

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN)

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos



Regeneración de plantas en cultivo *in vitro* de especies silvestres relacionadas con tomate

Nicolás Gil Sepulcre

Tutor: Alejandro Atarés Huerta

Primer cotutor: Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental: Marybel Jáquez Gutiérrez

Curso académico 2016/2017

València, junio 2017



Título: Regeneración de plantas en cultivo *in vitro* de especies silvestres relacionadas con tomate

Resumen: El cultivo *in vitro* engloba un conjunto de técnicas que permiten la multiplicación del material vegetal, la mejora sanitaria y la mejora genética de plantas. Dentro de estos procesos se incluyen técnicas como la micropropagación de variedades de alto valor comercial, el cultivo de meristemas, el microinjerto, el incremento de la variabilidad genética; tanto intraespecífica mediante el uso de la variación somaclonal como extraespecífica mediante el rescate de embriones o la hibridación somática mediante fusión de protoplastos, la obtención de plantas haploides y doble-haploides y la transformación genética. El tomate es la especie hortícola más importante a nivel mundial después de la patata. Su consumo se ha extendido prácticamente por todo el mundo, tanto en fresco como en forma de salsas, zumos, concentrados, etc. Existen diversas especies silvestres relacionadas filogenéticamente que pueden servir como fuentes de variación genética en los programas de mejora de la especie cultivada. En nuestro laboratorio se han puesto a punto diversos métodos de regeneración mediante inducción de organogénesis adventicia de algunas especies silvestres relacionadas con tomate. Su aplicación en técnicas como la transformación genética nos ha permitido obtener un material muy valioso para la identificación de genes clave en múltiples procesos mediante un programa de mutagénesis insercional. En este contexto, la mejora de un método de regeneración o su puesta a punto, en el caso de trabajar con una nueva especie, puede abrir nuevas vías en las investigaciones que está llevando a cabo nuestro grupo. Teniendo en cuenta todo lo anterior, el objetivo central de este proyecto consiste en profundizar en el conocimiento de la inducción de organogénesis adventicia en *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, un ancestro del tomate cultivado y en *Solanum pimpinellifolium* y *Solanum galapagense*, dos especies silvestres del mismo género. Para ello se ha estudiado la influencia que tiene sobre estos genotipos diversos factores como el tipo de explante, el medio de cultivo y las condiciones de incubación sobre la inducción de organogénesis adventicia. El desarrollo de estos métodos tiene una gran importancia para su aplicación en programas de mejora basados en la inducción de variabilidad (i.e. variación somaclonal) o la transformación genética.

Palabras clave: Morfogénesis - Cultivo *in vitro* – Tomate – Especies silvestres

Autor: D. Nicolás Gil Sepulcre

Localidad y fecha: València, junio 2017

Tutor Académico: Dr. Alejandro Atarés Huerta

Cotutor: Dr. Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental: Marybel Jáquez Gutiérrez

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

Title: Plant regeneration by tissue culture in tomato wild related species

Abstract: In vitro culture encompasses a set of techniques that allow the multiplication of plant material, vegetal material sanitation and genetic improvement of plants. These processes include techniques such as varieties of high commercial value, meristem culture, micropropagation of varieties of high commercial value, growing from meristems, the micrografts, genetic variability increased; both intraspecific using somaclonal variation and extraespecific by embryo rescue or somatic hybridization by fusion of protoplasts, obtaining haploid and doble-haploides plants and genetic transformation. The tomato is the most important horticultural species around the world after the potato. It's use has spread practically by everyone, both fresh and in form of sauces, juices, concentrates, etc. There are several wild species phylogenetically related that may serve as sources of genetic variation improvement of the cultured species programs. In our laboratory we have done various methods of regeneration through induction of adventitious organogenesis of some wild species related to the tomato. It is the application in techniques like genetic transformation that has allowed us to obtain a very valuable material for the identification of key genes in multiple processes through a programme of insertional mutagenesis. In this context, the improvement of a method of regeneration or their implementation, in the case of work with a new species, can open new avenues in the investigation that our group is carrying out. Taking into account all of the above, the central objective of this project is to deepen the knowledge of the induction of adventitious organogenesis in *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*, an ancestor of the cultivated tomato and in *Solanum pimpinellifolium* and *Solanum galapagense*, two wild species of the same genus. In order to do so, we have studied the influence of different factors such as explant type, culture medium and incubation conditions on the induction of adventitious organogenesis. The development of these methods is of great importance for their application in improvement programs based on the induction of variability (i.e., somaclonal variation) or genetic transformation.

Keywords: Morphogenesis – *In vitro* culture – Tomato – Wild species

Agradecimientos

Este trabajo no hubiese sido posible sin la ayuda de mucha gente. Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han apoyado y a todo el grupo de investigación, en especial a Vicente Moreno por darme la oportunidad de formar parte de esa gran familia que es el laboratorio 0.07. Son muchas las personas implicadas en la consecución de este proyecto y me gustaría hacer una serie de menciones:

Gracias a Alex por dirigir este trabajo y estar el día a día para cualquier duda. Gracias a Marybel por enseñarme a trabajar y a preparar café. A Jesús por estar siempre dispuesto a echar una mano y hacerlo.

A toda mi familia en especial a mi madre y a mi hermano. A todos mis amigos y gente maravillosa que ha pasado por mi vida este año.

A todos ellos, gracias.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Origen, domesticación y clasificación taxonómica | 1 |
| 1.2. Descripción botánica | 1 |
| 1.3. Importancia y relevancia científica | 2 |
| 1.4. Importancia económica..... | 2 |
| 1.5. Mejora genética de tomate..... | 3 |
| 1.6. Fundamentos y aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i> | 5 |
| 1.7. Aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i> a la mejora genética del tomate | 6 |
| OBJETIVOS | 8 |
| 3. Materiales y Métodos | 9 |
| 3.1. Material vegetal | 9 |
| 3.2. Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i> | 9 |
| 3.2.1. Esterilización de semillas..... | 9 |
| 3.2.2. Preparación y esterilización de los medios de cultivo | 10 |
| 3.2.3. Trabajo en condiciones asépticas..... | 10 |
| 3.2.4. Germinación de semillas | 10 |
| 3.2.5. Cultivo de explantes de cotiledón y de ápices meristemáticos | 11 |
| 3.2.6. Cultivo de peciolo, peciolulo y limbo de hoja | 11 |
| 3.2.7. Tipos de explantes..... | 11 |
| 3.3. Citometría de flujo | 13 |
| 3.3.1. Estudio del patrón polisomático del material de partida | 13 |
| 3.3.2. Estudio del nivel de ploidía de las plantas regeneradas | 13 |
| 3.4. Regeneración de plantas..... | 14 |
| 3.4.1. Tipos de medio de cultivo | 14 |
| 3.4.2. Evaluación de la regeneración | 14 |
| 4. Resultados y Discusión | 16 |
| 4.1. Esterilización y germinación de semillas de tomate en condiciones axénicas | 16 |
| 4.2. Estudio sobre patrón polisomático del material de partida | 16 |
| 4.3. Evaluación de la capacidad organogénica del tomate | 18 |
| 4.3.1. Eficacia de regeneración a partir de explantes de cotiledón | 19 |
| 4.3.2. Eficacia de regeneración a partir de explantes de hoja | 22 |
| 4.3.3. Número de brotes regenerados a partir de los explantes de cotiledón | 25 |
| 4.3.4. Número de brotes regenerados a partir de los explantes de hoja | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.4. Nivel de ploidía de las plantas regeneradas..... | 29 |
| 5. Conclusiones..... | 32 |
| 6. Bibliografía | 33 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Evolución en la producción y área cultivada mundial de tomate para el período 1990-2010. Fuente: FAOSTAT (2012). | 3 |
| Figura 2. Tipos de explantes utilizados en los experimentos de regeneración. A.- Plántula axénica (1.-cotiledón proximal; 2.-cotiledón distal). B.-Hoja expandida de planta axénica (3.- peciolo, 4.-peciolulo, 5.- limbo). La barra representa 1 cm. | 12 |
| Figura 3. Cultivo de explantes de cotiledón proximal y distal (A), peciolo (B), limbo (C) y peciolulo (D). La barra representa 1 cm..... | 12 |
| Figura 4. Explantes de cotiledón del genotipo <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC 6), a los 30 días del cultivo en medio organogénico. (A) callo desorganizado, (B) yemas, (C) ápice y (D) brote. La barra representa 1 cm..... | 15 |
| Figura 5. Patrón polisomático de explantes procedentes de una planta diploide que no presentan endorreduplicación (A) y con endorreduplicación (B). Cada gráfica representa la distribución de al menos 5000 núcleos celulares. | 16 |
| Figura 6. Patrón polisomático de los explantes de cotiledón que se emplean como material de partida para la regeneración de plantas. Se representa el porcentaje de células 2C, 4C y 8C de los cotiledones proximal y distal (A) y de las tres accesiones analizadas (B). Datos obtenidos a partir del estudio de tres muestras biológicas independientes para cada condición con al menos 5000 núcleos celulares analizados en cada muestra. | 17 |
| Figura 7. Desarrollo de explantes de limbo de hoja de la accesión SG 19040 en medio organogénico (izquierda). Detalle de explante de limbo con regeneración adventicia a los 30 días de cultivo (derecha). La barra representa 1cm..... | 18 |
| Figura 8. Eficacia de regeneración de los explantes proximales y distales de cotiledón de las tres accesiones utilizadas. La barra muestra el error estándar. | 19 |
| Figura 9. Eficacia de regeneración en explantes de cotiledón de las tres accesiones utilizadas. La barra muestra el error estándar. | 20 |
| Figura 10. Eficacia de regeneración en explantes de cotiledón de la accesión TO937 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar..... | 20 |
| Figura 11. Eficacia de regeneración en explantes de cotiledón de la accesión SLC 6 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar..... | 21 |
| Figura 12. Eficacia de regeneración en explantes de cotiledón de la accesión SG 19040 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar. | 22 |
| Figura 13. Eficacia de regeneración de los explantes de peciolo, peciolulo y de limbo de las tres accesiones utilizadas. La barra muestra el error estándar..... | 22 |
| Figura 14. Eficacia de regeneración en explantes de hoja de las tres accesiones utilizadas. La barra muestra el error estándar..... | 23 |
| Figura 15. Eficacia de regeneración en explantes de hoja de la accesión TO 937 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar. | 24 |
| Figura 16. Eficacia de regeneración en explantes de hoja de la accesión SLC 6 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar. | 24 |
| Figura 17. Eficacia de regeneración en explantes de hoja de la accesión SG 1904 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar. | 25 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Gráfica del patrón polisomático de una planta diploide (izquierda) y una tetraploide (derecha). | 30 |
|--|----|

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Componentes del medio de germinación utilizado para la germinación de semillas. ^a (Murashige y Skoog, 1962)..... | 10 |
| Tabla 2. Componentes básicos del medio (MB3), utilizado en los experimentos de regeneración. ^a (Murashige y Skoog, 1962); ^b (Shahin, 1984). | 11 |
| Tabla 3. Composición hormonal de los diferentes medios de cultivo utilizados en los ensayos de regeneración. Los medios se nombran con las iniciales de las hormonas que portan (I, K, B, Z, TDZ), respectivamente. (I: ácido indolacético; K: kinetina; B: 6-benciladenina; Z: zeatina; TDZ: thidiazuron). | 14 |
| Tabla 4. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante de cotiledón con algún brote (NB/CB). | 26 |
| Tabla 5. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de cotiledón de las tres accesiones utilizadas. | 26 |
| Tabla 6. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de cotiledón de la accesión TO 937 en función del medio de cultivo utilizado. | 26 |
| Tabla 7. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de cotiledón de la accesión SLC 6 en función del medio de cultivo utilizado. | 27 |
| Tabla 8. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de cotiledón de la accesión SG 19040 en función del medio de cultivo utilizado. | 27 |
| Tabla 9. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de hoja. | 28 |
| Tabla 10. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de hoja de las tres accesiones utilizadas. | 28 |
| Tabla 11. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de hoja de la accesión TO 937 en función del medio de cultivo utilizado. | 28 |
| Tabla 12. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de hoja de la accesión SLC 6 en función del medio de cultivo utilizado. .. | 29 |
| Tabla 13. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de hoja de la accesión SG 19040 en función del medio de cultivo utilizado. | 29 |
| Tabla 14. Nivel de ploidía en función de la parte del cotiledón del que procede la planta..... | 30 |
| Tabla 15. Nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de cotiledones del material de partida. | 30 |

1. Introducción

1.1. Origen, domesticación y clasificación taxonómica

El centro de origen del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile. En esta área crecen espontáneamente las diversas especies del género y también es donde presenta su mayor variación. Aunque todavía queda algún aspecto poco claro con respecto al origen, la mayoría de los estudios taxonómicos (Muller, 1940; Luckwill, 1943) acreditan a *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* como el posible antecesor del tomate cultivado.

Una de las hipótesis es la del origen de domesticación peruano propuesta por De Candolle (1892), que se basaba en aspectos botánicos, lingüísticos e históricos (Bauchet & Causse, 2012). Según otra hipótesis, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, originaria de la región Andina, fue exportada a México como mala hierba, donde se domesticó y posteriormente se difundió hacia el Viejo Mundo (Jenkins, 1948; Rick, 1958). Hay evidencias históricas, arqueológicas y moleculares que apoyan esta hipótesis.

Tras estudios más recientes se piensa que la domesticación habría ocurrido en dos pasos, el primero sería el paso de *S. pimpinellifolium* a *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*. En el segundo paso se habría producido un cambio en Centroamérica, donde apareció *S. lycopersicum*, el tomate cultivado (Blanca *et al.*, 2015). Este tomate fue el que desde América se trajo a Europa (Ranc *et al.*, 2008).

Actualmente el tomate se clasifica dentro del Reino *Plantae*, Subreino *Tracheobionta*, División *Magnoliophyta*, Clase *Magnoliopsida*, Subclase *Asteridae*, Orden *Solanales*, Familia *Solanaceae*. En cuanto a su clasificación dentro de esta familia, aunque hace unos años se incluía al tomate dentro del género *Lycopersicon* como *L. esculentum* (Rick, 1979; Symon, 1985; Taylor, 1986), actualmente se le adscribe dentro del género *Solanum* y la especie *lycopersicum* (Child, 1990; Olmsteas *et al.*, 1999; Peralta y Spooner 2001; Spooner *et al.*, 2005). En resumen, el tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenece a la familia de las solanáceas, familia que engloba más de 3000 especies agrupadas en 96 géneros, entre las cuales se incluyen algunas especies de gran importancia económica como la patata, la berenjena, el pimiento, el tabaco o la petunia (D'Arcy, 1991).

1.2. Descripción botánica

Solanum lycopersicum, es una especie autógama, rastrera y perenne (aunque se cultiva como anual). Por lo que respecta al tipo de crecimiento, puede ser determinada o indeterminada, siendo el crecimiento indeterminado el carácter silvestre de la especie. El sistema radicular está compuesto por una raíz principal, corta y débil, raíces secundarias vigorosas y numerosas y raíces adventicias que surgen de la parte inferior del tallo. Los tallos son gruesos, con entrenudos de 1 a 6 cm de largo y tallos secundarios que se desarrollan a partir de las axilas de las hojas. Las hojas son compuestas, anchas y planas, imparipinnadas, con 7 a 11 folíolos peciolados, lobulados y con bordes enteros o dentados y se disponen en forma alterna sobre el tallo. Las flores son hermafroditas, y están compuestas por 4 verticilos y tienen cinco sépalos, cinco pétalos de color amarillo y cinco estambres fusionados que envuelven a la parte femenina. La floración se produce en racimos simples o ramificados; con 3 a 10 flores cada uno (ocasionalmente pueden contener hasta 50). El fruto es una baya habitualmente de color rojo que alcanza un peso final en la madurez que oscila entre los 5 y 500 g según las variedades.

Internamente puede presentar entre 2 y 30 lóculos donde se alojan las semillas. Éstas presentan forma lenticular, son de color grisáceo y están cubiertas por una vellosidad. Cada gramo contiene entre 250 y 300 unidades y su capacidad germinativa dura 4 o 5 años.

