

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



MICROPROPAGACION DE BROTES DE TOMATE
(Lycopersicon esculentum Mill.) A PARTIR DE PLANTULAS
GERMINADAS in vitro.

TESIS

PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN PRODUCCION AGRICOLA

POR

JOSEFA AMBRIZ GUTIERREZ

MARIN, N. L.

JULIO 1995

TM

SB349

.A42

c.1



1080110323

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



LICIODOPROFAGACION DE BROTES DE TOMATE
(Lycopersicon esculentum MILL.) A PARTIR DE PLANTULAS
GERMINADAS in vitro.

TESIS

PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN PRODUCCION AGRICOLA

POR

JOSEFA AMBRIZ GUTIERREZ

MARIN, N. L.

JULIO 1995



TM
SB349
.A<2



**MICROPROPAGACION DE BROTES DE TOMATE
(Lycopersicon esculentum Mill.) A PARTIR DE PLANTULAS
GERMINADAS in vitro**

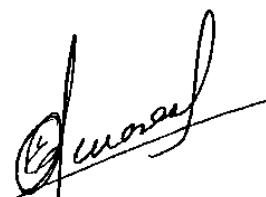
TESIS

SOMETIDA AL COMITE PARTICULAR COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCION AGRICOLA



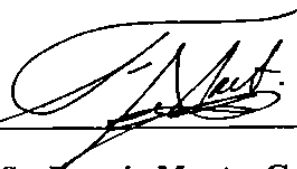
D. C. Ma. Elizabeth Cárdenas Cerda

Asesor Principal



Ph. D. Emilio Olivares Sáenz

Asesor



M. Sc. Fermín Montes Cavazos

Asesor

Marín, N.L.

Julio 1995

A MIS PADRES

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

A la D. C. Ma. Elizabeth Cárdenas Cerda , asesora principal, por su valiosa colaboración durante el desarrollo y culminación de la presente investigación, además por la disposición siempre mostrada , y por haberme transmitido sus conocimientos en el área de cultivo de tejidos vegetales; los cuales han sido aprovechados para desarrollarme profesionalmente.

Muchas gracias Dra. Betty

Al Ph. D. Emilio Olivares Sáenz, por la asesoría brindada durante el desarrollo de la investigación y por el interés mostrado para la culminación de la misma, sin el cual no hubiese sido posible; además porque de todos sus conocimientos que a través de sus enseñanzas he adquirido tenga la seguridad que serán aprovechados profesionalmente.

Gracias Dr. Olivares

Al Maestro Fermín Montes Cavazos, por su participación acertada en la revisión del presente trabajo.

Al Ph. D. Javier García Cantú, por el apoyo moral brindado durante mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado la beca para realizar mis estudios de Maestría.

A mis compañeros de generación:

Ing. Ma. de los Angeles González Méndez, M.C. Ernesto W. Torres Cáceres, M.C. Jesús García Olivares, M.C. Gabriel Cuéllar Díaz, Ing. Antonio Duron Alonso, por haber compartido su experiencia, cultura y sobre todo compañerismo.

A los estudiantes de los programas de Maestría y Doctorado que de una forma o de otra demostraron ser mis compañeros; también estás incluida aquí Graciela Ramírez.

BIOGRAFIA

Josefa Ambriz Gutiérrez, nació en Apodaca, Nuevo León el 24 de Enero de 1965.

Realizó sus estudios de primaria en la escuela Profr. Timoteo L. Hernández y la secundaria en la escuela No. 8 Gral. José Silvestre Aramberri ambas pertenecientes a Cd. Guadalupe, Nuevo León. Realizó sus estudios de bachillerato en la Preparatoria No. 8 de la U.A.N.L., posteriormente ingresó a la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L., recibiendo el *título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en diciembre de 1990.*

De 1988-90 laboró como vendedor de agroquímicos y semillas de pastizal en la Iniciativa Privada. Participó como instructor municipal en los VII Censos Agropecuarios en el estado de Nuevo León.

En Febrero de 1992 ingresó como estudiante graduado al Colegio de Graduados de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. egresando en Febrero de 1994.

INDICE

Capítulo	Página
INDICE DE CUADROS.....	IX
CLAVE DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
SUMMARY.....	XIV
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
Concepto de Micropropagación.....	4
Aplicación de las Técnicas de Cultivo de Tejidos en los Cultivos Horticolas.....	5
Métodos de Micropropagación.....	6
Embriogénesis somática de Células.....	7
Inducción del Desarrollo Axilar.....	8
Desarrollo de Brotes Adventicios.....	12
Etapas de la Micropropagación.....	15
Etapa 0. Selección y Preparación de las Plantas Madre.....	15
Etapa I. Establecimiento del Cultivo Aséptico.....	16
Etapa II. Multiplicación del Propágulo.....	17
Etapa III. Enraizamiento <u>In Vitro</u> y Acondicionamiento.....	18
Etapa IV. Enraizamiento <u>In Vivo</u> y Aclimatación.....	20
La Función de los Reguladores de Crecimiento en el Cultivo <u>In Vitro</u>	21
La Función de Citocininas y Auxinas.....	22
Otros Reguladores de Crecimiento.....	24
Balance de Reguladores de Crecimiento Requerido para la Proliferación	
<u>In Vitro</u>	25
Reguladores de Crecimiento más Comunes Utilizados en Cultivo <u>In Vitro</u>	26

