo	Tipo de explante	Nº Muestras	ANÁLISIS PLOIDÍA		% Brotes diploides
			Nº Brotes 2n	Nº Brotes ≠2n	
MoneyMaker	C. Proximal.	33	28	5	84,85 ± 0,06
	C. Distal	35	31	4	88,57 ± 0,05
Micro-Tom	C. Proximal.	45	32	13	71,11 ± 0,07
	C. Distal	45	36	9	80,00 ± 0,06
Tomate de colgar	C. Proximal.	40	33	7	82,50 ± 0,06
	C. Distal	40	32	8	80,00 ± 0,06

Tabla 5: Nivel de ploidía de plantas regeneradas procedentes de los explantes de cotiledón proximal y distal de los tres genotipos. Se muestra el error estándar.

En general se han obtenido porcentajes bastante elevados de regeneración de plantas diploides, siempre iguales o superiores al 80% si elegimos el explante adecuado. En un estudio con genotipos como Money Maker el porcentaje de plantas diploides superó el 80% empleando métodos de regeneración muy similares a los del trabajo actual (Van den Bulk, Löffler, Lindhout, & Koornneef, 1990). En trabajos previos del grupo se habían obtenido frecuencias menores. De hecho, con otros genotipos de tomate se lograron valores que oscilaban entre el 39,6% y el 60,44% (Ellul et al., 2003). Por tanto, este resultado nos va a servir para mejorar los métodos

previamente establecidos en el grupo. Además, con estos resultados sería adecuado el utilizar estos protocolos de regeneración para llevar a cabo experimentos, por ejemplo, de transformación genética, con las variedades analizadas.

El mayor porcentaje de plantas diploides que se obtuvo fue Money Maker. Se analizaron 33 explantes de cotiledón proximal y 35 de cotiledón distal y el cotiledón distal logró el resultado más elevado siendo cercano al 89% de plantas diploides regeneradas. De Micro-Tom se analizaron 45 explantes, tanto de cotiledón proximal como distal. Este genotipo fue el que mayor frecuencia de regeneración de plantas tetraploides sufrió con cerca del 30% en el cotiledón proximal. Es de destacar que este tipo de explante y genotipo es el que dio un menor porcentaje de células 2C cuando se analizó su patrón polisomático (Figura 29). De nuevo se observa una correlación positiva entre ambas variables.

Para Tomate de colgar se analizaron 40 explantes de cada tipo. Los porcentajes de plantas diploides regeneradas para ambos tipos de explantes fueron muy similares (82,5% cotiledón proximal y 80% cotiledón distal). Sin embargo, en este caso no se mantuvo la misma correlación que en los otros dos genotipos ya que el explante que había sufrido menos endorreducción fue el distal (Figura 29). Una posible explicación para este caso es que por algún motivo las células diploides presentes en el cotiledón distal tengan una menor capacidad de regenerar brotes que las correspondientes células del cotiledón proximal. Por eso, pese a haber más células 2C en el distal se regeneraron menos plantas diploides.

En resumen, hemos comprobado que tanto las frecuencias de regeneración, como la formación de brotes como la incidencia de la aparición de variantes somaclonales se encuentran en unos valores adecuados para utilizar estos resultados en el desarrollo de nuevas metodologías que permitan la transformación genética de estos materiales.

5 CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir lo siguiente:

- El análisis tanto de la eficacia de regeneración como de la capacidad de formación de brotes de cinco tipos de explante, siete medios de cultivo y tres accesiones de tomate ha permitido identificar las mejores condiciones para la producción y desarrollo de estructuras organogénicas. Esto permitirá mejorar la eficiencia de diversas técnicas de cultivo *in vitro* tales como la transformación genética, donde es necesaria la regeneración de plantas de forma adventicia.
- Como consecuencia de este estudio se han determinado las mejores condiciones de regeneración en una variedad, Tomate de colgar, con la que no se había trabajado previamente en nuestro grupo. Las eficacias de regeneración obtenidos en esta variedad son similares a las de las otras dos variedades con las que se tenía experiencia previa.
- Se ha demostrado que existe una correlación directa entre el patrón polisomático de los explantes de cotiledón y el nivel de ploidía de las plantas regeneradas en Money Maker y Micro-Tom. En general, se han conseguido a partir de explantes de cotiledón valores de regeneración de plantas diploides que varían entre el 70% y el 90% en todas las condiciones evaluadas. Estas altas frecuencias permitirán utilizar estas metodologías en futuros experimentos para la obtención de plantas transgénicas sin que la variación somaclonal represente un problema importante.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T., & Midmore, D. (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant cell, tissue and organ culture*, 78(1), 1-21.
- Calva, C., & Ríos, L. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. *Aspectos aplicados de la biotecnología*, 267-301.
- Chen, L., & Adachi, T. (1994). Plant regeneration via somatic embryogenesis from cotyledon protoplasts of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Japanese Journal of Breeding*, 44(3), 257-262.
- De Candolle, A. (1883). *Origine des plantes cultivées* (Vol. 43): G. Baillièrre et cie.
- Díaz, J., & Nuez, F. (2008). Tomato *Handbook of plant breeding. Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae*: Springer Science.
- Düzyaman, E., Tanrisever, A., & Guenver, G. (1993). *Comparative studies on regeneration of different tissues of tomato in vitro*. Paper presented at the II Symposium on Protected Cultivation of Solanacea in Mild Winter Climates 366.
- El-Farash, E., Abd-Alla, H., Taghian, A., & Ahmed, E. (1993). Genotype, explant age and explant type as effecting callus and shoot regeneration in tomato. *Assiut Journal of Agricultural Sciences (Egypt)*.
- Ellul, P., Garcia-Sogo, B., Pineda, B., Rios, G., Roig, L., & Moreno, V. (2003). The ploidy level of transgenic plants in Agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2), 231-238.
- FAOSTAT. (2017). Food and Agriculture Organization of the UNited Nations. Statistics Division., from <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Ferl, R., & Paul, A. (2000). Genome organization and expression. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD*, 312-357.
- Fuentes, A. D., Soto, N., Alfonso, D., & Oramas, P. (1998). Estudio de las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), a partir de cotiledones y hojas de la variedad Campbell 28. *Biot. Aplicada*, 15, 242-245.
- Geetha, N., Venkatachalam, P., Sairam Reddy, P., & Rajaseger, G. (1998). In vitro plant regeneration from leaf callus cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Advances in Plant Sciences*, 11, 253-258.
- Gill, R., Malik, K., Sanago, M., & Saxena, P. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of plant physiology*, 147(2), 273-276.