1.3. Importancia y relevancia científica

El tomate no sólo tiene una gran importancia económica como especie cultivada, también es una de las especies vegetales con las que más se ha trabajado y se sigue investigando en diferentes campos científicos. El tomate es una planta diploide con 24 cromosomas. La secuenciación de su genoma hace unos años por el TGC (Tomato Genome Consortium, 2012) y la obtención de múltiples marcadores moleculares para diferentes caracteres ha tenido un efecto positivo en el uso del tomate como objeto de estudios llegando a emplearse, en alguna área de conocimiento, como especie modelo. Las características que le han permitido convertirse en esto son que la planta de tomate crece bajo diferentes condiciones de cultivo con un ciclo de vida relativamente corto, tiene alta capacidad de producción de semillas, su genoma es relativamente pequeño (950 Mb), tiene pocos genes duplicados, es una planta autógama con abundancia de líneas puras, es fácil de polinizar e hibridar con otras variedades y especies, tiene gran capacidad de propagación asexual y la capacidad de regenerar plantas enteras a partir de explantes (Gerszberg *et al.*, 2014).

Además, en contraste con otros organismos modelo como *Arabidopsis* o arroz, el tomate tiene una característica diferencial, la producción de frutos carnosos, muy importante para alimentación humana. Por otra parte, hay disponibles un gran número de mutantes que han permitido identificar los genes clave que controlan múltiples caracteres de interés. También es muy importante la gran cantidad de accesiones pertenecientes a especies silvestres relacionadas con características relevantes para la mejora del tomate. Estos recursos filogenéticos son cruciales para mejoradores e investigadores cuya pretensión es estudiar y mejorar la calidad y rendimiento de los cultivos de tomate.

1.4. Importancia económica

El tomate se encuentra distribuido por todo el mundo y es la segunda hortaliza, después de la patata, con mayor importancia económica a nivel mundial. De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAOSTAT, 2013), durante el año 2013, en el mundo se produjeron más de 163 millones de toneladas de tomate, repartidas en más de 4 millones de hectáreas. China es el mayor productor de este alimento y ha alcanzado en los últimos años el 18% de la producción mundial. En Europa, la producción se acerca a los 20 millones de toneladas (12%) y se cultivan más de 500.000 hectáreas (12%).

En el contexto internacional España se sitúa en la vigésimo segunda posición en cuanto a superficie de producción y en la novena respecto a la producción. A nivel europeo, España es la segunda, después de Italia, tanto en superficie cultivada como en producción obtenida.

A nivel nacional el tomate es la hortaliza con mayor producción. En el año 2014 se obtuvieron 4.865.460 toneladas en una superficie de 54.700 hectáreas (FAOSTAT, 2014). Casi la mitad de la superficie de cultivo, 22.273 hectáreas, se encuentra en Andalucía. Dentro de esta comunidad autónoma es de destacar la zona del Poniente Almeriense donde su cultivo bajo invernadero se lleva a cabo durante todo el año con un elevado porcentaje dedicado a la exportación, principalmente, a otros países europeos.

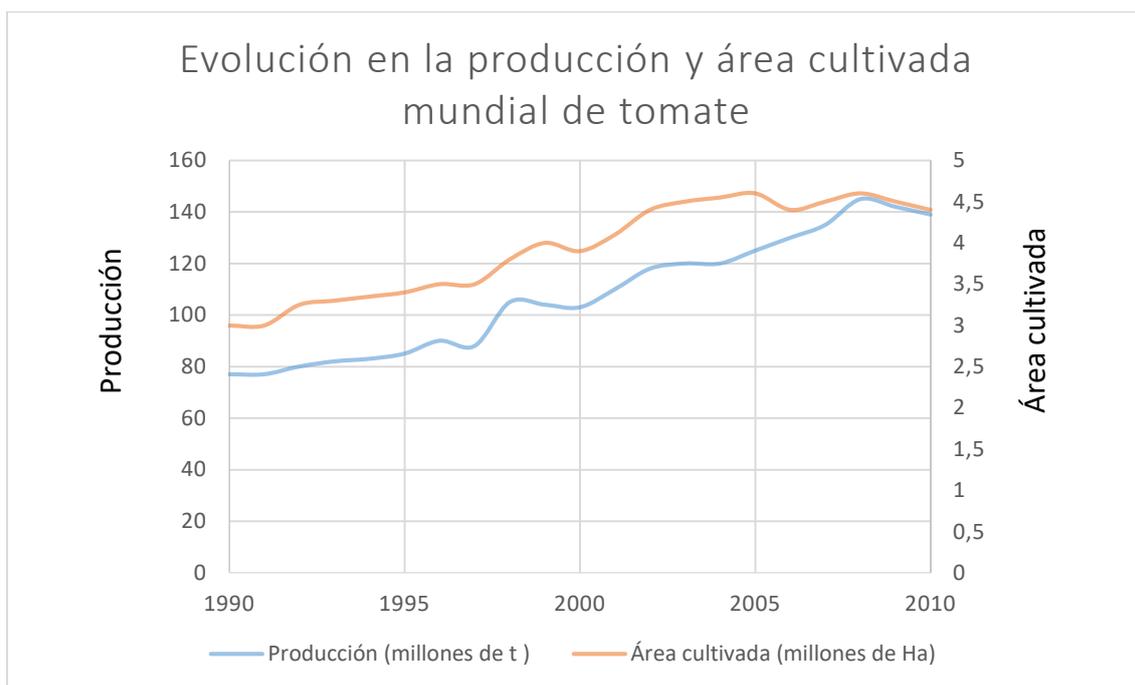


Figura 1. Evolución en la producción y área cultivada mundial de tomate para el período 1990-2010. Fuente: FAOSTAT (2012).

Como se observa en la Figura 1, tanto la superficie cultivada como la producción de tomate sigue una línea ascendente desde finales del siglo pasado. Aunque en la última década del siglo XX el incremento de la producción se fundamentaba en el incremento del área cultivada, en la primera década del siglo XXI la producción mundial de tomate se incrementó un 41,35% con un aumento del área de cultivo únicamente del 9,36%. Esta diferencia entre la tasa de crecimiento de la superficie cultivada y la de producción se explica por un aumento significativo en el rendimiento del cultivo (t/Ha). Dicho aumento se debe a las mejoras tecnológicas producidas en el manejo del cultivo y a la disponibilidad de variedades de mayor productividad gracias a su mejora genética.

1.5. Mejora genética de tomate

Aunque el tomate se cultivaba en Europa desde su llegada de América, es en Estados Unidos donde comenzó hace poco más de un siglo su mejora genética sistemática. En ese contexto se reconoce a A.W. Livingston como el primer mejorador de tomate en 1870 (Stevens y Rick, 1986). En esa época la mejora se basaba en la realización de cruces y selección posterior de aquellos individuos con características más interesantes. La historia reciente de la mejora genética del tomate se puede resumir en cuatro fases en función de los caracteres que se han pretendido modificar con mayor intensidad en cada momento: el aumento del rendimiento en los años 70's, el aumento de la vida post-cosecha en los 80's, la mejora de las características organolépticas en los 90's y, más recientemente, el incremento del valor nutricional (Bai y Lindhout, 2007; Bauchet y Causse, 2012; Foolad, 2007).

Cabe destacar que, en este proceso de mejora continua hasta la década de 1950 se buscaba el desarrollo de variedades polivalentes para satisfacer los objetivos tanto del consumo en fresco como del procesado. Posteriormente, las variedades se han ido dirigiendo hacia tener

buenas características dependiendo del método de cultivo, es decir, en campo o en invernadero, y de su destino final, es decir, si se va a consumir en fresco o se tiene que procesar. Hoy en día las características que se exige en el mercado en fresco y los cultivares de procesamiento son muy distintas, en gran medida como resultado de los diferentes requisitos de calidad para el uso previsto. Sin embargo, el objetivo universal de la mejora del tomate tanto para el mercado fresco como para el procesamiento ha sido aumentar el rendimiento por unidad de área. Otras características esenciales comunes a ambos destinos de consumo son la resistencia a enfermedades, una adaptabilidad amplia a diferentes condiciones de cultivo, la precocidad en la madurez, la capacidad de producción de frutos a temperaturas adversas, la resistencia al rajado inducido por la lluvia, la tolerancia a grandes pudriciones de frutos maduros, la firmeza del fruto, etc.

Los rasgos específicos que se necesitan en los cultivares de procesamiento incluyen, la uniformidad de la planta, la maduración uniforme de los frutos y que éstos tengan un tamaño adecuado para la cosecha mecánica, la facilidad de separación de los frutos y el contenido en sólidos solubles. Los rasgos específicos de interés en los cultivares del mercado en fresco incluyen un color y tamaño de fruto adecuado a cada variedad y con elevada uniformidad, una elevada firmeza y duración de conservación, ausencia de manchas externas o anomalías, buenas características organolépticas (aroma, textura y sabor) y un valor nutricional elevado.

Para lograr todos estos objetivos los mejoradores utilizan habitualmente métodos clásicos: hibridación y selección con el apoyo de marcadores moleculares, una técnica que permite identificar en etapas tempranas las plantas que portan genes de interés para la mejora y, por tanto, acorta los tiempos para alcanzar los objetivos propuestos. La eficiencia de la mejora mediante esta vía depende mayoritariamente de la disponibilidad de fuentes de variabilidad genética y de la capacidad de aunar en una variedad los caracteres deseables que se pretenden combinar. Cabe destacar que el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la especie que menor variabilidad genética posee dentro del género *Solanum*. Posee sólo el 5% de la variabilidad genética total de las especies de la subsección *Lycopersicon* (Peralta y Spooner, 2005). Esta escasa variabilidad se debe al proceso de selección llevado a cabo durante su mejora. Esto podría solventarse mediante el empleo de líneas silvestres que pueden aportar caracteres como la tolerancia a estreses abióticos, la resistencia a plagas y enfermedades o la mejora de las cualidades organolépticas. Para poder mejorar todos esos caracteres, desde hace tiempo se ha recurrido a la introgresión de parte del genoma de especies silvestres (Rick, C.M, 1958). Esto pone de relevancia el enorme valor de las especies silvestres, como *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. galapagense*, ya que sobre ellas no han actuado los procesos de selección que conlleva la domesticación y representan una enorme oportunidad, junto a los programas de mutagénesis, para la búsqueda de nuevos alelos de interés agronómico. Es por ello que, el estudio de estos genes y su introducción desde las especies silvestres al tomate ha sido y seguirá siendo la base genética fundamental para el logro de cultivares e híbridos con nuevas características (Foolad 2007).

Sin embargo, esta estrategia tiene algunas limitaciones como la gran cantidad de tiempo que es necesario para alcanzar el resultado deseado en un programa de retrocruzamientos (más de 10 años) o la dificultad para encontrar variabilidad para la mejora de determinados caracteres entre los recursos filogenéticos sexualmente compatibles con tomate. La biotecnología de plantas mediante las técnicas de cultivo *in vitro* ofrece a los mejoradores unas nuevas herramientas para resolver problemas que con los métodos clásicos son difíciles o imposibles de abordar. Estas nuevas herramientas han modificado considerablemente el paradigma en torno al mejoramiento de plantas, permitiendo lograr ciertos objetivos de forma más rápida y el acceso a una variabilidad genética inalcanzable hasta el momento.

1.6. Fundamentos y aplicaciones del cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* engloba un conjunto de técnicas biotecnológicas que se pueden clasificar, por su aplicación final, en metodologías para la multiplicación de material vegetal, la mejora sanitaria y la mejora genética. La multiplicación del material incluye técnicas como la micropropagación de variedades de alto valor comercial. Otra aplicación relacionada con esta técnica es la conservación de germoplasma y, más específicamente, la conservación y multiplicación de genotipos en peligro de extinción (Sengar *et al.*, 2010). La mejora sanitaria se realiza gracias a técnicas como el cultivo de meristemos y el microinjerto que han permitido la obtención de material sano a partir de plantas infectadas con diferentes microorganismos, incluidos los virus. La mejora genética mediante esta estrategia incluye técnicas para el incremento de la variabilidad genética, tanto intraespecífica, mediante el uso de la variación somaclonal (Collonnier *et al.*, 2001), como extraespecífica, mediante el rescate de embriones (Brar y Khush, 1997) y la hibridación somática de protoplastos (Waara y Glimelius, 1995). Además, el cultivo *in vitro* permite la obtención de plantas haploides y doble-haploides que acortan enormemente la generación de líneas puras en un programa de mejora (Germanà, 2011). Finalmente, la transformación genética permite la transferencia de uno o varios genes que contienen las características deseables, aunque la especie donante esté muy alejada filogenéticamente de la receptora.

La morfogénesis *in vitro* es la base de todas las aplicaciones que derivan del cultivo *in vitro* de plantas. Esto se puede conseguir gracias a la capacidad que tiene las células vegetales para regenerar una planta entera a partir de células diferenciadas bajo determinadas condiciones de cultivo (Skoog y Miller, 1957). Por tanto, es lo que permite la realización de las técnicas biotecnológicas anteriormente comentadas ya que en todas ellas se necesitan métodos para la regeneración de plantas a partir de diferentes tipos de explantes.

La respuesta morfogenética en el cultivo *in vitro* puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: la embriogénesis somática y la organogénesis adventicia. En la embriogénesis se forman embriones, similares a los zigóticos, en tejidos somáticos, que al seguir su desarrollo dan lugar a una planta. La organogénesis adventicia es un proceso morfogenético de tipo unipolar que permite la formación de brotes (caulogénesis) o raíces (rizogénesis) a partir de explantes sin meristemos preexistentes. En el caso de la caulogénesis para llegar a obtener una planta completa hay que pasar por una serie de etapas. En primer lugar, se debe formar un callo desorganizado a partir de la división de las células de las zonas de corte del explante. Cuando estas células se organizan en nuevos meristemos aparecen las yemas adventicias. Estas yemas siguen su desarrollo hasta dar ápices, en los que se aprecian las primeras hojas y, posteriormente, brotes que pueden separarse del explante de partida para que enraíce y dé una planta entera.

Diversos estudios han demostrado que la regeneración de una planta mediante estas rutas se ve afectada por numerosos factores como el genotipo, el tipo, edad y tamaño del explante, la composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales. Por tanto, encontrar la combinación idónea de estos factores es clave para conseguir el resultado deseado. La metodología basada en el ensayo y error ha sido tremendamente efectiva. De hecho, con esta estrategia se han obtenido magníficos resultados en el desarrollo tanto de metodologías como de aplicaciones relacionadas con el cultivo *in vitro* que están siendo utilizadas actualmente por un gran número de grupos de investigación y empresas de todo el mundo.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que las plantas regeneradas pueden sufrir modificaciones genéticas con respecto al material de partida. Este fenómeno se conoce como variación somaclonal, y se produce cuando la regeneración implica la formación de una fase de callo desorganizado, tanto si ocurre a través de organogénesis o por embriogénesis. Los

mecanismos involucrados en estas variaciones son variados y están relacionados con el cambio en el número y estructura de los cromosomas. Los factores que influyen en la aparición de este proceso son múltiples, desde el genotipo, el tipo de explante, la composición hormonal de los medios de cultivo, el período de cultivo, el número de subcultivos, las condiciones de cultivo, etc. Aunque la variación somaclonal es utilizada en procesos de mejora genética como una forma de ampliar la variación genética intraespecífica (de forma similar a la aplicación de agentes mutagénicos como radiaciones, EMS, etc.), es un problema a evitar en los programas de propagación *in vitro* y de transformación genética ya que se producen cambios no deseados.

Estos cambios pueden surgir *de novo* durante el cultivo *in vitro* o pueden estar presentes en el material de partida y hacerse visibles al regenerar plantas a partir de células que ya en el explante original presentaban alguna diferencia. Uno de los cambios más frecuentes en algunas células del material de partida son los cambios numéricos, es decir, células que contienen un mayor contenido de ADN por haber duplicado su información genética nuclear. Para conocer los cambios que afectan al número de cromosomas es necesario evaluar esta característica mediante citometría de flujo.