Capítulo	Página
Antecedentes del Cultivo <u>In Vitro</u> de Tomate.....	29
III. MATERIALES Y METODOS.....	33
Establecimiento <u>In Vitro</u>	33
Desinfestación de la Semilla.....	33
Germinación de la Semilla.....	34
Etapa de Proliferación de Brotes.....	34
Medio de Cultivo.....	35
Preparación del Medio de Cultivo.....	36
Siembra del Inóculo.....	38
Enraizamiento <u>In Vitro</u>	39
Medio de Cultivo.....	39
Etapa de Aclimatación.....	41
Trasplante al Suelo en Macetas.....	41
Trasplante al Campo.....	42
Variables de Estudio.....	42
Proliferación de Brotes.....	42
Número de Brotes.....	42
Longitud Total de los Brotes.....	42
Número de Hojas.....	43
Crecimiento Total del Inóculo.....	43
Etapa de Enraizamiento.....	43
Porcentaje de Enraizamiento.....	43
Análisis Estadístico.....	44
Proliferación de Brotes.....	44
Etapa de Enraizamiento.....	44

Capítulo	Página
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	46
<i>Número de Brotes</i>	46
Longitud Total de los Brotes.....	48
Número de Hojas.....	52
Crecimiento Total del Inóculo.....	53
Porcentaje de Enraizamiento.....	55
V. CONCLUSIONES.....	60
VI. BIBLIOGRAFIA.....	61
VII. APENDICE.....	66

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tratamientos probados en la etapa de proliferación de brotes.	35
Cuadro 2. Sales inorgánicas del medio básico Murashige-Skoog (1962) en mg.l ⁻¹ .	38
Cuadro 3. Tratamientos estudiados en la etapa de enraizamiento <u>in vitro</u> .	45
Cuadro 4. Comparación de medias de tratamientos con y sin citocininas para la variable longitud total de brotes.	49
Cuadro 5. Longitud total de los brotes a dos niveles de citocinina a las seis semanas del inicio del cultivo.	51
Cuadro 6. Comparación de medias de citocininas dentro de cada dosis aplicada para longitud total de brotes.	51
Cuadro 7. Comparación de medias de tratamientos de las dosis aplicadas de los tres tipos de citocininas para longitud total de brotes.	52
Cuadro 8. Comparación de medias de tratamientos con y sin citocininas para crecimiento total del inóculo.	53
Cuadro 9. Medias de crecimiento total del inóculo inducido por tres tipos de citocinina a las seis semanas del inicio del cultivo.	54
Cuadro 10. Medias de crecimiento total del inóculo inducido por dos niveles de citocinina a las seis semanas del inicio del cultivo.	55
Cuadro 11. Prueba de χ^2 para el % de enraizamiento obtenido con la mitad de la concentración y la concentración total de MS.	56
Cuadro 12. Prueba de χ^2 para el % de enraizamiento en ambos híbridos.	57
Cuadro 13. Prueba de χ^2 para el % de enraizamiento con y sin AIB.	57

APENDICE

Página

Cuadro 1.	Soluciones concentradas utilizadas para la preparación del medio de cultivo MS.	67
Cuadro 2.	Materiales, equipo y reactivos utilizados para la preparación del medio de cultivo MS.	68
Cuadro 3.	Análisis de varianza para el número de brotes transformado (14 tratamientos).	68
Cuadro 4.	Análisis de varianza para la longitud total de brotes (14 tratamientos).	68
Cuadro 5.	Análisis de varianza para la longitud total de los brotes (12 tratamientos).	69
Cuadro 6.	Análisis de varianza para el número de hojas transformado (14 tratamientos).	69
Cuadro 7.	Análisis de varianza para el crecimiento total del inóculo (14 tratamientos).	69
Cuadro 8.	Análisis de varianza para el crecimiento total del inóculo (12 tratamientos).	70
Cuadro 9.	Medias de tratamientos para número de brotes, longitud de los brotes, número de hojas y crecimiento total del inóculo.	70

CLAVE DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

BAP = bencilaminopurina

AIB = ácido indolbutírico

MS = Murashige-Skoog (1962)

mg.l⁻¹ = miligramos por litro

g.l⁻¹ = gramos por litro

B₅ = vitaminas del medio Gamborg y Ojima

M = molar

(p/v) = peso sobre volúmen

(v/v) = volúmen sobre volúmen

ppm = partes por millón

mm = milímetros

μM = micro molar

2, 4-D = ácido 2, 4-diclorofenoxiacético

AIA = ácido indolacético

ANA = ácido naftalenacético

2iP = dimetilalil aminopurina

RESUMEN

Se estableció un experimento bajo condiciones in vitro con el objetivo de evaluar la respuesta de dos híbridos de tomate a la aplicación de varios tipos de citocininas a diferentes concentraciones en cuanto a la proliferación de brotes; además comparar los híbridos en cuanto a enraizamiento, evaluando el efecto de la auxina AIB en dos concentraciones del medio Murashige-Skoog (MS).

La semilla fue desinfectada con etanol al 70% (v/v), y con hipoclorito de sodio al 10% (v/v), enjuagándose por último con agua bidestilada-esterilizada, y sembrada sobre agar-agar al 0.8% para su establecimiento in vitro.