- Gubis, J., Lajchova, Z., Farago, J., & Jurekova, Z. (2003). Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum*) in vitro. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding-UZPI (Czech Republic)*.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2), 271-282.
- Hille, J., Koornneef, M., Ramanna, M., & Zabel, P. (1989). Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. *Euphytica*, 42(1-2), 1-23.
- Jones, J. (1990). Tomato plant culture. Ed (pp. 1900): CRC Press.
- Kaparakis, G., & Alderson, P. (2002). Influence of high concentrations of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(2), 186-190.
- Koornneef, M., Hanhart, C., & Martinelli, L. (1987). A genetic analysis of cell culture traits in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 74(5), 633-641.
- Locy, R. (1983). Callus formation and organogenesis by explants of six *Lycopersicon* species. *Canadian Journal of Botany*, 61(4), 1072-1079.
- Lorente, A. R. (2012). *Evaluación del cultivo "in vitro" de variedades de vid cultivadas en la DOCA Rioja*. (Proyecto fin de carrera), Univesidad de la Rioja.
- Mamidala, P., & Nanna, R. S. (2011). Effect of genotype, explant source and medium on in vitro regeneration of tomato. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 3(3), 45-50.
- MAPAMA. (2017). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de estadística., from <http://www.mapama.gob.es/es/>
- Meredith, C. P. (1979). Shoot development in established callus cultures of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 95(5), 405-411.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Namitha, K. K., & Pradeep, S. N. (2013). Morphogenetic Potential of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv.'Arka Ahuti'to Plant Growth Regulators. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(2), 220.
- Nandakumar, H., Ivanava, O., & Guseva, N. (1991). In vitro induction of morphogenesis in tomatoes using hormone deficient medium. *Physiologia plantarum*, 82(1).
- Newman, P. O., Krishnaraj, S., & Saxena, P. K. (1996). Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine. *International Journal of Plant Sciences*, 157(5), 554-560.
- Nuez, F. (1995). *El cultivo del tomate*: Ediciones Mundi-Prensa.

- Park, S. H., Morris, J. L., Park, J. E., Hirschi, K. D., & Smith, R. H. (2003). Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *Journal of plant physiology*, 160(10), 1253-1257.
- Peralta, I., Spooner, D., & Knapp, S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*: Solanaceae). *Systematic botany monographs (ISSN 0737-8211)*, 85.
- Pérez Grajales, M., Márquez Sánchez, F., & Peña Lomelí, A. (1998). *Mejoramiento genético de hortalizas*.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro culture of higher plants*: Springer Science & Business Media.
- Raj, S., Singh, R., Pandey, S., & Singh, B. (2005). *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing Tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection. *Current science*, 1674-1679.
- Rodríguez, G. R., Cárdenas, H., & Sánchez, H. L. (2010). Efectos de heterosis para el contenido de sólidos solubles y el tamaño del fruto en el tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) y su adaptación para los sistemas de cultivo protegido. *La Habana, Cuba*. 7p.
- Rodríguez, R. R., Rodríguez, J. M. T., & San Juan, J. A. M. (1997). *Cultivo moderno del tomate* (2 ed.): Ediciones Mundi-Prensa.
- Rousseaux, M. C., Jones, C. M., Adams, D., Chetelat, R., Bennett, A., & Powell, A. (2005). QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(7), 1396-1408.
- Ruiju, L., Jianhua, H., Yuefang, S., & Runmei, Z. (1997). CALLUS FORMATION AND PLANTLET REGENERATION FROM COTYLEDON AND HYPOCOTYL OF TOMATO (*Lycopersicum esculentum* Mill.). *ACTA AGRICULTURAE SHANGHAI*, 2, 003.
- Sherkar, H., & Chavan, A. (2014). Studies on callus induction and shoot regeneration in tomato. *Sci Res Rep*, 1, 89-93.
- Smulders, M., Rus-Kortekaas, W., & Gilissen, L. (1994). Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science*, 97(1), 53-60.
- Street, H. (1973). *Cell (suspension) cultures-techniques*: Oxford: Blackwell.
- Van den Bulk, R., Löffler, H., Lindhout, W., & Koornneef, M. (1990). Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. *Theoretical and Applied Genetics*, 80(6), 817-825.
- Wayase, U., & Shitole, M. (2014). Effect of plant growth regulators on organogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Dhanashri. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 20(2), 65.

Zhang, Y., & Stommel, J. (2000). RAPD and AFLP tagging and mapping of Beta (B) and Beta modifier (MoB), two genes which influence β -carotene accumulation in fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3-4), 368-375.