En trabajos previos de nuestro grupo y de otros laboratorios con especies de la familia de las solanáceas (tomate) y cucurbitáceas (melón, pepino y sandía) se han detectado en diversos tipos de explantes células con mayor nivel de ploidía que la planta original por haber sufrido alguna ronda de endorreduplicación. La endorreduplicación es un proceso por el que las células replican su ADN, duplicando el número de sus cromosomas, pero sin dividirse. La consecuencia es que su dotación cromosómica se ve duplicada por cada ronda de endorreduplicación (de 2C pasa a 4C, de 4C pasa a 8C, etc.). Este proceso está asociado a tejidos con un crecimiento muy intenso en un corto periodo y es habitual detectarlo en determinados órganos (hipocótilo, cotiledón y algunos órganos reproductivos) de muchas especies herbáceas.

1.7. Aplicaciones del cultivo *in vitro* a la mejora genética del tomate

Hoy en día la población humana mundial es de seis mil millones de habitantes y se espera que llegue a los nueve mil millones de habitantes en 2050. Para evitar una crisis importante de seguridad alimentaria en el mundo, se estima que la producción de alimentos en los países en desarrollo tendrá que ser duplicada o triplicada en los próximos 50 años. Esto plantea grandes retos en la obtención de suficientes alimentos teniendo en cuenta que para ello se pretende utilizar la menor cantidad de superficie posible. Además, la agricultura necesita buscar soluciones a múltiples problemas como el incremento de la salinidad y la sequía debido a cambios ambientales y de sobreexplotación agrícola o la presencia de nuevas plagas y enfermedades. Con estrategias de mejora clásica se han alcanzado grandes logros en las especies cultivadas, sin embargo, en este contexto pueden resultar demasiado lentos y laboriosos (Ahmad *et al.*, 2012). Por tanto, la biotecnología de plantas ofrece a los mejoradores unas nuevas herramientas para resolver problemas de forma más rápida que con los métodos clásicos. Además, permite alcanzar objetivos que son difíciles o imposibles de abordar mediante el acceso a unas fuentes de variabilidad genética inalcanzable hasta el momento.

La selección asistida por marcadores (MAS) permite hacer de forma mucho más rápida y eficiente la selección en los programas de mejora por métodos tradicionales. Los marcadores moleculares se han convertido en poderosas herramientas para hacer posible la determinación de las características genéticas de las plantas y seleccionar por su genotipo, en lugar de por su fenotipo (Díez y Nuez, 2008). La incorporación de múltiples genes es un gran reto para los programas de mejoramiento de plantas, ya que, a nivel comercial, se requieren cultivares o híbridos que posean una combinación de diversos caracteres (resistencias a estreses bióticos,

tolerancia a estreses abióticos, caracteres agronómicos y de calidad...). La selección asistida por marcadores ha sido empleada ampliamente tanto para caracteres de herencia simple como para caracteres poligénicos. En tomate existen múltiples ejemplos de utilización de la MAS: la introducción de la resistencia al cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), al marchitamiento vascular (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), al virus del mosaico del tabaco (ToMV), a la marchitez causada por *Verticillium* y a la resistencia a *Alternaria alternata* que provoca el moho negro (Brandwagt *et al.*, 2000).

Además de los marcadores moleculares, las técnicas de cultivo *in vitro* ofrecen una gama de soluciones biotecnológicas a los problemas que presenta la mejora del tomate. Así, aprovechando la variación somaclonal en tomate, se pudieron seleccionar seis mutantes de tomate con resistencia al virus del mosaico del tabaco (Barden *et al.*, 1986). En otro trabajo se consiguió identificar un mutante con mejores cualidades nutricionales del fruto (Mishra *et al.*, 2007).

También son muchos los ejemplos del empleo de técnicas de rescate de embriones (Sohrab *et al.*, 2015; Picó *et al.*, 2002) y de fusión de protoplastos (Stommel, 2001; Kobayashi *et al.*, 1996) para conseguir híbridos de tomate con especies sexualmente incompatibles. Sin embargo, los métodos para la obtención de haploides y doble-haploides de tomate todavía no se han podido desarrollar. En los últimos 40 años, se han ensayado un gran número de condiciones de inducción y de cultivo (Seguí-Simarro y Nuez 2005; 2007; Shtereva *et al.*, 1998; Zagorska *et al.*, 2004) pero a pesar de ese esfuerzo todavía no se ha conseguido un método eficaz y reproducible.

Por último, hay que destacar los avances obtenidos en la transformación genética de plantas de tomate, una técnica con grandes posibilidades ya que permite acceder a variabilidad genética inalcanzable por otros métodos. Por lo que se refiere a la producción de plantas transgénicas de tomate resistentes enfermedades se ha mejorado para la resistencia a *P. syringae* pv. *tomato* (Coego *et al.*, 2005), la mancha gris de la hoja (*Stemphylium solani*) y a Fusariosis (Lin *et al.*, 2004). También se han obtenido resultados en la mejora de la tolerancia frente a estreses abióticos como cierto incremento en la tolerancia al frío (Hsieh *et al.*, 2002) o cierto incremento en la tolerancia a la salinidad (Zhang y Blumwald, 2001). Además, por esta vía se han logrado tomates con una mayor calidad y periodo de conservación de los frutos (Behboodian *et al.*, 2012).

OBJETIVOS

En nuestro grupo se ha trabajado con diferentes técnicas de cultivo *in vitro* con tomate y algunas variedades silvestres relacionadas (aprovechamiento de la variación somaclonal, hibridación interespecífica, transformación genética, etc.). Para ello se ha puesto a punto métodos de regeneración ajustados para cada especie, técnica y tipo de explante. La mejora de la eficacia de estas metodologías permite trabajar de forma más eficiente en las técnicas de cultivo *in vitro*.

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

Por todo ello planteamos los siguientes objetivos:

- Profundizar en el conocimiento del proceso de regeneración adventicia analizando la capacidad morfogenética de diferentes genotipos de especies silvestres relacionadas con el tomate, en distintos medios y partiendo de diversos tipos de explantes.
- 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. Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal

En este trabajo se han empleado semillas de tres especies silvestres relacionadas con el tomate.

Solanum pimpinellifolium TO 937. Se encuentra, en forma silvestre o adventicia, principalmente en las zonas bajas de los valles de los ríos, desde el sur de Ecuador, a lo largo de la costa peruana, llegando a la zona fronteriza con Chile. Morfológicamente es muy similar a la especie cultivada, presentando semillas de menor tamaño y frutos de diámetro no mayor de 1,5 cm. En general, presentan hojas con márgenes poco aserrados e inflorescencias con un gran número de flores, lo que las distingue de la especie cultivada. Esta especie se puede cruzar en ambos sentidos con el tomate dando lugar a híbridos fértiles. Además, se ha comprobado que se ha introgresado genes, de forma natural, en la especie cultivada. La accesión TO-937 de *Solanum pimpinellifolium* fue cedida amablemente por el Dr. Rafael Hernández de IHSM La Mayora (UMA-CSIC).

Solanum lycopersicum var. *cerasiforme* SLC 6. Se cultiva en ocasiones para consumo humano y también puede encontrarse en forma adventicia en campos de cultivo de regadío o en zonas de elevada pluviometría. A pesar de que los límites para el tamaño del fruto se han establecido entre 1,5 y 3 cm, algunas poblaciones son altamente polimórficas en cuanto a forma y tamaño del fruto y de la hoja, siendo en muchas ocasiones difícil de distinguir los límites entre esta forma silvestre del tomate y *S. pimpinellifolium* o el propio tomate cultivado (Rick, 1973; Rick y Holle, 1990). La accesión SLC6 ha sido recolectada en México y se ha seleccionado por sus características morfogenéticas.

Solanum galapagense SG 19040. Es una especie endémica de las Islas Galápagos, donde ha evolucionado de forma independiente al resto de especies del género debido a su aislamiento geográfico. Prefiere bajas altitudes, con climas más secos y cálidos. Habita en suelos con una elevada salinidad y ha sido probada su resistencia a la salinidad. Por este motivo se ha aprovechado en programas de mejora encaminados al desarrollo de cultivares mejorados respecto a este carácter. La accesión SG 19040 de *Solanum galapagense* fue cedida amablemente por la Dra. M^a José Díez(UPV-COMAV).

3.2. Técnicas básicas de cultivo *in vitro*

El primer paso para comenzar los experimentos de este trabajo consistió en obtener plántulas axénicas, mediante la esterilización de semillas y su posterior cultivo.

3.2.1. Esterilización de semillas

Las plántulas axénicas se obtuvieron gracias a la esterilización de semillas. Para ello, previamente se esterilizaron en el autoclave cuatro botes de vidrio, tres de ellos con agua desionizada y uno vacío. Seguidamente se preparó una solución de lejía al 50% con 2 gotas de detergente 7X-0matic (Flow Laboratories) y se colocó en el recipiente vacío donde se sumergieron 40-50 semillas de cada accesión, durante 30 minutos. Trascurrido este tiempo, se eliminó la solución desinfectante pasando las semillas durante 5, 10 y 15 minutos por los recipientes con agua desionizada estéril. Este procedimiento se realizó en la cabina de flujo

laminar y se volvió a repetir el procedimiento anterior pasadas 24 horas para mejorar la germinación de las semillas.

3.2.2. Preparación y esterilización de los medios de cultivo

Los diferentes medios que se utilizaron en este trabajo para cultivar el material vegetal de forma axénica se elaboraron diluyendo en un vaso de precipitados los diversos componentes del medio en agua desionizada. Posteriormente, se ajustó el pH hasta 5,7 utilizando el pH-metro añadiendo HCl o KOH, dependiendo de la composición del medio. Para gelificar el medio de cultivo y que proporcionara un sostén adecuado al material vegetal, se empleó agar bacteriológico a una concentración de $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Para fundir el agar se utilizó el microondas y se procedió a distribuir en recipientes de vidrio. Finalmente, se esterilizaron los recipientes en el autoclave a 121°C (1 atm.) durante 20 minutos.

3.2.3. Trabajo en condiciones asépticas

La cabina de flujo laminar es un equipo en el que se fuerza el paso de aire a través de un filtro HEPA para eliminar toda partícula de más de 0,1 micras. Esto generó una corriente de aire limpio que iba desde el interior al exterior y dificultaba la entrada de contaminación ambiental. La superficie de la cabina se limpió con etanol antes de su uso para que la cabina hiciera su función correctamente, no se bloqueó el flujo de aire estéril colocando objetos entre el filtro y la zona de trabajo. Los instrumentos (bisturí y pinzas) utilizados para la manipulación del material vegetal se esterilizaron mediante un flameado con etanol. Por último, la superficie sobre la que se trabajó con el material vegetal fueron trozos de papel de filtro que habían sido esterilizados previamente en el autoclave.

3.2.4. Germinación de semillas

Finalizada la doble esterilización, las semillas se colocaron en placas Petri sobre dos papeles estériles recortados en forma circular y a los que se añadieron 9 mL de agua desionizada estéril. Posteriormente, se incubaron en la estufa durante dos días en oscuridad a 28°C para inducir la germinación. Tras la emisión de la radícula, se sembraron las semillas en medio de germinación (MG), colocando 10 semillas por bote (Tabla 1).

| COMPONENTES | CONCENTRACIÓN ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|-----------------|--|
| Sales minerales | MS ^a |
| Sacarosa | 10 |

Tabla 1. Componentes del medio de germinación utilizado para la germinación de semillas. ^a (Murashige y Skoog, 1962)

Los botes se introdujeron en la cámara de cultivo en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz – 8 horas de oscuridad, con una intensidad lumínica de 2000 luxes equivalente a $34 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) y temperatura constante de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.2.5. Cultivo de explantes de cotiledón y de ápices meristemáticos

Tras 7-10 días en el medio de germinación (MG) las semillas se habían desarrollado y se disponía de plántulas axénicas con los cotiledones expandidos. Se obtuvieron los explantes de cotiledón y el ápice meristemático de cada plántula. Los cotiledones se cultivaron en placas Petri con el envés en contacto con los diferentes medios de regeneración empleados. En estos medios utilizados se pretendía la formación de callos a partir de los cuales se desarrollen yemas, ápices y brotes. Las placas se cultivaron en condiciones de fotoperiodo por un periodo de 30 días.

Por otro lado, los ápices meristemáticos se cultivaron en botes de vidrio (105 mm de altura x 95 mm de diámetro) que contenían 40 mL de medio básico MB3, (Tabla 2). Los botes se cultivaron por un periodo de 15-20 días, para poder obtener los explantes de peciolo, peciolulo y limbo de hoja.

| COMPONENTES | CONCENTRACIÓN (g·L ⁻¹) |
|-----------------|------------------------------------|
| Sales minerales | MS ^a |
| Sacarosa | 30 |
| Inositol | 0,100 |
| Vitaminas SH | SH ^b |

Tabla 2. Componentes básicos del medio (MB3), utilizado en los experimentos de regeneración. ^a (Murashige y Skoog, 1962); ^b (Shahin, 1984).

3.2.6. Cultivo de peciolo, peciolulo y limbo de hoja

Tras 15-20 días de cultivo en medio básico (MB3) a partir de los ápices meristemáticos, se obtuvieron plantas axénicas de las tres accesiones y se obtuvieron el resto de explantes: peciolo, peciolulo y limbo. Estos explantes se cultivaron en placas Petri, con el envés, en el caso de los peciolulo y de limbo en contacto con los diferentes medios de regeneración empleados. En estos medios se pretendía la formación de callos a partir de los cuales se desarrollen yemas, ápices y brotes. Las placas se cultivaron en condiciones de fotoperiodo por un periodo de 30 días.

3.2.7. Tipos de explantes

En este trabajo se han utilizado cinco tipos de explantes. Los dos tipos de explantes de cotiledón procedían directamente de plántulas obtenidas en condiciones axénicas tras la germinación de semillas previamente esterilizadas (Figura 2A). Para ello se separaron los dos cotiledones de la plántula y se realizaron tres cortes, el primero eliminó la zona distal del cotiledón. Seguidamente, se realizó otro corte longitudinal por el nervio central y el último de forma transversal al nervio. Así se obtuvieron cuatro explantes, dos proximales (Figura 2A-1) y dos distales (Figura 2A-2), los más cercanos y lejanos al ápice, respectivamente. Los otros tres explantes procedían de plantas jóvenes obtenidas a partir del desarrollo del ápice meristemático de la plántula cultivado en medio MB3, (Figura 2B). Los explantes de peciolo se obtuvieron a partir de hojas expandidas y tenían un centímetro de longitud (Figura 2B-3). Los explantes de peciolulo se obtuvieron tras separar un foliolo del resto de la hoja y dejando parte del limbo de la hoja (Figura 2B-4). Los explantes de limbo se obtuvieron mediante cuatro cortes y en todos ellos se conservó el nervio central de la hoja (Figura 2B-5).

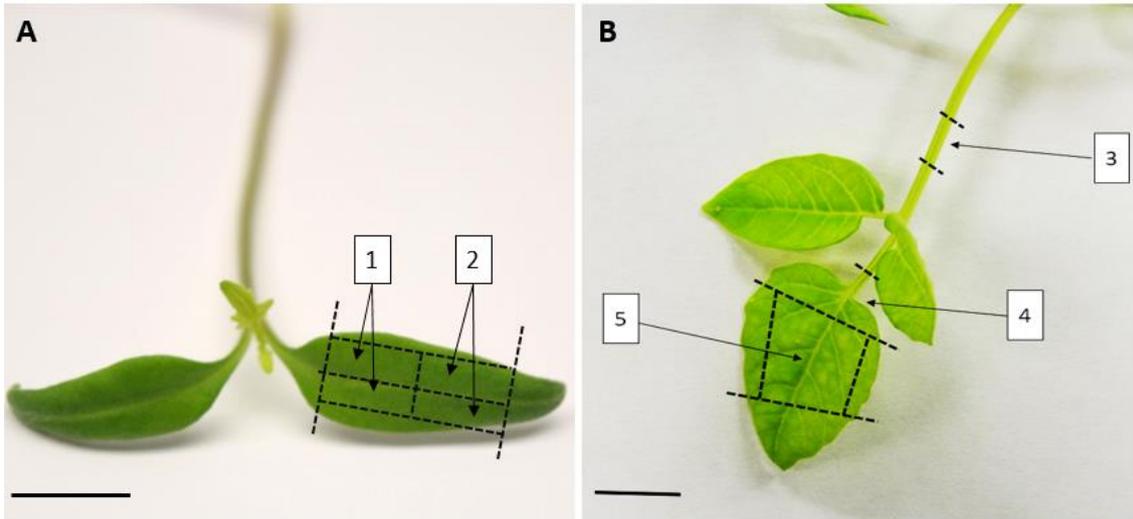


Figura 2. Tipos de explantes utilizados en los experimentos de regeneración. A.- Plántula axénica (1.-cotiledón proximal; 2.-cotiledón distal). B.-Hoja expandida de planta axénica (3.-peciolo, 4.-peciolulo, 5.- limbo). La barra representa 1 cm.