En la etapa de proliferación de brotes, se utilizaron como inóculos los brotes apicales disectados de plántulas germinadas asépticamente. El arreglo de tratamientos consistió de un factorial y los factores bajo estudio fueron los híbridos de tomate Heat Wave y Celebrity, las citocininas Bencilaminopurina, Cinetina y Zeatina a las dosis de 1 y 10 mg.l⁻¹. También se probaron los dos híbridos sin citocininas. Todo esto bajo un diseño completamente al azar con diferente número de repeticiones. Los inóculos fueron cultivados sobre medio Murashige-Skoog (1962) adicionado con compuestos orgánicos.

Los brotes obtenidos en la etapa de proliferación, fueron transferidos a un medio fresco completo y a la mitad de la concentración, sin reguladores de crecimiento o adicionado con 1.0 mg.l⁻¹ de AIB para inducir el enraizamiento in vitro.

Los análisis de varianza mostraron que, en cuanto al número de brotes y número de hojas, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos probados y entre las interacciones de los mismos con los diferentes tipos de citocininas; mientras que la longitud total de los brotes y la longitud total del inóculo aumentaron cuando no se aplicó citocinina al medio, para ambos genotipos; resultando el híbrido Celebrity con los más altos valores.

En cuanto al porcentaje de enraizamiento, no se encontraron diferencias entre los híbridos probados; sin embargo, la utilización del medio de cultivo a la concentración total promueve la inducción de raíces in vitro.

SUMMARY

The purpose of the first experiment was to evaluate the response of two tomato hybrids to several cytokinins at different levels, for shoot proliferation under *in vitro* conditions. Another experiment was carried out to evaluate the rooting ability of the hybrids with two concentrations of Murashige-Skoog (MS) medium and with and without IBA auxin.

Seeds were disinfected with 70% (v/v) ethanol, and 10% (v/v) sodium hypochlorite, followed by rinses in sterile double-distilled water, and placed on 0.8% agar-agar for *in vitro* establishment.

The experiment in the shoot proliferation stage was carried out under a completely randomized experimental design with 14 treatments and different number of replications. Twelve treatments were obtained from a factorial design (2x3x2). The factors were hybrids (Heat Wave and Celebrity), cytokinins (Benzylaminopurine, Kinetin and Zeatin), and doses (1 and 10 mg.l⁻¹). Two treatments were also included to test the hybrids without cytokinins. Explants were apical shoots from aseptically germinated seedlings. The explants were placed on MS medium supplemented with organic compounds.

Shoots obtained in proliferation stage, were transferred to fresh medium at full and half-strength of concentration, with 1 mg.l⁻¹ of IBA or growth regulators free to promote *in vitro* rooting.

Analysis of variance showed no significant differences between genotypes, cytokinins and doses for shoot number and leaves number. However, total length shoot and total length

explant increased when the medium was cytokinin-free for both genotypes; although Celebrity hybrid obtained the highest values.

The rooting experiment showed no difference between hybrids for rooting percentage. However, the full strength medium induced a higher root proliferation than the half-strength medium

I. INTRODUCCION

La micropropagación o propagación masiva *in vitro* es la técnica que, mediante el cultivo de tejidos asépticos, ha cobrado gran importancia en las últimas décadas; ya que los avances en la investigación al respecto, se han aprovechado para aplicarse a nivel comercial. Específicamente, esta técnica ha resultado benéfica para la horticultura, y más aún para las especies ornamentales, ya sea para la producción de plantas en maceta o para flor cortada. Aunque en los últimos años, la producción de plántulas de hortalizas *in vitro* ha disminuído moderadamente, para el caso específico de tomate, ésta se ha mantenido.

La metodología convencional más usada ha sido la inducción de la brotación axilar y subsecuente multiplicación de los brotes; sin embargo, se ha demostrado que este proceso es el menos eficiente ya que la cantidad de brotes a producir depende de la cantidad de yemas presentes en el inóculo, pero también es cierto que a diferencia de la brotación adventicia y la embriogénesis somática, los individuos generados mediante este proceso guardan una identidad genética con respecto a la planta de la cual han sido generados.

Con el afán de aumentar la producción, una práctica que realizan los productores de tomate en México es la elección de variedades mejoradas o híbridos comerciales con ciertas características que le aseguren un incremento del vigor, maduración más temprana, larga vida de anaquel y sobre todo altos rendimientos.

Sin embargo, existen grandes limitantes en el establecimiento de este tipo de siembras comerciales por el alto costo de importación, especialmente de semilla híbrida, ya que actualmente las casas comerciales cotizan estos materiales por unidad; lo cual antes se valoraba por peso en gramos o su equivalente en libras.

Por lo anteriormente expuesto, una alternativa es que a través de la multiplicación de brotes in vitro del material genético de interés, se asegure su identidad genética y se reduzca la dependencia de las compañías semilleras para la adquisición de la semilla en cada ciclo agrícola.

Para tomate se ha determinado que la inducción de brotes múltiples y regeneración de plantas a partir de brotes apicales varía según el genotipo, tamaño del explante y la combinación de reguladores de crecimiento en el medio, lo que hace necesario definir las condiciones de cultivo específicas para el material biológico empleado en la micropropagación.

Por lo tanto se plantearon los siguientes objetivos:

1. Comparar los híbridos de tomate Heat Wave y Celebrity en cuanto a proliferación de brotes in vitro.
2. Evaluar diferentes tipos de citocininas (BAP, Cinetina y Zeatina) en diferentes dosis sobre la proliferación de los híbridos Heat Wave y Celebrity.
3. Comparar los híbridos de tomate Heat Wave y Celebrity en cuanto a enraizamiento in vitro.
4. Evaluar el efecto de la auxina (AIB) en dos concentraciones del medio MS sobre el enraizamiento de dos híbridos de tomate.

HIPOTESIS:

- H1. Hay diferencia entre los híbridos Heat Wave y Celebrity en cuanto a la proliferación de brotes.
- H2. El tipo y concentración de citocinina influye sobre la proliferación de brotes en los híbridos Heat Wave y Celebrity.
- H3. Hay diferencia entre los híbridos en cuanto a su capacidad de enraizamiento in vitro.

114. Hay efecto de la auxina (AIB), en combinación con dos concentraciones del medio MS, sobre el enraizamiento de dos híbridos de tomate.

II. REVISION DE LITERATURA

Concepto de Micropropagación

Existen conceptos tan sencillos de micropropagación como los expresados por Villalobos y Thorpe (1991), quienes señalaron que "la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva in vitro".

Originalmente, la micropropagación se definió como "cualquier" procedimiento aséptico que comprende la manipulación en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Krikorian, 1991b).

De igual forma, Hartmann y Kester (1987) definen la micropropagación como un proceso que consiste en producir plantas a partir de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensaye o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y la nutrición.

Además de las estructuras mencionadas utilizadas para la micropropagación, una técnica bastante eficiente es la que involucra la propagación clonal in vitro de plantas a partir de brotes apicales o explantes nodales, usualmente con una proliferación acelerada de brotes durante los subcultivos (Anónimo, 1993).

Aplicación de las Técnicas de Cultivo de Tejidos en los Cultivos Hortícolas

Para el caso de ornamentales, las técnicas de cultivo *in vitro* han sido utilizadas exitosamente para la eliminación de enfermedades y la producción de plantas libres de enfermedades, en la producción rápida de un gran número de plantas genéticamente idénticas y para la introducción de nuevas variedades y/o genotipos; aunque la mayoría de las investigaciones se han centrado alrededor de los dos primeros objetivos (Torres, 1988).

En viveros comerciales, el cultivo de tejidos puede ser usado para minimizar el área de crecimiento usualmente provisto para el mantenimiento de plantas madre (Murashige, 1974).

El cultivo de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares se han usado para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos; de un brote apical, se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples (Styer *et al.* citados por Krikorian, 1991b).

Las técnicas de cultivo de tejidos también pueden ser utilizadas para obtener híbridos entre especies incompatibles a través de las técnicas de cultivo de embriones, cultivo de óvulo, o la hibridización somática (Torres, 1988). De manera que el cultivo aséptico se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado y de rutina para el "rescate" de los embriones que no crecen ni se convierten en plántulas. En un sentido estricto, el material no se multiplica clonalmente, pero sí se está multiplicando el germoplasma que de otra forma, se perdería (Krikorian, 1991b).

Murashige, Hughes y Thorpe, citados por Villalobos y Thorpe (1991) mencionan respectivamente que en la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y, más recientemente, en especies leñosas.

Torres (1988) menciona que las técnicas de micropropagación pueden ser usadas para acrecentar o, en el futuro, sustituir las técnicas de propagación vegetativa hasta hoy empleadas. Para el caso de la industria frutícola, muchos programas de cultivo de tejidos se han centrado alrededor de las siguientes áreas: la propagación masiva de líneas y patrones deseables, la eliminación de virus a partir de tejidos de la planta, la rápida micropropagación de líneas deseables para programas de mejoramiento, la preservación de germoplasma y la producción de haploides para el mejoramiento de plantas.

Los primeros éxitos de la propagación *in vitro* de cultivos hortícolas según Torres (1988) incluyen: la producción de un gran número de plantas a partir de especies en las cuales el desarrollo de la planta a partir de semilla es difícil, la propagación clonal de un gran número de plántulas idénticas genéticamente, la producción de plantas libres de virus y el mejoramiento de cultivos a través de varias técnicas de modificación genética.

Métodos de Micropropagación

Existen diversos métodos ó procedimientos que se pueden utilizar para lograr la multiplicación masiva de especies de interés; los cuales se describen brevemente en este capítulo, mencionando además algunas ventajas y desventajas que presentan cada uno de ellos.

La micropropagación puede ser llevada a cabo por la multiplicación de brotes a partir de inóculos de brotes apicales o yemas axilares; por la formación de brotes adventicios o

embriones somáticos a partir de callo o callo semiorganizado obtenido a partir de diversos tipos de inóculos (Sagawa y Kunisaki, 1990).

Murashige (1974), Torres (1988), Pierik (1990) y Krikorian (1991b) mencionan que la multiplicación, en general, puede ser inducida a través de la brotación adventicia, por medio de embriones asexuales ó a través de los brotes axilares.

Embriogénesis Somática de Células

De acuerdo con Torres (1988) y Chu y Kurtz (1990) este proceso ha resultado de mayor potencial para realizar la rápida propagación clonal, en donde una sola célula es inducida para producir un embrión, el cual dará origen a una planta completa. Consideran a los embriones somáticos como estructuras organizadas que se originan a partir de células somáticas pero cuya morfología se asemeja a aquella de un embrión desarrollado cigóticamente. A su vez los embriones somáticos pueden desarrollarse en cultivo de callo o más comúnmente en cultivo de células en suspensión.