Se han cultivado 30 explantes de cada tipo por condición (5 tipos de explante – 18 combinaciones de medio x genotipo diferentes) para tener una medida representativa del comportamiento del material vegetal. Esto hace un total de 2700 explantes (1080 explantes de cotiledón y 1620 explantes procedentes de hoja). Una vez extraídos los explantes correspondientes se cultivaron en placas Petri (Figura 3).

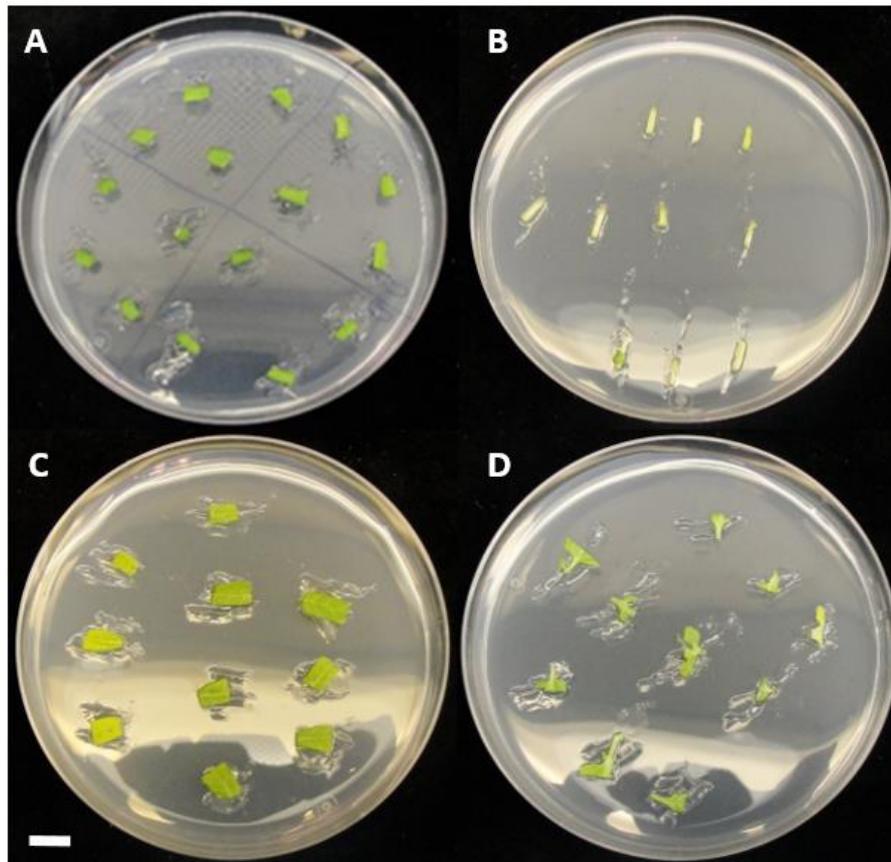


Figura 3. Cultivo de explantes de cotiledón proximal y distal (A), peciolo (B), limbo (C) y peciolulo (D). La barra representa 1 cm.

3.3. Citometría de flujo

Se analizó mediante citometría de flujo el patrón polisomático de los cotiledones de plántulas de las tres accesiones empleadas (7 días después de la germinación) y los niveles de ploidía de las plantas regeneradas a partir de ellos. Se eligió analizar el explante de cotiledón porque es el que suele presentar fenómenos de endoreduplicación con mayor frecuencia.

Para determinar el patrón polisomático de las muestras se utilizó la citometría de flujo siguiendo el método de Smulders y colaboradores (1994) que permite cuantificar el contenido de ADN nuclear de un gran número de células en muy poco tiempo. El primer paso fue fragmentar el material vegetal para la extracción de los núcleos. Se realizó mediante el empleo de una cuchilla en una placa Petri a la que se le añadió 200 μL de una solución tampón de extracción de núcleos (Nuclei extraction solution, Partec, Münster, Germany). A continuación, se añadió a la placa 800 μL de disolución que contenía 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de DAPI (4,6-diaminofenilindol) (DAPI staining solution, Partec), que permitió la tinción de los núcleos. Seguidamente se filtró el contenido de la placa haciéndolo pasar a través de una malla de nylon de 50 μm , de modo que se eliminaron los restos de tejido y se dejaron pasar solamente los núcleos celulares. La suspensión de núcleos resultante se hizo pasar por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Pliody Analyser), el cual utiliza una lámpara de mercurio para emitir luz UV a 366 nm de longitud de onda para iluminar los núcleos cuando pasan por una cámara de cuarzo. Esta luz excitó el DAPI de los núcleos teñidos al pasar por la cámara. La fluorescencia que emitió cada núcleo fue proporcional a la cantidad de ADN que contenía, la cual fue captada por el fotorreceptor del equipo.

Las medidas que se hicieron de cada uno de los núcleos llegaron al sistema electrónico. El software del citómetro representó, en tiempo real, por medio de un histograma, los resultados obtenidos. En el histograma se representó en el eje de las abscisas el valor de cada núcleo de acuerdo a la fluorescencia emitida y en el eje de ordenadas se contabilizó el número de núcleos con una intensidad comprendida entre dos valores. El citómetro no proporciona medidas absolutas por lo que se realizó un calibrado previo del equipo fijando el pico correspondiente de acuerdo al contenido de ADN 2C (Diploide en fase G1) para poder identificar los picos pertenecientes a las poblaciones celulares 2C, 4C, 8C.... Los histogramas con los porcentajes de poblaciones celulares se han obtenido a partir del cálculo de área del pico correspondiente a cada población celular (Programa Flomax).

3.3.1. Estudio del patrón polisomático del material de partida

Se analizó el patrón polisomático de los cotiledones de las plántulas de las tres accesiones a los 7 días de edad desde su siembra. En este trabajo se estudiaron por separado los dos tipos de explantes, proximal y distal para ver si tenían alguna característica diferencial.

3.3.2. Estudio del nivel de ploidía de las plantas regeneradas

Se analizó el nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de los explantes de cotiledón, tanto proximal como distal, de cada accesión. Para ello, los brotes se individualizaron del callo y se subcultivaron en diferentes medios para que elongasen. Una vez crecieron estas plantas regeneradas se cogió una muestra de hoja joven de cada una de ellas y se analizaron en el citómetro de flujo.

3.4. Regeneración de plantas

En los experimentos de regeneración de este trabajo se ha estudiado el desarrollo de yemas y brotes adventicios a partir de explantes sin meristemos preexistentes.

3.4.1. Tipos de medio de cultivo

En base a trabajos previos del grupo y a la bibliografía consultada se han diseñado diferentes medios de cultivo para cada accesión evaluada. Todos los medios de regeneración se prepararon a partir del medio MB3 (Tabla 2) al que se le añadieron las hormonas que favorecen la organogénesis (una auxina, el ácido indolacético y cuatro citoquininas diferentes) (Tabla 3).

| Medios de regeneración de TO 937 | Componentes (mg·L ⁻¹) | | | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|---|---|---|-----|
| | I | K | B | Z | TDZ |
| TDZ 1,0 | - | - | - | - | 0,5 |
| ITDZ 0,5 1,0 | 0,5 | - | - | - | 0,5 |
| TDZ 2,0 | - | - | - | - | 1 |
| ITDZ 0,5 2,0 | 0,5 | - | - | - | 1 |

| Medios de regeneración de SLC y SG | Componentes (mg·L ⁻¹) | | | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----|---|------|-----|
| | I | K | B | Z | TDZ |
| IKZ 4,0 4,0 1,0 | 4 | 4 | - | 0,25 | - |
| IKZ 2,0 2,0 1,0 | 2 | 2 | - | 0,25 | - |
| IKZ 1,0 1,0 1,0 | 1 | 1 | - | 0,25 | - |
| IKZ 0,5 0,5 1,0 | 0,5 | 0,5 | - | 0,25 | - |
| IBZ 0,5 2,0 1,0 | 0,5 | - | 2 | 0,25 | - |
| IB 0,5 2,0 | 0,5 | - | 2 | - | - |
| IZ 0,5 1,0 | 0,5 | - | - | 0,25 | - |

Tabla 3. Composición hormonal de los diferentes medios de cultivo utilizados en los ensayos de regeneración. Los medios se nombran con las iniciales de las hormonas que portan (I, K, B, Z, TDZ), respectivamente. (I: ácido indolacético; K: kinetina; B: 6-benciladenina; Z: zeatina; TDZ: thidiazuron).

3.4.2. Evaluación de la regeneración

La evaluación de la regeneración se realizó treinta días después del cultivo de los explantes. Durante este proceso se hizo un seguimiento de la respuesta organogénica de los explantes. En la organogénesis adventicia, se distinguen cuatro fases, la formación de callo desorganizado y el desarrollo de yemas, ápices y brotes. El callo desorganizado surge en las zonas de corte a partir del crecimiento y división activa de células desdiferenciadas. Las yemas, se desarrollan a partir de células que se organizan en estructuras meristemáticas. Estas yemas forman los ápices, en los cuales ya se distinguen las primeras hojas pero que todavía no tienen un tallo elongado. Finalmente, la elongación de los ápices produce la aparición de los brotes que constan de una estructura en la que se pueden observar hojas y un tallo elongado que permite que se aisle del callo organogénico para que enraíce y obtener así una planta entera (Figura 4).

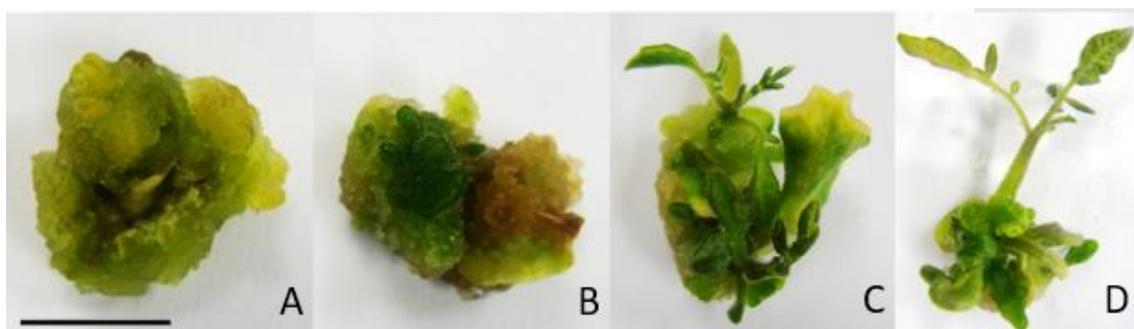


Figura 4. Explantes de cotiledón del genotipo *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC 6), a los 30 días del cultivo en medio organogénico. (A) callo desorganizado, (B) yemas, (C) ápice y (D) brote. La barra representa 1 cm.

Al finalizar los treinta días de cultivo se evaluaron los explantes y se anotó, para cada explante, la etapa más avanzada del desarrollo organogénico que había alcanzado: callo desorganizado, yemas, ápices o brotes. Además, se contabilizó el número de brotes por cada explante.

Finalmente, a partir de los datos de cada uno de los explantes cultivados, se calculó la eficacia de regeneración (explantes con desarrollo organogénico (yemas, ápices o brotes) / explantes totales), el número de brotes por explante de partida (NB/EP) y el número de brotes por explante con callo organogénico con al menos un brote (NB/CB).

Para llevar a cabo este análisis, incluyendo los cálculos de errores estándar utilizados en algunas figuras y gráficas, se ha empleado el programa Excel

4. Resultados y Discusión

4.1. Esterilización y germinación de semillas de tomate en condiciones axénicas

El material vegetal de partida en todos los experimentos de este trabajo han sido semillas de las tres accesiones. Se han esterilizado más de 200 semillas de cada accesión y la contaminación detectada no fue superior al 5% en ninguna tanda. Por tanto, la metodología de esterilización es capaz de eliminar la mayor parte de la contaminación presente en el material de partida. Por otra parte, la tasa de germinación de las tres accesiones en los diferentes experimentos fue superior al 80%. Por último, el método de germinación utilizado se considera adecuado ya que permite obtener el material axénico necesario para llevar a cabo el resto de experimentos.

4.2. Estudio sobre patrón polisomático del material de partida

Como ya se ha comentado, es importante conocer el patrón polisomático de los tejidos que se van a utilizar como explantes de partida para la regeneración. Su comparación con el porcentaje de plantas tetraploides regeneradas nos puede dar una medida de la importancia de la variación somaclonal al regenerar plantas en determinadas condiciones.

Antes de mostrar los resultados obtenidos y para ilustrar cómo se detecta la incidencia de fenómenos de endorreduplicación en los explantes empleados, se han seleccionado dos histogramas producidos por el citómetro de flujo al analizar sendas muestras sin (Figura 5A) y con endorreduplicación (Figura 5B). En la gráfica A, se ve un pico (2C) correspondiente a una población de células diploide en fase G1 y el segundo pico (4C) corresponde a una población de células diploides en fase G2, es decir, células que han duplicado su dotación cromosómica antes de dividirse. En la gráfica B, se ve un pico (2C) correspondiente a la población de células diploides en fase G1, el segundo pico (4C) corresponde a dos poblaciones celulares, una diploide en fase G2 y otra tetraploide en fase G1. Además, aparece un nuevo pico (8C) que corresponde con las células tetraploides en fase G2.

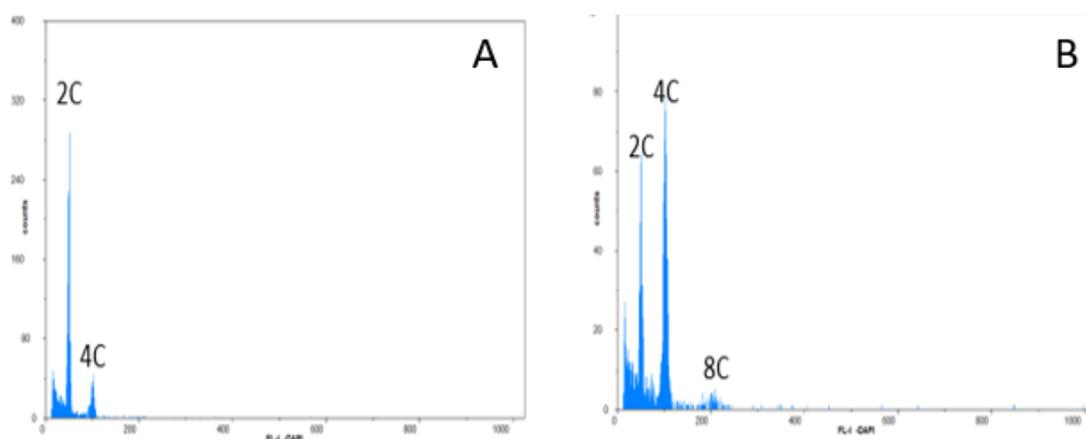


Figura 5. Patrón polisomático de explantes procedentes de una planta diploide que no presentan endorreduplicación (A) y con endorreduplicación (B). Cada gráfica representa la distribución de al menos 5000 núcleos celulares.