La producción de embriones somáticos a partir de células, tejido y cultivo de órganos puede ocurrir de manera directa o indirecta. La embriogénesis somática directa involucra la formación de un embrión asexual a partir de una sola célula o de un grupo de células sobre una parte del tejido sin la intervención de la fase de callo; y la embriogénesis indirecta consiste en el establecimiento de un inóculo en cultivo, la subsecuente proliferación de callo y el inicio de pro-embryones (usualmente sobre un medio con una alta concentración de auxinas) y la transferencia del callo a un medio nutritivo con reguladores de crecimiento en orden a inducir la formación de embriones bipolares a partir de pro-embryones iniciales (Tisserat, 1985).

Los procedimientos de embriogénesis somática no sólo son útiles para alcanzar una multiplicación práctica, sino que suministran posibilidades únicas para investigar: a) la totipotencialidad de las células maduras quiescentes según existan en el cuerpo de la planta intacta; y b) los factores que controlan la dirección y el ritmo del desarrollo posterior de la misma (Krikorian, 1991b).

En la investigación sobre la alta frecuencia de la embriogénesis somática y regeneración de planta a partir de embriones cigóticos derivados de cultivos de callos de tres especies de Allium, Van der Valk *et al.* (1992) encontraron que fue inducida la formación de callo embriogénico sobre el medio Murashige y Skoog suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético; además consignaron que este callo embriogénico fue similar en apariencia en las tres especies de Allium; lográndose la regeneración de la planta en una alta frecuencia para todas las accesiones probadas a partir del callo compacto a través de la embriogénesis somática cuando se usó medio MS (medio de regeneración) adicionado con cinetina. Los resultados mostraron que para los cultivares Oporto y Beltsville Bunching la adición de ácido abscísico estimuló la formación de embriones somáticos y el número de brotes.

Inducción del Desarrollo Axilar

La totipotencia exhibida por el meristemo apical y la región del brote apical adyacente ha formado las bases de la propagación clonal comercial para numerosas especies vegetales, ya que pueden regenerar plantas a través de las yemas axilares. Las plantas obtenidas mediante ésta técnica mantienen la composición genética de la planta madre (Murashige citado por Tisserat, 1985).

Para el caso de la multiplicación de brotes de yemas terminales, así como en las axilares o laterales, Krikorian (1991b) menciona que el punto de inicio puede estar en los meristemas, los ápices de los brotes, las yemas, los nudos o los brotes de las yemas en raíces.

Así mismo, Torres (1988), explica que un inóculo que posee una sola yema puede desarrollar un solo brote o producir brotes múltiples, esto depende de la especie y del medio de cultivo utilizado. A su vez, los nuevos brotes desarrollados, en su turno producen yemas a lo largo de su eje; a través del subcultivo repetido, (este proceso puede ser repetido indefinidamente) y a la par con el desarrollo de la yema, puede haber formación de callo y originarse brotes adventicios a partir de la región meristemática del callo, de este modo se producirán más plántulas. Normalmente son utilizadas las citocininas a concentraciones de 1-30 mg.l⁻¹ para inducir proliferación axilar de la yema. Después de varios subcultivos, las plántulas derivadas *in vitro* pueden ser transferidas a otro medio o sustrato para inducir su enraizamiento.

Por este sistema de regeneración, la dominancia apical es suprimida en los brotes o yemas vegetativas, y el medio de cultivo y las condiciones ambientales son manipuladas a inducir brotación axilar y producción de brotes múltiples (Chu y Kurtz, 1990).

Este método ha resultado bueno para obtener una rápida multiplicación clonal, y se ha aplicado a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas (Krikorian, 1991b).

Utilizando esta metodología para la inducción *in vitro* de brotes múltiples y la regeneración de la planta a partir de brotes apicales de frijol garbanzo (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), Gulati y Jaiwal (1992) estudiaron las condiciones para la regeneración de la planta a partir de brotes apicales disectados, directamente sin la intervención de la fase de callo y sobre

medio Murashige-Skoog más las vitaminas de Gamborg (B₅); en donde la regeneración de la planta varió con el genotipo, tamaño del inóculo y las combinaciones de reguladores de crecimiento en el medio, además cuando se adicionaron las citocininas fue inducida una cantidad variable de callo en la base del brote apical, seguido por la formación de múltiples brotes. Los resultados que obtuvieron mostraron que la benciladenina (BA), cinetina y zeatina al 5×10^{-6} M; cada una indujo brotes múltiples en el 100% de los inóculos pero el más alto número de regenerantes por inóculo (9) fueron producidos con BA. La eficacia de BA sobre la multiplicación del brote se redujo cuando fue suplementada con ácido naftalenacético ó ácido indolacético. Determinándose que los requerimientos de los reguladores de crecimiento del inóculo para la inducción de brotes varió con el tamaño del mismo. También encontraron que los brotes apicales mantuvieron la habilidad para proliferar durante los subcultivos y que ningún tratamiento fué efectivo en inducir la diferenciación de yemas a partir de callo.

En otra investigación en donde los objetivos fueron lograr inducir el máximo crecimiento y la formación del bulbo de tres variedades de ajo (*Allium sativum* L.) a partir del cultivo *in vitro* de brotes apicales; Cárdenas *et al.* (1994) encontraron que utilizando brotes apicales con dos primordios (3-5 mm de longitud) disectados a partir de dientes asépticos y cultivados por dos meses sobre medio Murashige-Skoog o Gamborg, Miller y Ojima, conteniendo diversas combinaciones de reguladores de crecimiento (0.01, 0.03 mg.l⁻¹ de AIA y 0.1, 1.0 mg.l⁻¹ de cinetina), la máxima tasa de crecimiento fue inducida con los más altos niveles de AIA y cinetina.

A través de la proliferación de brotes axilares, Sandhu *et al.* (1994) lograron la micropropagación de arroz Indica variedad Java; en la cual se obtuvo un desarrollo de brotes múltiples bajo el siguiente procedimiento: utilizaron plántulas de una semana de edad obtenidas sobre el medio básico MS y subcultivadas sobre medio MS solidificado con agar y adicionado

con citocininas, sacarosa (3% p/v) y manitol (1% p/v) dirigidas a desarrollar brotes múltiples. Los cultivos de brote fueron mantenidos y multiplicados en un medio líquido conteniendo 5 mg.l⁻¹ de BAP, sacarosa (3% p/v) y manitol (1% p/v). El enraizamiento profuso fue obtenido al transferir a un medio MS líquido con 1 mg.l⁻¹ de ácido indolbutírico y sacarosa (3% p/v).

En el caso de especies leñosas; Chauhan *et al.* (1994), indujeron la rápida micropropagación de (Dalbergia sissoo Roxb.) a través de las técnicas *in vitro*, por la proliferación de yemas axilares a partir de plantas de 30-40 años de edad. La brotación de la yema fue inducida a los seis días cuando se cultivaron sobre el medio MS adicionado con cinetina (2-5 ppm), ácido indolbutírico (0.1 a 0.5 ppm) y benciladenina (2 a 5 ppm). El alargamiento y la formación de brotes múltiples ocurrió a los quince días sobre un medio MS con la concentración de las sales reducidas y con cinetina. Mientras que el enraizamiento se obtuvo en medio MS adicionado con ácido naftalenacético y ácido indolbutírico en menos de cinco días.

Utilizando la metodología básica similar al trabajo anterior; Deshpande *et al.* (1994), también indujeron la rápida multiplicación *in vitro* de (Ficus religiosa L.), utilizando nudos juveniles como inóculos; colectados a partir de árboles maduros. Las yemas apicales y axilares, latentes sobre estos nudos, brotaron, cuando se cultivaron sobre medio MS adicionado con 2 a 5 ppm de BA y 0.5 a 2.0 ppm de AIB. La formación de brotes múltiples fue inducida cuando las yemas del brote fueron transferidas al medio MS adicionado con una reducida concentración de BA y 1 a 2 ppm de sulfato de adenina. Las raíces de estos brotes regenerados fueron inducidas sobre un medio MS y agregando auxinas sintéticas, 0.1 a 1 ppm de ANA y 0.5 a 2 ppm de AIB. La proliferación de éstas raíces fue inducida al transferir al medio MS con la mitad de la concentración de los macro y micronutrientes.

Desarrollo de Brotes Adventicios

A los brotes adventicios y órganos relacionados, Torres (1988) los define como estructuras que se originan en tejido localizado en otras áreas diferentes de axilas de hoja o brotes apicales. Los brotes adventicios, raíces, bulbos, y otras estructuras especializadas pueden originarse a partir de tallos, hojas, tubérculos, cormos, bulbos, o rizomas. A este proceso Tisserat (1985) y Krikorian (1991b) le llaman organogénesis directa y cuando los brotes adventicios u órganos se originan a partir de callo, el cual sirve como intermediario entre el inóculo y la producción de la plántula, éste proceso lo consignan como organogénesis indirecta. El número de propágulos se incrementa subdividiendo o recultivando los órganos o callo derivado *in vitro*. Las plántulas ó propágulos logrados utilizando ésta técnica también pueden ser transferidos al enraizamiento (Torres, 1988).

Sin embargo, la proliferación del brote adventicio y el uso del cultivo de callo puede resultar en una pérdida del potencial morfogénico del tejido o un incremento en la variabilidad genética; al respecto Hughes citado por Torres (1988) menciona que han sido propuestas diversas explicaciones acerca de la pérdida del potencial morfogénico, entre las cuales puede ser que haya pérdida de centros meristemáticos en un callo debido a que los centros están siendo estimulados a producir brotes a través del subcultivo repetido; otra explicación sería que las variaciones o reducciones en los niveles de *hormonas endógenas* que no pueden ser substituídos por cualquier constituyente conocido y la acumulación de anomalías en el cromosoma tales como cambios en el nivel de ploidía o rearrreglo de los cromosomas; como consecuencia provocando cambios genéticos.

Para quienes buscan la multiplicación de plantas de una manera estrictamente clonal no es muy favorable utilizar la ruta de la organogénesis indirecta, Krikorian (1991b) se apoya en la

teoría anterior; en la cual ciertas evidencias sugieren que la formación de callos en estos sistemas constituye a menudo la base para obtener variación genética e inestabilidad.

Al respecto, Franklin *et al.* (1991) lograron inducir la regeneración de planta a partir de inóculos de plántulas de tres días de edad de frijol ejotero (Phaseolus vulgaris L.) vía organogénesis. Utilizando como inóculo un cotiledón y una pequeña porción (2-3 mm) de eje embrionario partido a la mitad. Los inóculos fueron cultivados sobre un medio definido conteniendo glutamina como única fuente de nitrógeno. Un anillado de tejido meristemático fue producido en la base de la yema axilar localizado en el nudo cotiledonar. El tejido meristemático fue producido solamente si la yema axilar estaba presente junto con el cotiledón en el inóculo. Las yemas y los brotes se desarrollaron a partir del anillado meristemático. La producción de yemas y brotes fue un proceso continuo, ya que los brotes nuevos pudieron ser removidos desde el inóculo para la producción de la plántula cada 10-14 días. Fueron regenerados un promedio de 49 yemas y 8 brotes por inóculo a los 30 días del cultivo con el cultivar Dark Red Kidney. El 67% de los brotes produjeron raíz, y el 90-95% de las plántulas sobrevivieron a la aclimatación en el invernadero para producir plantas completas.