En resumen, en el primer caso (Figura 5A) sólo se ha detectado una población de células diploides y los dos picos corresponden a esas células en fase G1 y en fase G2. Por tanto, se puede

afirmar que, en ese caso, no se han producido fenómenos de endorreduplicación. Sin embargo, en la segunda gráfica aparecen tres picos que corresponden a dos poblaciones celulares, diploides y tetraploides. El origen de estas últimas es la endorreduplicación, es decir, la duplicación del material genético sin la división celular posterior. Por tanto, se puede afirmar que en ese tejido ha habido algunas células que han sufrido un ciclo de endorreduplicación y por eso tienen el doble de cantidad de ADN que las células diploides de las que se originaron. Cuanto mayor sea el porcentaje de células 8C y menor el de células 2C mayor habrá sido la incidencia de la endorreduplicación en ese tejido.

El análisis del patrón polisomático del material de partida se realizó en los explantes de cotiledón de las plántulas con siete días de cultivo en medio de germinación. Se decidió utilizar estos explantes porque en trabajos anteriores se vio que son los que pueden presentar con mayor frecuencia la aparición de variantes somaclonales. El análisis del patrón polisomático de los cotiledones dio como resultado que estos tejidos presentan picos 2C, 4C y 8C. Esto quiere decir que se han producido fenómenos de endorreduplicación dando como consecuencia la formación de células tetraploides. En la Figura 6 se observa que en todos los tejidos analizados las células mayoritarias fueron aquellas que tienen 2 y 4 complementos cromosómicos (2C y 4C). El cotiledón distal tiene un 60% de células 2C y un 4% de células 8C. Sin embargo, el cotiledón proximal tiene un 40% de células 2C y un 12% de 8C (Figura 6 A).

Al hacer la comparación entre los genotipos analizados se observó que TO 937 contiene un 60% de células 2C y un 4% de 8C. De forma similar, la accesión SLC 6 contiene un 55% de células 2C y un 4% de 8C. Por último, el patrón polisomático de cotiledón del SG 19040 está compuesto por un 36% de células 2C y un 13% de 8C (Figura 6B).

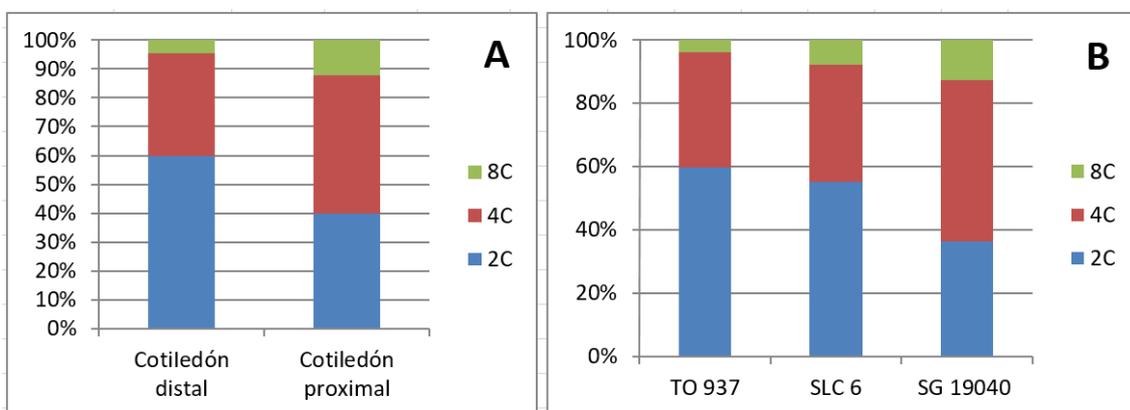


Figura 6. Patrón polisomático de los explantes de cotiledón que se emplean como material de partida para la regeneración de plantas. Se representa el porcentaje de células 2C, 4C y 8C de los cotiledones proximal y distal (A) y de las tres accesiones analizadas (B). Datos obtenidos a partir del estudio de tres muestras biológicas independientes para cada condición con al menos 5000 núcleos celulares analizados en cada muestra.

Al comparar los patrones polisomáticos de la parte proximal y distal del cotiledón (Figura 6 A), se observa que el cotiledón distal tiene un mayor porcentaje (60%) de células 2C que el cotiledón proximal (40%) y un menor porcentaje de células 8C (5% respecto 12%). Según este resultado las células del cotiledón distal han sufrido en menor medida procesos de endorreduplicación que el proximal por lo que hay una mayor proporción de células diploides. Tras la regeneración de brotes a partir de ambos tipos de explantes habrá que ver cuál es la influencia de esta diferencia en el nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

Por otra parte, al comparar los patrones polisomáticos de las tres accesiones, se observó que los cotiledones de las accesiones TO 937 y SLC 6 tienen elevados porcentajes de células 2C (60% y 55% respectivamente) y bajos de células 8C (4% y 8% respectivamente). En cambio, los cotiledones de la accesión SG 19040, tiene un porcentaje menor de células 2C (36%) y una cantidad elevada de células 8C (13%). Esto incide en la importancia que tiene el genotipo en este tipo de estudios. Además, para ver el impacto que pueden tener estas características iniciales en el nivel de ploidía de las plantas regeneradas habrá que analizar una población significativa de éstas para comprobar si el patrón polisomático de los explantes de partida repercute en la presencia de variantes somaclonales (4n).

4.3. Evaluación de la capacidad organogénica del tomate

La finalidad de estos experimentos fue evaluar la capacidad organogénica de las tres accesiones relacionadas con tomate (TO 937, SLC6 y SG 19040). En concreto, se pretendía evaluar el efecto del tipo de explante y el medio organogénico sobre la regeneración para poder seleccionar las condiciones más favorables. Durante la primera semana los explantes engrosaban y se expandían llegando a doblar su tamaño respecto al explante original. Además, se apreciaba la formación de callo desorganizado en las zonas de corte, formado por células desdiferenciadas. Seguidamente se empezaron a formar estructuras organogénicas de color verde intenso. En primer lugar, se formaron las yemas adventicias, éstas dieron lugar a los ápices que siguieron su desarrollo hasta la producción de brotes (Figura 7). Estas estructuras ya podían ser individualizadas y cultivadas en un medio de enraizamiento para obtener una planta axénica completa.

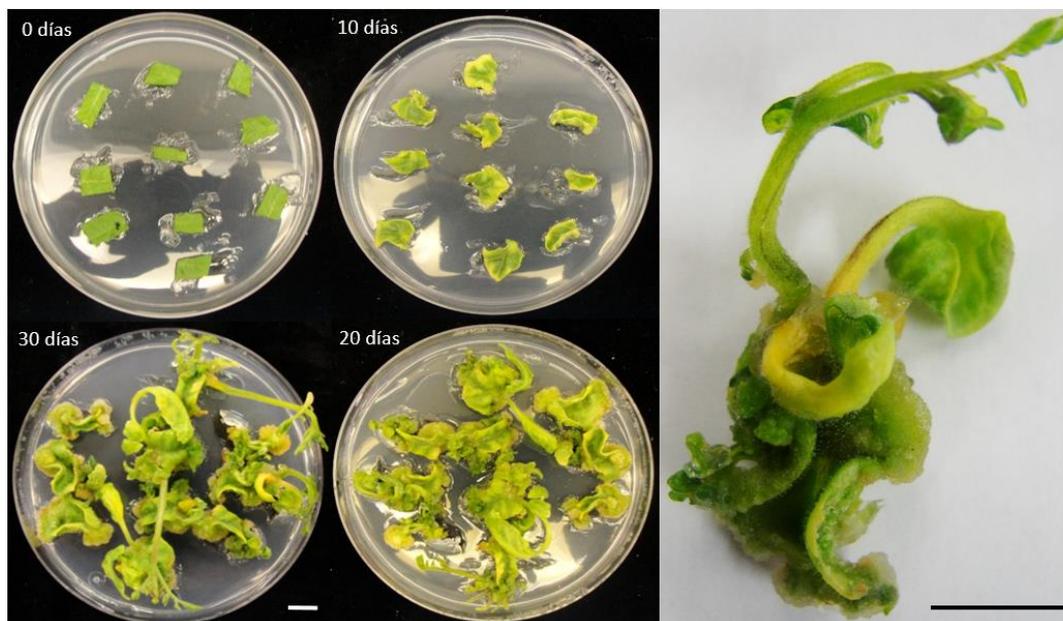


Figura 7. Desarrollo de explantes de limbo de hoja de la accesión SG 19040 en medio organogénico (izquierda). Detalle de explante de limbo con regeneración adventicia a los 30 días de cultivo (derecha). La barra representa 1cm.

Para evaluar este tipo de respuesta se han analizado tanto la eficacia de regeneración (número de explantes con alguna estructura morfogenética: yemas, ápices o brotes) como el número de brotes obtenidos tras 30 días de cultivo

4.3.1. Eficacia de regeneración a partir de explantes de cotiledón

En este experimento se ha evaluado la eficacia de regeneración de los explantes de cotiledón en función de diferentes factores. En primer lugar, cabe resaltar que la parte proximal presentó mayor eficacia de regeneración (89%) que la parte distal (79%) (Figura 8).

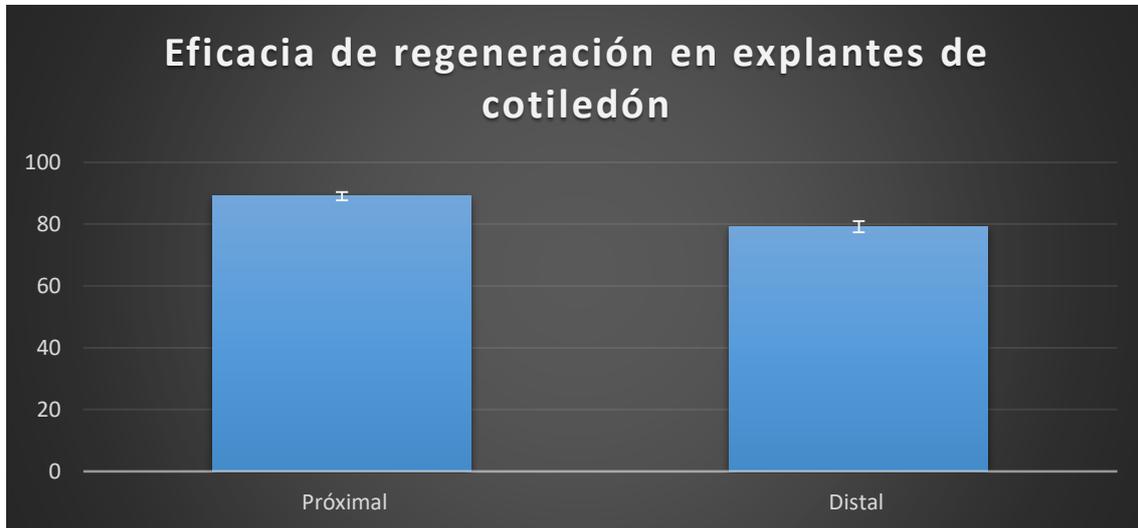


Figura 8. Eficacia de regeneración de los explantes proximales y distales de cotiledón de las tres accesiones utilizadas. La barra muestra el error estándar.

Este resultado reafirma la importancia del tipo de explante en este tipo de procesos y es similar al obtenido con otras especies relacionadas con tomate y con algunas especies de cucurbitáceas en nuestro grupo (datos no mostrados). La explicación de este comportamiento diferencial podría deberse a la presencia, en la parte proximal del explante, de ciertos tipos celulares con mayor capacidad morfogenética. Otra posible explicación podría ser una concentración endógena de hormonas vegetales diferente entre ambos tipos de explante.

Por otro lado, se ha analizado el comportamiento de los explantes de cotiledón de las tres accesiones utilizadas en este trabajo. La accesión SG 19040 presentó la eficacia de regeneración más alta con casi un 95%. Sin embargo, la accesión TO 937 fue la que mostró una menor eficacia de regeneración no llegando al 80% (Figura 9).

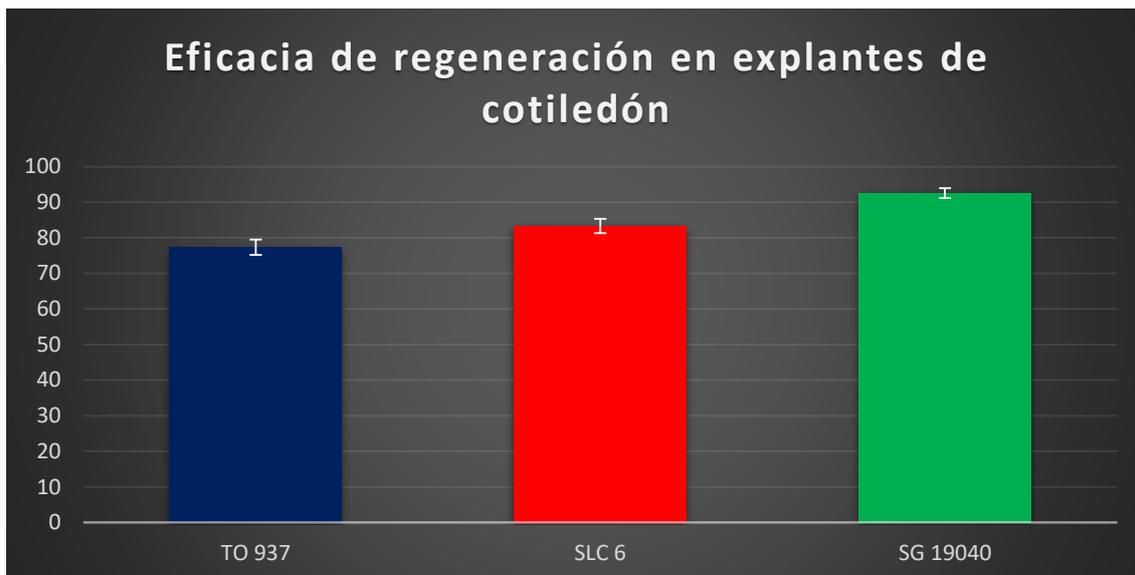


Figura 9. Eficacia de regeneración en explantes de cotiledón de las tres accesiones utilizadas. La barra muestra el error estándar.

Esta diferencia en la respuesta morfológica en función del genotipo se ha visto en múltiples trabajos de investigación. En este sentido, cabe destacar que estas diferencias se han observado no solamente entre especies sino también entre accesiones diferentes de la misma especie. Esta dependencia del genotipo hace necesario el ajuste para cada material vegetal de las condiciones óptimas de regeneración. Para poder llevar a cabo un análisis más pormenorizado de estos resultados a continuación se expondrán los de cada accesión por separado.

En cuanto a los medios organogénicos utilizados con los explantes de cotiledón de la accesión TO 937, presentaron una eficacia de regeneración que varió entre el 60% y el 90%. En esta accesión los medios con ácido indolacético (ITDZ) presentaron una eficacia de regeneración superior que los medios sin esta auxina (TDZ) (Figura 10).

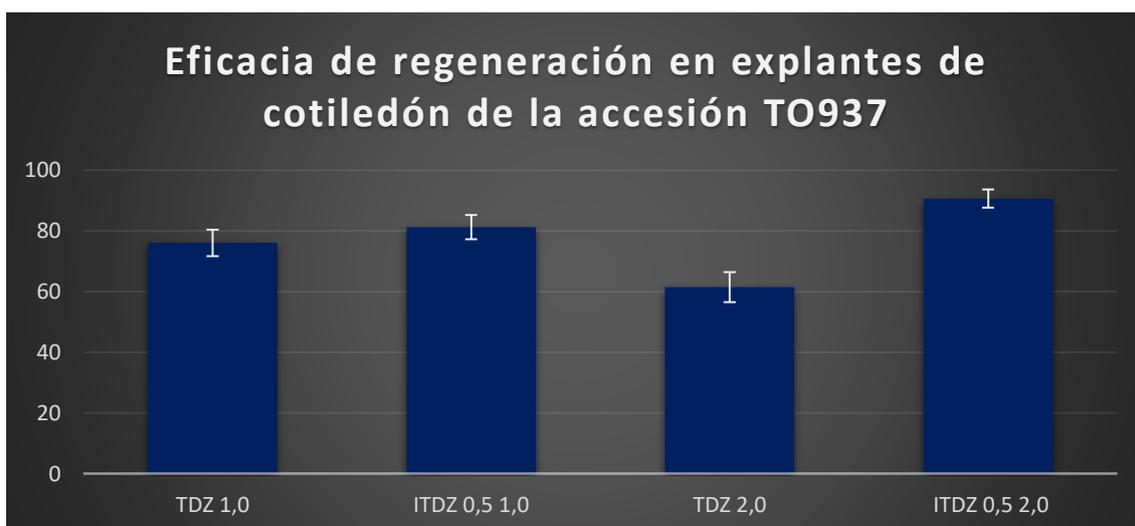


Figura 10. Eficacia de regeneración en explantes de cotiledón de la accesión TO937 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar.