Además de los procesos de embriogénesis somática, la organogénesis y la inducción del desarrollo axilar; Krikorian (1991b) propone otras metodologías que han sido utilizadas en menor escala, como son los órganos de perennidad formados en cultivos asépticos, el microinjerto así como el cultivo de embriones y esporas.

Al respecto, Yasseen *et al.* (1994) describieron un procedimiento para regenerar brotes y bulbos *in vitro* con una alta frecuencia a partir de brotes apicales de plantas de ajo (Allium sativum L.) y chalote (Allium ascalonicum L.) usando benciladenina o tidiazuron. En donde los brotes regenerados fueron inducidos a formar bulbos en el medio Murashige y Skoog (1962)

conteniendo 5 g.l⁻¹ de carbón activado y 120 g.l⁻¹ de sacarosa bajo un fotoperíodo de día largo. Además mencionan que los bulbos formados *in vitro* fueron transferidos al suelo sin aclimatación y produjeron plantas viables.

En cuanto a la utilización del microinjerto, existe el antecedente de los trabajos de Navarro *et al.* (1975) quienes establecieron las condiciones para aplicarlo en forma de rutina, mencionan que la técnica consiste en injertar un brote apical muy pequeño, escindido de una planta infectada, en la punta de una plántula patrón germinada en oscuridad y decapitada bajo condiciones asépticas. Este procedimiento ha dado excelentes resultados en la obtención de líneas clonales de cítricos libres de patógenos tales como virus, viroides y organismos similares a micoplasmas, entre los que se encuentran: tristeza, amarillamiento de las plántulas, psorosis A, psorosis B, concovidad gomosa, infección jaspeada, vena lobulada, moteado del Dweet, vena amarilla, cachexia, stubborn y exocortis (Navarro y Juárez, citados por Rodríguez, 1982).

El cultivo de embriones *in vitro* ha sido de gran utilidad para lograr la regeneración de plantas de híbridos interespecíficos; según la metodología seguida por Uralets (1984) extrayendo los embriones de las semillas de frutos de 19-25 días de edad de un híbrido F1 (*Lycopersicon esculentum* Mill) X (*L. minutum*) y cultivados sobre un medio Linsmaier y Skoog con 5% de sacarosa y 3 mg.l⁻¹ de cinetina, lograron inducir la formación de callo, el desarrollo del tallo y la producción de plántulas regeneradas. Consignando que fueron obtenidas 18 plántulas a partir de un embrión cultivado.

Para la micropropagación de pino Alepo (*Pinus halepensis* Mill.), Lambardi *et al.* (1993) encontraron que utilizando los embriones maduros intactos, dieron origen a la formación de yemas adventicias durante un período de cuatro semanas sobre un medio sólido von Arnold y Eriksson's (AE) adicionado con solamente 5.0 μM de BA. El desarrollo de las yemas

adventicias fue inducido sobre un medio AE libre de hormonas, mientras que el alargamiento de los brotes fue óptimo sobre un medio Bornman's MCM a las tres cuartas partes de su concentración y con 0.1% de carbón activado de coníferas. Los brotes fueron multiplicados sobre el medio MCM a las tres cuartas partes de su concentración, conteniendo 5 μ M de BA.

Etapas de la Micropropagación

Murashige (1974) menciona que la propagación de una planta a través del cultivo de tejidos puede proceder a través de una secuencia de etapas; a nivel comercial ya se han identificado la mayoría de ellas y virtualmente fueron establecidas las condiciones óptimas de cada una. En general describe tres etapas importantes, cada una con diferentes objetivos y posiblemente con diferentes requerimientos.

Etapa 0. Selección y Preparación de las Plantas Madre

Torres (1988) y Krikorian (1991b) proponen una etapa anterior a la primera que la denominaron etapa 0; Evans (1990) la enumera como etapa I, en la que se enfatiza la importancia de la selección y preparación de las plantas madre, como una modalidad de pretratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.

Lo anterior es importante debido a que los cambios en temperatura, longitud del día, intensidad de luz, y disponibilidad de agua a través de un año podrá afectar los niveles de carbohidratos, proteínas y sustancias de crecimiento en las plantas donadoras, esto subsecuentemente afecta la respuesta del explante in vitro. La época del año en que el explante es tomado puede afectar también los resultados del programa de micropropagación. Los

mejores resultados son logrados generalmente cuando el explante es tomado durante la fase activa de crecimiento (Torres, 1988).

Etapa I. Establecimiento del Cultivo Aséptico

El objetivo de la etapa I es simplemente obtener un cultivo de tejidos aséptico de la planta en cuestión, Murashige (1974), Hartmann y Kester (1987), Torres (1988); Evans (1990), *la categoriza como etapa II, para el caso de multiplicación de yemas axilares.*

El primer objetivo de la etapa uno es obtener un gran porcentaje de explantes libres de patógenos; esto se logra sometiendo al tejido a un lavado con agua corriente, seguido por la esterilización con uno o más desinfectantes a concentraciones apropiadas y en tiempos determinados según la especie (Torres, 1988).