Diferentes investigadores han concluido que el callo organogénico se puede inducir en medios con alta concentración de citoquininas y niveles moderados de auxinas (Hille *et al.*, 1989; Gubis *et al.*, 2003; Raj *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2003). Por último, cabe destacar que en esta accesión la condición que proporcionaba las mejores condiciones para la regeneración fue el medio ITDZ 0,5 2,0 con, al contrario de la tendencia habitual, el empleo de explantes distales (96%).

En cuanto a los medios organogénicos utilizados con los explantes de cotiledón de la accesión SLC 6, presentaron una eficacia de regeneración que varió entre el 48% y el 98%. En este caso se llegó al 100% de eficacia en la parte proximal del cotiledón en cuatro de los siete medios utilizados. Según nuestros resultados, el medio IKZ 4,0 4,0 1,0 presentó una eficacia de regeneración menor en comparación con los otros tres medios de composición similar (Figura 11).

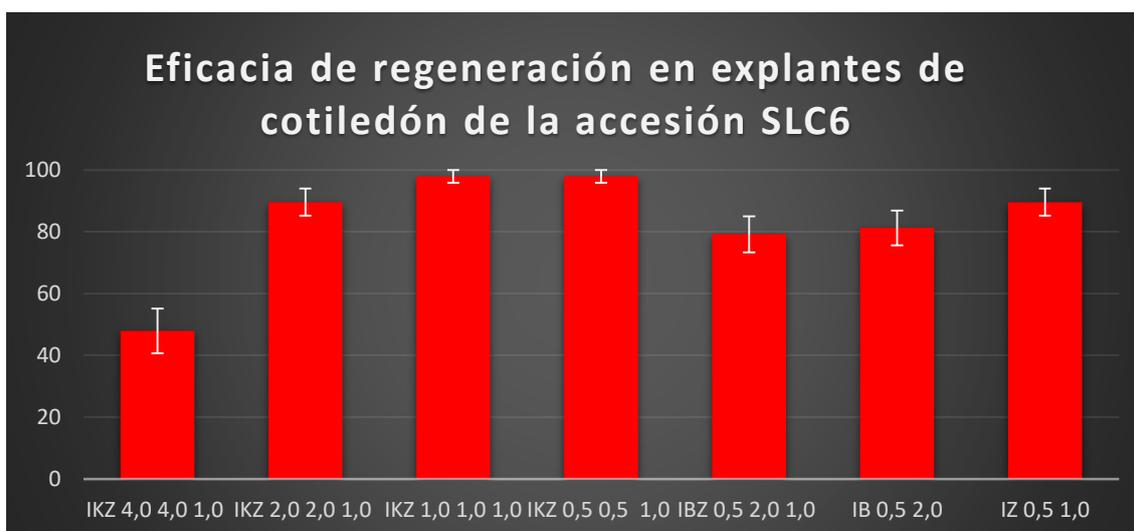


Figura 11. Eficacia de regeneración en explantes de cotiledón de la accesión SLC 6 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar.

Este resultado es muy interesante ya que en nuestro grupo utilizamos el medio IKZ 4,0 4,0 1,0 como medio de referencia para la regeneración de distintas variedades de tomate. Por tanto, estos experimentos demuestran que SLC 6 es capaz de regenerar mejor en medios IKZ con baja concentración de ácido indolacético y kinetina o en medios donde se cambie la kinetina por otras citoquininas como la 6-benciladenina o, directamente, se elimine.

Nuestros resultados para esta accesión son similares a los obtenidos por Otroshy y colaboradores (2013). En este trabajo se obtuvieron eficacias de regeneración del 45% y el 95%, con una máxima eficacia de regeneración en el medio IB 0,5 2,0, uno de los que nos han dado una mayor eficacia de regeneración. Todos estos resultados constataron de nuevo que la combinación de hormonas a una concentración adecuada en el medio es un factor clave para la mejora de la eficacia de regeneración.

Por último, en cuanto a los medios organogénicos utilizados con los explantes de cotiledón de la accesión SG 19040, presentaron una eficacia de regeneración que varió entre el 80% y el 100%. En este caso destacó el medio de regeneración IB 0,5 2,0 con una eficacia de regeneración del 100%, tanto para la parte proximal como la distal del cotiledón (Figura 12).

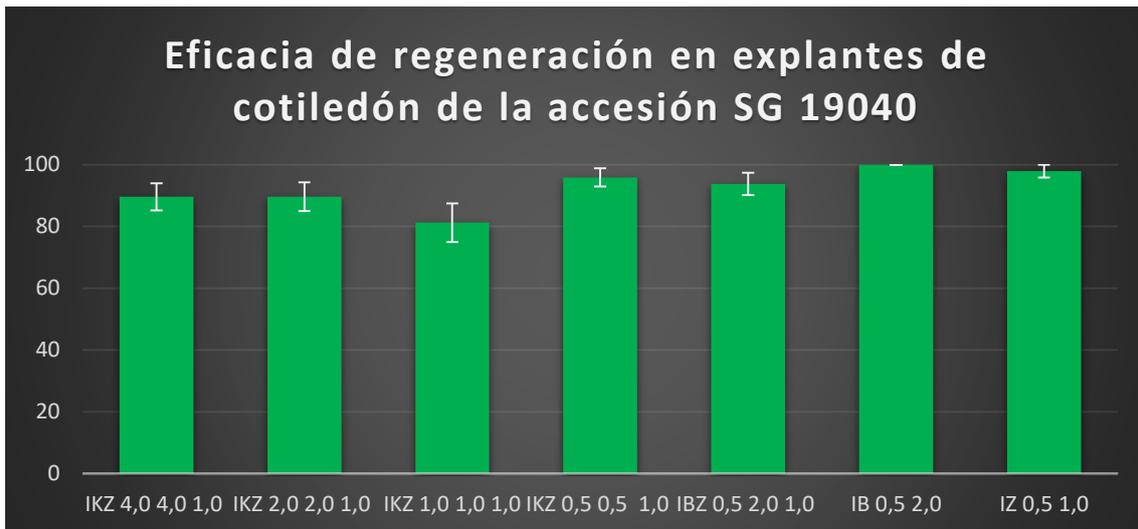


Figura 12. Eficacia de regeneración en explantes de cotiledón de la accesión SG 19040 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar.

Este resultado nos aportó una ventaja adicional, la posibilidad de usar un medio con alto potencial morfogénico para el que no es necesario usar zeatina, uno de los reactivos más caros con los que trabajamos.

4.3.2. Eficacia de regeneración a partir de explantes de hoja

En este experimento se ha evaluado la eficacia de regeneración (explantes con crecimiento organogénico / explantes totales) de explantes de peciolo, peciolulo y limbo. Los explantes de peciolulo son los que presentaron una mayor eficacia de regeneración (95%), seguido de los explantes de limbo (92%) y finalmente los explantes de peciolo (77%) (Figura 13).

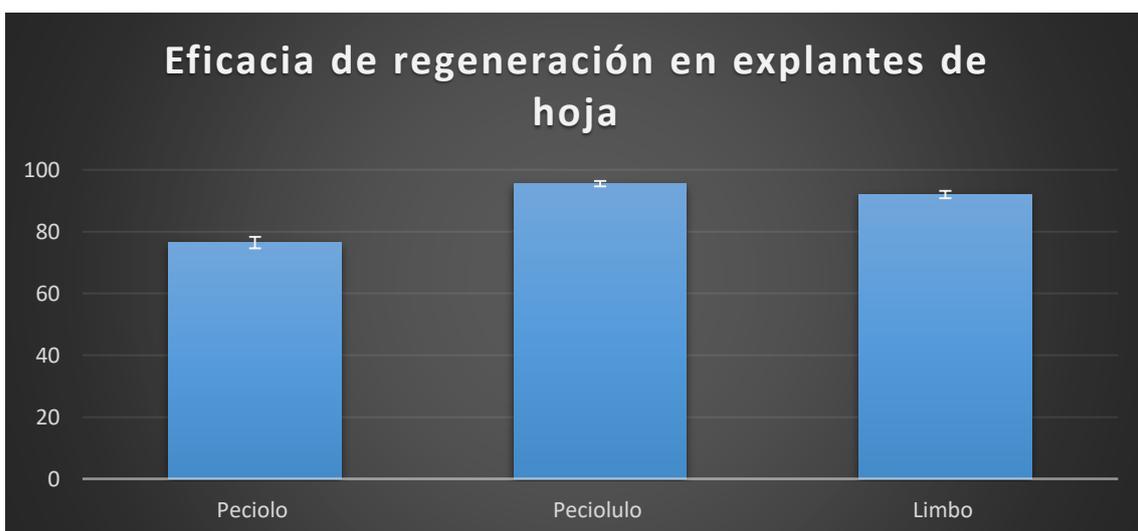


Figura 13. Eficacia de regeneración de los explantes de peciolo, peciolulo y de limbo de las tres accesiones utilizadas. La barra muestra el error estándar.

Estas eficacias de regeneración son más altas que las obtenidas por Gubis y colaboradores (2003), que trabajaron con seis tipos diferente de explantes de trece 13 cultivares de tomate. Las eficacias de regeneración obtenidas para los explantes de peciolo estaban entre

el 0% y el 60% y para los de limbo entre el 3% y el 100%. Es de destacar el resultado que hemos obtenido con el explante de peciolulo ya que no se ha encontrado ningún trabajo previo que haya utilizado este tipo de explante en tomate o especies relacionadas. Se ha podido comprobar cómo este explante ha dado un resultado excelente y mejora el comportamiento de los explantes que tradicionalmente se han venido utilizando cuando se parte de hoja (limbo y peciolo). De nuevo se pone de manifiesto el interés que tiene este tipo de trabajos ya que se pueden obtener mejoras significativas en las metodologías empleadas mediante la elección adecuada del tipo de explante.

Por otro lado, se analizó el comportamiento de las tres accesiones utilizadas en este trabajo. De nuevo se apreció la influencia del genotipo ya que la accesión que mejores resultados dio fue la SG 19040 (Figura 14) al igual que ocurrió con los explantes de cotiledón (Figura 9).



Figura 14. Eficacia de regeneración en explantes de hoja de las tres accesiones utilizadas. La barra muestra el error estándar.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Lu y colaboradores (1997), quienes encontraron que el genotipo tiene un efecto importante en la inducción y regeneración del callo. Nandakumar y colaboradores (1991) también observaron que la formación y regeneración de callos varía con el genotipo. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo indican que el peciolulo es el explante que mejor se comporta seguido del limbo y de los cotiledones. Duzyaman y colaboradores (1994) que trabajaron con otras accesiones diferentes también afirmaron que la eficacia de regeneración depende del tipo de explante.

En cuanto a los medios organogénicos utilizados con los tres diferentes tipos de explantes, todos presentaron una eficacia de regeneración que varió entre el 40% y el 100%.

En la accesión TO 937, los medios con ácido indolacético, al igual que pasaba con los explantes de cotiledón (Figura 10) dieron una eficacia de regeneración superior que los medios sin esta auxina (Figura 15).

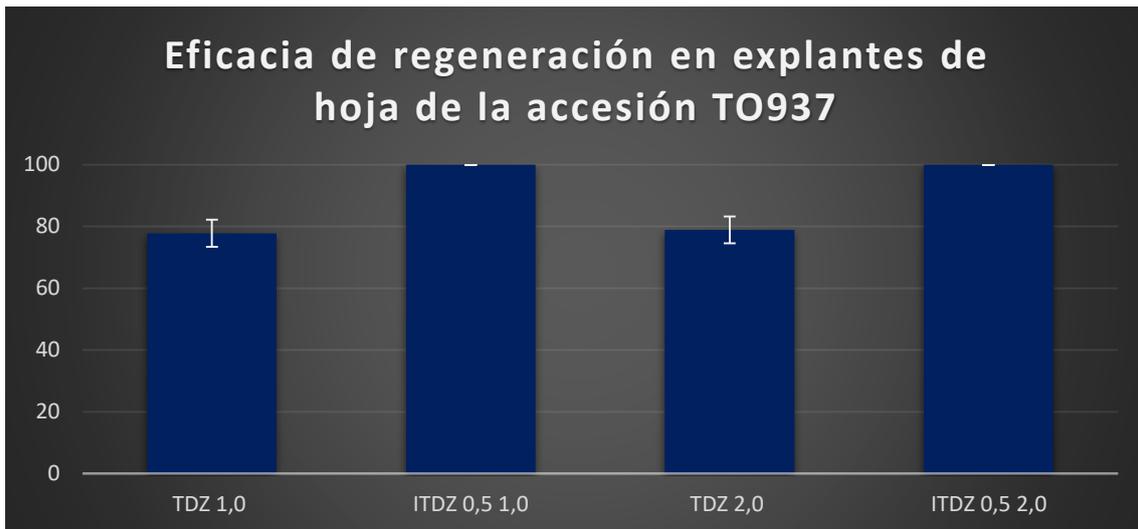


Figura 15. Eficacia de regeneración en explantes de hoja de la accesión TO 937 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar.

En referencia a la accesión SLC 6, para los siete medios de regeneración utilizados la eficacia de regeneración es variable. Según reflejaron los datos, el medio IKZ 4,0 4,0 1,0 presentó una eficacia de regeneración superior al resto (Figura 16) al contrario de lo que ocurrió con los explantes de cotiledón donde medios con menores concentraciones de ácido indolacético y de kinetina dieron eficacias de regeneración superiores (Figura 11).

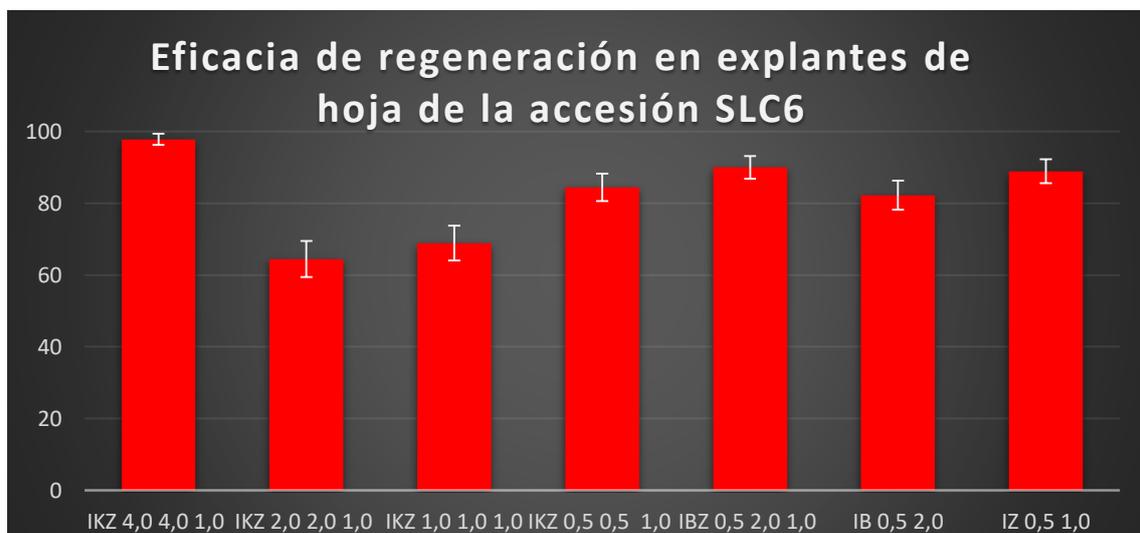


Figura 16. Eficacia de regeneración en explantes de hoja de la accesión SLC 6 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar.

Por último, la accesión SG 19040 presentó en promedio la eficacia de regeneración más alta de las tres, tal y cómo se observa en la (Figura 14). Como se observa, cinco de los siete medios de regeneración utilizados presentan una tasa de regeneración superior al 90% (Figura 17).

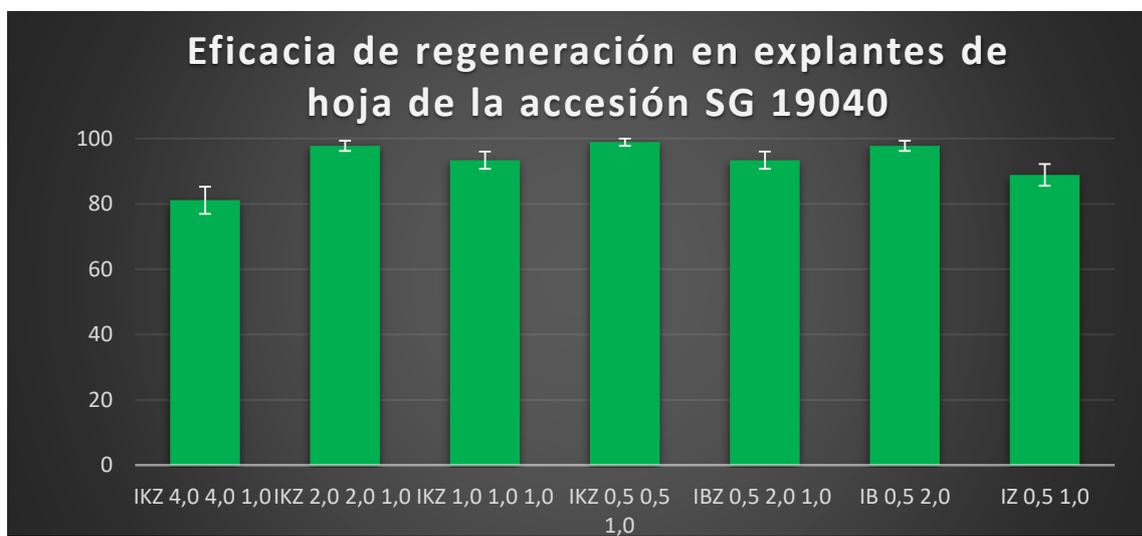


Figura 17. Eficacia de regeneración en explantes de hoja de la accesión SG 1904 en función del medio de cultivo utilizado. La barra muestra el error estándar.

En conclusión, tras estos experimentos se han podido determinar las mejores condiciones para obtener elevadas eficacias de regeneración a partir de diferentes tipos de explante en los tres genotipos evaluados. Sin embargo, es necesario matizar este resultado con alguna medición del número de brotes que se han regenerado en cada condición.

4.3.3. Número de brotes regenerados a partir de los explantes de cotiledón

En el apartado anterior se ha analizado la eficacia de regeneración, sin embargo, el proceso de regeneración mediante organogénesis adventicia finaliza con la producción de brotes. Por tanto, también se ha evaluado el número de brotes por explante de partida (NB/EP) que mide la cantidad de explantes que se debería cultivar para regenerar determinado número de plantas. Así, por ejemplo, una tasa NB/EP de 0,5 quiere decir que para conseguir regenerar 50 brotes en 30 días debería cultivar 100 explantes. Por otra parte, también se ha medido el número de brotes por explante con al menos un brote en el callo organogénico (NB/CB). Esta variable da una idea de cómo es el callo organogénico que ha dado brotes, es decir, si es muy prolífico y da muchos brotes o si cada callo sólo es capaz de producir un brote. Esta información es muy importante a la hora de aplicar esta metodología en técnicas como la transformación genética.

Tras analizar los 1080 explantes de cotiledón, se apreció la influencia del tipo de explante en la regeneración de brotes siendo el explante proximal el que logró más brotes por explante de partida (Tabla 4).

| Tipo de explante | NB/EP | NB/CB |
|--------------------|-------|-------|
| Cotiledón proximal | 0,22 | 1,38 |
| Cotiledón distal | 0,10 | 1,34 |

Tabla 4. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante de cotiledón con algún brote (NB/CB).

Este resultado demuestra el interés que tiene el empleo del cotiledón proximal frente al distal en este material vegetal. En concreto, tras treinta días de cultivo ya hay brotes en uno de cada cinco explantes de cotiledón proximal mientras que en los cotiledones distales sólo podríamos recuperar brotes en uno de cada diez explantes de partida. De hecho, en nuestro grupo, para algunas aplicaciones en las que queremos regenerar lo más rápidamente posible descartamos los explantes distales y trabajamos solamente con los proximales.

En general, la accesión que dio más brotes por explantes de partida fue SLC 6, seguida de SG 19040 y, por último, TO 937 (Tabla 5).

| Accesión | NB/EP | NB/CB |
|----------|-------|-------|
| TO 937 | 0,08 | 1,51 |
| SLC 6 | 0,27 | 1,48 |
| SG 19040 | 0,16 | 1,13 |

Tabla 5. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de cotiledón de las tres accesiones utilizadas.

Se comprobó que la accesión SG 19040, aunque era la que tenía una eficacia de regeneración más alta de las tres accesiones (Figura 9), no era la que presentaba la mayor cantidad de brotes por explante. Esto se puede explicar simplemente por el ritmo de crecimiento ya que, a igualdad en la eficacia de regeneración, una accesión con una mayor velocidad en el desarrollo de sus estructuras organogénicas presentará mayor cantidad de explantes con brotes en un momento concreto.

De forma similar una accesión con un crecimiento muy lento podría tener una eficacia de regeneración elevada y, sin embargo, no haber formado ningún brote en el momento de la lectura del experimento. En este caso, la accesión TO 937 no ha producido ningún brote en uno de los medios evaluados (Tabla 6) en los que presentó una eficacia de regeneración cercana al 90% (Figura 10). Probablemente en esta condición con elevada concentración de una citoquinina sea necesario dejar los explantes durante más tiempo para que las yemas y los ápices puedan convertirse en brotes.

| Medio | (NB/EP) | (NB/CB) |
|--------------|---------|---------|
| TDZ 1,0 | 0,20 | 1,36 |
| ITDZ 0,5 1,0 | 0,04 | 1,33 |
| TDZ 2,0 | 0,08 | 2,00 |
| ITDZ 0,5 2,0 | 0,00 | 0,00 |

Tabla 6. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de cotiledón de la accesión TO 937 en función del medio de cultivo utilizado.

En la accesión SLC 6 el número medio de brotes por explante varió entre 0,06 y 0,63. El medio de regeneración IKZ 2,0 2,0 1,0, fue el que presentó la frecuencia más alta de brotes por explante de partida (Tabla 7).

Al comparar los resultados de los medios de regeneración IKZ 1,0 1,0 1,0 e IBZ 0,5 2,0 1,0, se observa que presentaron un número de brotes por explante de partida muy similar (0,29 y 0,27). Sin embargo, los callos organogénicos que producen son muy diferentes, el IKZ dio un callo organogénico poco prolífico (1,27 brotes / explante con al menos un brote) mientras que el IBZ daba callos que producían varios brotes por callo con brote. Por tanto, según cuál es el objetivo que se persigue se podría optar por una opción u otra.

| Medio | NB/EP | NB/CB |
|-----------------|-------|-------|
| IKZ 4,0 4,0 1,0 | 0,21 | 1,43 |
| IKZ 2,0 2,0 1,0 | 0,63 | 1,67 |
| IKZ 1,0 1,0 1,0 | 0,29 | 1,27 |
| IKZ 0,5 0,5 1,0 | 0,08 | 1,33 |
| IBZ 0,5 2,0 1,0 | 0,27 | 2,60 |
| IB 0,5 2,0 | 0,06 | 1,00 |
| IZ 0,5 1,0 | 0,31 | 1,25 |

Tabla 7. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de cotiledón de la accesión SLC 6 en función del medio de cultivo utilizado.

Por último, en la accesión SG 19040, el número medio de brotes regenerados de cada explante de partida varió entre 0,08 y 0,23 y el número de brotes regenerados de cada explante con al menos un brote fluctuó entre 1 y 1,22 (Tabla 8). Los medios de regeneración IKZ 2,0 2,0 1,0 e IB 0,5 2,0 presentaron la frecuencia más alta de brotes por explante de partida 0,23. Es importante mencionar que para los explantes distales del medio IB 0,5 2,0 la eficacia de regeneración fue del 100% aunque a los 30 días no se había formado ni un solo brote. De nuevo aparece el factor momento de lectura como un aspecto clave a la hora de interpretar los resultados de estos experimentos.

| Medio | NB/EP | NB/CB |
|-----------------|-------|-------|
| IKZ 4,0 4,0 1,0 | 0,08 | 1,00 |
| IKZ 2,0 2,0 1,0 | 0,23 | 1,22 |
| IKZ 1,0 1,0 1,0 | 0,13 | 1,20 |
| IKZ 0,5 0,5 1,0 | 0,08 | 1,00 |
| IBZ 0,5 2,0 1,0 | 0,15 | 1,00 |
| IB 0,5 2,0 | 0,23 | 1,10 |
| IZ 0,5 1,0 | 0,19 | 1,29 |

Tabla 8. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de cotiledón de la accesión SG 19040 en función del medio de cultivo utilizado.

En las tres accesiones se han obtenido, para el cotiledón, un número de brotes por explante de partida comprendido entre 0,08 y 0,63. Estos resultados son similares a los obtenidos por Gubis y colaboradores (2003) que consiguieron tasas de entre el 0,08 y el 1.

4.3.4. Número de brotes regenerados a partir de los explantes de hoja

Se evaluaron estas mismas variables en los 1620 explantes procedentes de hojas de las tres accesiones. En este caso se apreció la influencia del tipo de explante de partida en la capacidad organogénica, siendo el peciolulo el que más brotes logró (0,6) por explante de partida (Tabla 9).

| Tipo de explante | NB/ET | NB/CB |
|------------------|-------|-------|
| Peciolulo | 0,44 | 1,53 |
| Peciolulo | 0,60 | 1,65 |
| Limbo | 0,39 | 1,46 |

Tabla 9. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de hoja.

La accesión que logró más brotes por explante de peciolulo fue SG 19040 (7 de cada 10), seguido de TO937 y SLC 6. Estos datos confirman que el peciolulo tiene una capacidad para la formación de brotes muy elevada. Cabe destacar también que, según los resultados de la Figura 13, el peciolulo tiene la eficacia de regeneración más alta que el peciolo y también se transforma en una capacidad para la formación de brotes más alta.

Los datos de regeneración indicaron que la accesión SG 19040, que tuvo la eficacia de regeneración más alta (Figura 14) para los tres tipos de explantes, también es la que presentó la mayor capacidad para la formación de brotes (Tabla 10).

| Accesión | NB/ET | NB/CB |
|----------|-------|-------|
| TO 937 | 0,45 | 2,55 |
| SLC 6 | 0,37 | 1,38 |
| SG 19040 | 0,61 | 1,43 |

Tabla 10. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de hoja de las tres accesiones utilizadas.

En el caso de la accesión TO 937 el número medio de brotes regenerados de cada explante de partida alcanzó un valor muy elevado (1,04) en el medio TDZ 2,0 (Tabla 11). Esto indica que, en esas condiciones de cultivo, hay una gran cantidad de explantes que son capaces de regenerar y acabar dando algún brote en un periodo de treinta días.

| Medio | (NB/EP) | (NB/CB) |
|--------------|---------|---------|
| TDZ 1,0 | 0,30 | 2,70 |
| ITDZ 0,5 1,0 | 0,19 | 1,31 |
| TDZ 2,0 | 1,04 | 3,13 |
| ITDZ 0,5 2,0 | 0,26 | 1,92 |

Tabla 11. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de hoja de la accesión TO 937 en función del medio de cultivo utilizado.

En el caso del SLC 6 el número medio de brotes regenerados de cada explante de partida alcanzaron el valor más alto de (0,52) en el medio IZ 0,5 1,0. Por otra parte, el número de brotes regenerados en explantes con al menos un brote varió entre 1 y 1,56 (Tabla 12).

| Medio | NB/EP | NB/CB |
|------------------|-------|-------|
| IKZ 4,0 4,0 1,0 | 0,51 | 1,31 |
| IKZ 2,0 2,0 1,0 | 0,28 | 1,56 |
| IKZ 1,0 1,0 1,0 | 0,19 | 1,00 |
| IKZ 0,5 0,5 1,0 | 0,29 | 1,30 |
| OIBZ 0,5 2,0 1,0 | 0,48 | 1,54 |
| IB 0,5 2,0 | 0,31 | 1,56 |
| IZ 0,5 1,0 | 0,52 | 1,52 |

Tabla 12. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de hoja de la accesión SLC 6 en función del medio de cultivo utilizado.

Finalmente, en la accesión SG 19040 el número medio de brotes regenerados en los explantes de partida alcanzaron el valor más alto de 0,89 en el medio IZ 0,5 1,0. Además, el número de brotes regenerados con al menos un brote varió entre 1,25 y 1,57 (Tabla 13).

| Medio | NB/EP | NB/CB |
|-----------------|-------|-------|
| IKZ 4,0 4,0 1,0 | 0,32 | 1,32 |
| IKZ 2,0 2,0 1,0 | 0,70 | 1,37 |
| IKZ 1,0 1,0 1,0 | 0,62 | 1,51 |
| IKZ 0,5 0,5 1,0 | 0,58 | 1,44 |
| IBZ 0,5 2,0 1,0 | 0,63 | 1,43 |
| IB 0,5 2,0 | 0,50 | 1,25 |
| IZ 0,5 1,0 | 0,89 | 1,57 |

Tabla 13. Número de brotes por explante de partida (NB/EP) y por explante con algún brote (NB/CB) en explantes de hoja de la accesión SG 19040 en función del medio de cultivo utilizado.

4.4. Nivel de ploidía de las plantas regeneradas

Se ha medido el nivel de ploidía de 166 plantas regeneradas de los dos tipos de explantes de cotiledón (proximal y distal) y de los tres genotipos utilizados. En la Figura 20 se muestra las gráficas de una hoja joven (se elige analizar esta parte de la planta porque al no haber sufrido procesos de endoreduplicación sólo da dos picos en el citómetro) de una planta diploide (2n) y de una hoja joven de una planta tetraploide (4n). Como se observa, las poblaciones de células en el caso de la planta diploide (2n) son células diploides en fase G1 (2C) y en fase G2 (4C). En cambio, las poblaciones de células en el caso de la planta tetraploide (4n) son células tetraploides en fase G1 (4C) y tetraploides en fase G2 (8C). Por tanto, analizando las gráficas obtenidas para cada planta sabemos su nivel de ploidía.

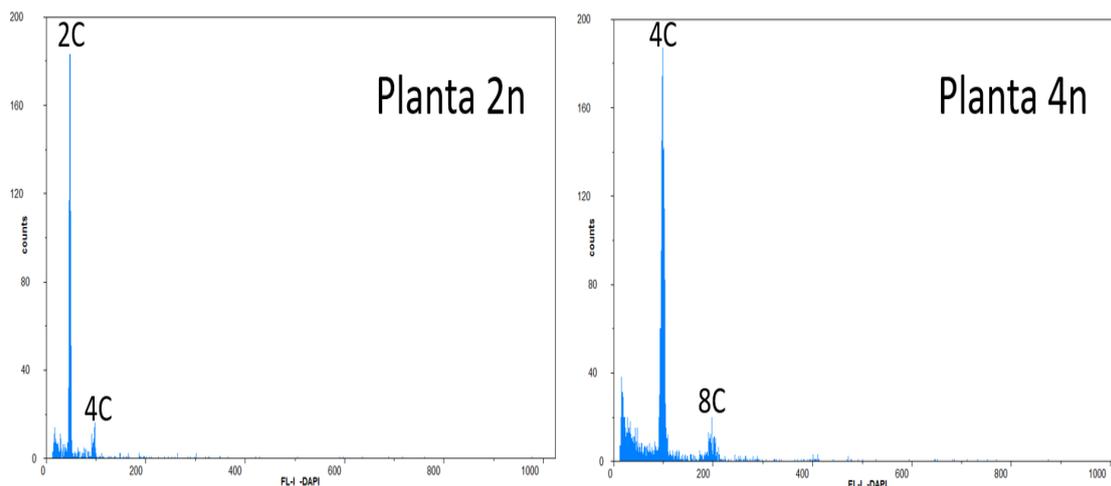


Figura 18. Gráfica del patrón polisomático de una planta diploide (izquierda) y una tetraploide (derecha).

Se muestran los resultados obtenidos en función del tipo de explante del cual se ha regenerado la planta (Tabla 14).

| Tipo de explante | 2n | 4n |
|--------------------|---------|---------|
| Cotiledón distal | 31(37%) | 52(63%) |
| Cotiledón proximal | 34(41%) | 49(59%) |

Tabla 14. Nivel de ploidía en función de la parte del cotiledón del que procede la planta.

En este caso se ha observado una correlación directa entre el nivel de endorreduplicación del explante de partida (Figura 6A) y el porcentaje de plantas 4n regeneradas. En concreto, el explante proximal es el que tienen mayores contenidos de células 8C (indicativo de que ha sufrido eventos de endorreduplicación con mayor frecuencia) y también es el que regenera un mayor porcentaje de plantas tetraploides.

A continuación, se muestran los resultados en función del genotipo de la planta regenerada (Figura 15).

| Accesión | 2n | 4n |
|----------|---------|---------|
| TO 937 | 21(32%) | 45(68%) |
| SLC 6 | 36(72%) | 14(28%) |
| SG 19040 | 8(16%) | 42(84%) |

Tabla 15. Nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de cotiledones del material de partida.

La accesión SG 19040 fue la que presentó un mayor nivel de endorreduplicación de las tres evaluadas (Figura 6B). Al igual que pasa con el tipo de explante, en este caso también hay una correlación directa al compararlas con las otras accesiones, ya que fue en SG 19040 donde se han regenerado un mayor porcentaje de plantas tetraploides.

Sin embargo, si comparamos las otras dos accesiones entre sí podemos comprobar que no siempre se cumple esta correlación ya que, aunque TO 937 tuvo una menor incidencia de eventos de endorreduplicación en el material de partida respecto de SLC 6, ha regenerado muchas más plantas tetraploides que SLC 6. Este fenómeno se puede explicar por una mayor

capacidad de regeneración de las células tetraploides presentes en los explantes de la accesión TO 937 o por la aparición de eventos de variación genética *de novo* durante el proceso de regeneración en esta accesión.

Estos resultados están en la línea de los obtenidos por Evans y Sharp (1983) que reportaron la regeneración de plantas tetraploides a partir de explantes foliares de tomate y por Buiatti y colaboradores (1985) que hicieron lo mismo, pero, en este caso, a partir de explantes de cotiledón. Sin embargo, Gavazzi y colaboradores (1987) no informaron sobre la variación somaclonal que pudo darse por las condiciones empleadas en su trabajo en las plantas regeneradas a partir de cotiledones. Esto era algo habitual en las publicaciones de la época ya que se descartaban directamente las plantas regeneradas que no eran como el material de partida. Sin embargo, hoy en día son múltiples las aplicaciones que han surgido a partir del empleo de las plantas tetraploides. Una de las más conocidas es su utilización para la obtención de material triploide (producto de la hibridación entre un diploide y un tetraploide). En una especie como la sandía es la forma mediante la que se obtienen las variedades sin pepitas ya que un organismo triploide no es capaz de dar descendencia viable.

5. Conclusiones

Después de los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

- Se ha comprobado que la técnica de esterilización, germinación y desarrollo inicial de plantas axénicas puesta a punto en nuestro grupo permite trabajar con unas buenas condiciones de esterilidad, lo cual facilita la obtención del material vegetal de partida.
- Tras el análisis de la eficacia de regeneración y del número de brotes desarrollados se han identificado las condiciones (medio de cultivo y tipo de explante) que permiten a la mayoría de los explantes producir estructuras organogénicas en las tres accesiones estudiadas. Esto nos va a permitir trabajar de forma más eficiente en diferentes técnicas de cultivo *in vitro* como la transformación genética en las que se necesita regenerar plantas de forma adventicia.
- Entre los explantes analizados destaca el resultado obtenido con los explantes de peciolulo, tanto por su eficacia de regeneración como por su producción de brotes adventicios, equiparable y a veces superior al alcanzado por los cotiledones proximales en los tres genotipos evaluados.
- Se ha estudiado el patrón polisomático de los explantes de partida procedentes de cotiledón y se ha analizado el nivel de ploidía de las plantas regeneradas para ver la incidencia de la variación somaclonal en estos procesos. Aunque en general se ha comprobado que existe una correlación directa, también se ha visto que en el caso de TO 937 se ha producido la regeneración de un mayor número de plantas tetraploides de lo que era esperable por el patrón polisomático del explante de partida. Una alternativa para solventar este problema podría ser el empleo de explantes procedentes de hoja que tienen menos problemas de endoreduplicación.

6. Bibliografía

- Ahmad, P.; Ashraf, M.; Younis, M.; Hu, X.; Kumar, A.; Akram, N. A.; Al-Qurainy, F. (2012).** Role of transgenic plants in agricultura and biopharming. *Biotechnology Advances* 30:524-540.
- Barden, K. A.; Schiller Smith, S.; Murakishi, H. H. (1986).** Regeneration and screening of tomato somaclones for resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Science* 45:209-213.
- Bai, Y.; Lindhout, P. (2007).** Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany* 100:1085-1094.
- Bauchet, G.; Causse, M. (2012).** Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. In *Environmental Sciences* (Çaliskan, M., ed.). Rijeka, Croatia: *InTechOpen*, pp. 133-162.
- Behboodian, B.; Ali, Z. M.; Ismail, I.; Zainal, Z. (2012).** Postharvest analysis of lowland transgenic tomato fruits harbouring hpRNAi-ACO1 construct. *Scientific World Journal* Volume 2012.
- Blanca, J.; Montero-Pau, J.; Sauvage, C.; Bauchet, G.; Illa, E.; Díez, M. J.; Cañizares, J. (2015).** Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, 16(1), 257. Brar, D. S., & Khush, G. S. (1997). Alien introgression in rice. *Plant Molecular Biology* 35:35-47.
- Brandwagt, B. F.; Mesbah, L. A.; Takken, F. L.; Laurent, P. L.; Kneppers, T. J.; Hille, J.; Nijkamp, H. J. J. (2000).** A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:4961-4966.
- Brar, D. S.; Khush, G. S. (1997).** Alien introgression in rice. *Plant Molecular Biology* 35:35-47.
- Buiatti, M.; Marcheschi.; Tognoni, F.; Lipucci di Paola, M.; Collina Greci, F.; Martini, G. (1985).** Genetic variability induced by tissue culture in the tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Z Pflanzenzuecht* 94:162-165.
- Child, A. (1990).** A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. Don) D' Arcy (Tuberatum (Du) Bitter (s. 1.)). *Feddes Reportorium* 101:209-235.
- Coego, A.; Ramirez, V.; Ellul, P.; Mayda, E.; Vera. (2005).** The H₂O₂-regulated Ep5C gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. *Plant Journal* 42:283-293.
- Collonnier, C.; Fock, I.; Kashyap, V.; Rotino, G. L.; Daunay, M. C.; Lian, Y.; Sihachakr, D. (2001).** Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65:91-107.
- D'Arcy, W. G. (1991).** The *Solanaceae* since 1976, with a review of its biogeography. En: "Hawkes, J.G.; Lester, R.N.; Nee, M.; Estrada, N. (Eds). *Solanaceae* III: Taxonomy, Chemistry, Evolution. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 75-137.
- Díez, M.J.; Nuez, F. (2008).** Tomato. En: Prohens J, Nuez F. Handbook of Plant Breeding: Vegetables II, Springer, New York, NY, USA, pp. 249-263.

- Duzyaman, F.; A. Tanrisever.; G. Gunver. (1994).** Comparative studies on regeneration of different tissues of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. *Acta Horticulturae*:235-242.
- Evans, D. A; Sharp, W. R. (1983).** Single gene mutations in plants regenerated from tissue culture. *Science* 2:221.
- Foolad M. R. (2007).** Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 52 pages.
- Germanà, M. A. (2011).** Another culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104(3):283-300.
- Gavazzi, G.; Tonelli, C.; Todesco, G.; Arreghini, E.; Raffaldi, F.; Vecchio, F.; Barbuzzi, G.; Biasini, MG.; Sala, F. (1987).** Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 74:733-738.
- Gerszberg, A.; Katarzyna, H.-K.; Kowalczyk, T.; Kononowicz, A. K. (2014).** Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 120:881-902.
- Gubis, J.; Lajchova, Z.; Farago, J.; Jurekova, Z. (2003).** Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Czech Journal of Genetics and Plants Breeding* 39:9-14.
- Hille, J.K.; Maarten, M.S.; Ramman.; Pim, Z. (1989).** Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. *Euphytica* 42: 1-23.
- Hsieh, T. H.; Lee, J. T.; Yang, P. T.; Chiu, L. H.; Charng, Y. Y.; Wang, Y. C.; Chan, M. T. (2002).** Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology* 129:1086-1094.
- Jenkins, J. A. (1948).** The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany* 2:379-392.
- Kobayashi, O.; Suda, H.; Ohtani, T.; Sone, H. (1996).** Molecular cloning and analysis of the dominant flocculation gene FLO8 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics* 251:707-15.
- Lin, W. C.; Lu, C. F.; Wu, J. W.; Cheng, M. L.; Lin, Y. M.; Yang, N. S.; Black, L.; Green, S. K.; Wang, J. F.; Cheng, C. P. (2004).** Transgenic tomato plants overexpressing the Arabidopsis NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Research* 13:567-581.
- Lu, R.J.; Huang, Y.; Sun, F.; Zhou, R.M. (1997).** Callus formation and plantlets regeneration from cotyledin and hypocotyl of tomato (*Lycopersicon esculentum* M.). *Acta Agriculturae Shanghai* 13:16-18.
- Luckwill, L. C. (1943).** The genus *Lycopersicon*, an historical, biological and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. *Aberdeen University Studies, Escocia* 120:43.

- Mishra, S.; Yadav, R. C.; Neelam, R. Y.; Mahesh, K. R. (2007).** A useful somaclonal variant obtained from in vitro hypocotyl culture of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. hisar arun. *Plant Archives*. Vol.7 No.1, pp. 115-117.
- Muller, C. H. (1940).** A revision of the genus *Lycopersicon*. United States Department of Agriculture. Miscellaneous Publication No 382.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nandakumar, H.; Ivanava, O.; Guseva, N. (1991).** In vitro induction of morphogenesis in tomatoes using hormone deficient medium. *Physiologia Plantarum* 82:1.
- Olmstead, J. A.; Sweere, R. E.; Spangler, L. B.; Palmer, J. D. (1999).** Phylogeny and provisional classification of the *Solanaceae* based on chloroplast DNA. Nee D. E.; Symon R. N. Lester and J. P. Jessop (eds) *Solanaceae* IV, Advances in Biology and Utilization. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 111-137.
- Otroshy, M.; Khalilia, Z.; Ebrahimi, M.A.; Nekouic, M.K.; Moradi, K. (2013).** Effect of Growth Regulators and Explant on Plant Regeneration of *Solanum lycopersicum* L. var. *Cerasiforme*. *Russian Agricultural Sciences* 39:226–235.
- Park, S.H.; J.L. Morris, J.E.; Park, K.D.; Hirsch.; Smith, R.H.M. (2003).** Efficient and genotype independent Agrobacterium mediated tomato transformation. *Journal of Plant Physiology* 160:1253-1257.
- Peralta, I. E.; Spooner, D. M. (2001).** Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon* (Mill.). Wettst. Subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany* 88:1888-1902.
- Peralta, I. E.; Spooner, D. M. (2005).** Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Sect. *Lycopersicon*). *Monographs In Systematic Botany* 14:227.
- Picó, B.; Herraiz, J.; Ruiz, J.J.; Nuez, F. (2001).** Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 94:73-89.
- Raj, S.K.; R. Singh, S.K.; Pandey.; Singh, B.P. (2005).** Agrobacterium mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection. Research communications. *Current Science* 88:1674-1679.
- Ranc, N.; Muños, S.; Santoni, S.; Causse, M. (2008).** A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (solanaceae). *BMC Plant Biology* 8:130.
- Rick, C. M. (1958).** The role of natural hybridisation in the derivation of cultivated tomatoes of western South America. *Economic Botany* 12:346-367.
- Rick, C.M. (1973).** Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. Srb, A. M. Genes, enzymes, and populations. Plenum, N. Y, pp. 225-269.

- Rick, C. M. (1979).** Byosystematic study in *Lycopersicon* and closely related species *Solanum*. In: The biology and taxonomy of *Solanaceae*. Hawkes, J. G., Layster, R. N. and Skelting A. D. (eds). *Academic Press*. London, UK, pp. 268-273.
- Rick, C. M.; Holle, M. (1990).** Andean *Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme*: Genetic variation and its evolutionary significance. *Economic Botany* 44:69-78.
- Seguí-Simarro, J.M.; Nuez, F. (2005).** Meiotic metaphase I to telophase II is the most responsive stage of microspore development for induction of androgenesis in tomato (*Solanum Lycopersicum*). *Acta Physiologiae Plantarum* 27:675-685.
- Seguí-Simarro, J.M.; Nuez, F. (2007).** Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany* 58:1119-1132.
- Sengar R.; Chaudhary R.; Tyagi S. K. (2010).** Present status and scope of floriculture developed through different biological tools. *Research Journal of Agricultural Sciences* 1:306-314.
- Shahin, E.A. (1984).** En: Vasil IK (ed) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, vol I, Academic Press, New York, pp. 381-390.
- Shtereva, L.A.; Zagorska, N.A.; Dimitrov, B.D.; Kruleva, M.M.; Oanh, H.K. (1998).** Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis. *Plant Cell Reports* 18:312-317
- Skoog, F.; Miller, C. O. (1957).** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured. *In vitro. Symposia of the Society for Experimental Biology* v. 11, pp. 118-131.
- Sohrab, S.S.; Bhattacharya, P.S.; Rana, D.; Kamal, M.A.; Pande, M.K. (2015).** Development of interspecific *Solanum lycopersicum* and screening for Tosspovirus resistance. *Saudi Journal of Biological Sciencies* 22:730.
- Spooner D. M.; Peralta I. E.; Knapp S. (2005).** Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomato (*Solanum* L. Section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.). *Taxon* 54:43-61.
- Stevens, MA.; Rick CM. (1986).** *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*. Genetics and breeding. pp. 35–109.
- Stommel, J.R. (2001).** Barriers for introgression of *Solanum ochranthum* into tomato via somatic hybrids. *Saudi Journal of Biological Sciencies* 22:730-738.
- Symon, D. E. (1985).** The *Solanaceae* of New Guinea Journal of the Adelaide. *Botanic Gardens* 8:1-177.
- Taylor, I. B. (1986).** Byosystematic of tomato. In: The tomato Crop. A scientific basis of improvement. Atherton and Rouch (edit). *Champan and Hall*. London, UK. pp. 1-34.
- The Tomato Genome Consortium. (2012).** The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635-641.
- Waara, S.; Glimelius, K. (1995).** The potential of somatic hybridization in crop breeding. *Euphytica* 85:217-233.

Zagorska, N.A.; Shtereva, L.A.; Kruleva, M.M.; Sotirova, V.G.; Baralieva, D.L.; Dimitrov, B.D. (2004). Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). III. Characterization of the regenerants. *Plant Cell Reports* 22:449-456

Zhang, H.; Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* 19:765-768.