Una vez que ya se logró el establecimiento aséptico y existan evidencias como el alargamiento de los brotes apicales, presencia de yemas adventicias, embriones adventicios aparentes ó callo bien desarrollado, entonces se habrá cumplido con el objetivo de la etapa I (Murashige, 1974; Hartmann y Kester, 1987).

En esta etapa, tal vez la selección del explante es el más crítico ya que debe ser fisiológicamente competente para sobrevivir el cultivo inicial y provocar la respuesta apropiada (Hartmann y Kester, 1987)

En cuanto a la selección del explante, Murashige (1974) menciona que es importante considerar los siguientes aspectos: el órgano que va a servir como fuente del tejido, la edad fisiológica y ontogenética del órgano, la estación en la cual el explante ha sido obtenido, el

tamaño del explante; y en general, la calidad de la planta a partir de la cual los explantes son obtenidos.

Etapa II. Multiplicación del Propágulo

El mayor éxito de la etapa II es la rápida multiplicación de propágulos; esto se logra a través del subcultivo repetido hasta obtener el número de propágulos o plántulas deseadas (Torres, 1988; Sagava y Kunisaki, 1990).

Este incremento puede ser realizado por varios procedimientos alternativos, ya sea por el desarrollo de yemas axilares y terminales, también por la inducción de brotes adventicios ó a través del proceso de embriogénesis somática (Murashige, 1974; Evans *et al.*, 1981a; Hartmann y Kester, 1987; Torres, 1988; Sagawa y Kunisaki, 1990).

Como la variabilidad genética ha sido asociada con la regeneración de la planta con la fase *intermedia* de callo; el método de organogénesis adventicia no es recomendado para la propagación clonal; a diferencia del método de multiplicación de brotes axilares, el cual puede ser más lento, pero la uniformidad genética de las plantas obtenidas a través de este metodo se ve favorecida (Murashige, 1974; Evans et al., 1981a; Chu y Kurtz, 1990).

En la etapa II el medio nutritivo es el más crítico, puesto que su propósito es para la multiplicación del propágulo. El medio es frecuentemente enriquecido con sustancias que inducen organogénesis, especialmente la formación del brote (Murashige, 1974).

El medio nutritivo básicamente está constituido por una mezcla de sales inorgánicas, sustancias orgánicas y complejos naturales; Murashige (1974), menciona que los componentes

orgánicos más críticos del medio de propagación de plantas son las auxinas y las citocininas. Las auxinas, difieren significativamente en estabilidad, eficacia y su influencia sobre la organogénesis. La auxina preferida es el ácido indolacético; si no es efectiva, muestra una adversidad mínima sobre la formación del órgano. En contraste, la auxina 2,4-D es la más potente, y mientras que estimula los cultivos de callo, antagoniza fuertemente con el desarrollo organizado. Las otras auxinas son más intermedias en eficacia y en su actividad adversa morfogenética.

Las citocininas tienen un intervalo amplio de efectos regulatorios; estas promueven la división celular y el efecto tiene lugar con concentraciones tan bajas como 5×10^{-11} M; generalmente inhiben el crecimiento de las raíces, pudiendo estimular en muy bajas concentraciones (5×10^{-8} M) la iniciación del crecimiento de raíces laterales; además, inhiben la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas, actúan en el retraso de la senescencia, en la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis, ya que pueden ser inducidas yemas en tejidos *in vitro* de callo, hojas, raíces, cotiledones o piezas de tallo (Hurtado y Merino, 1991).

Etapa III. Enraizamiento In Vitro y Acondicionamiento

Los brotes derivados *in vitro* pueden ser inducidos a producir raíces ya sea *in vitro* durante la etapa III o *in vivo* durante la etapa IV (Torres, 1988).

Para Murashige (1974) ésta es la última etapa, en la cual el objetivo final es preparar el propágulo para su sucesiva transferencia al suelo. Esta etapa involucra el enraizamiento de los brotes disectados, endurecimiento de las plantas para impartir alguna tolerancia al estrés de

humedad, conferirle un grado de resistencia a ciertos patógenos, y la conversión de plantas desde el estado heterotrófico al estado autotrófico.

En algunas especies, para inducir enraizamiento se requiere transferir los brotes a un medio libre de citocininas. Así mismo, en muchas especies la iniciación de raíces ocurre solamente en la presencia de auxina. La necesidad para subcultivar los brotes sobre una fuente de auxina para iniciación de raíz puede ser eliminada por el remojo de los brotes por períodos cortos de tiempo en una solución concentrada de auxina estéril, antes del recultivo sobre el medio en la etapa III (Torres, 1988).

A esta etapa Hartman y Kester (1987) le llaman pretrasplante, mencionando que el propósito de la misma es preparar a las plántulas para su trasplante del medio artificial heterótrofo del tubo de ensaye a una existencia de vida libre autótrofa en el invernadero y luego en su sitio definitivo. Ellos describen tres formas básicas para lograr el enraizamiento, coincidiendo con Torres (1988) en algunos aspectos sobre el manejo:

1. Se pueden hacer estacas individuales y plantarse directamente en un medio de enraizamiento, bajo niebla y con humedad elevada, con o sin tratamiento que estimulan el enraizado.

2. Se pueden volver a cultivar propágulos individuales en nuevos recipientes, en un medio de cultivo reduciendo u omitiendo la citocinina, con un incremento en la concentración de auxina y a menudo reduciendo el contenido de sales inorgánicas. En otras plantas el enraizamiento es mejor si el propágulo se mantiene sólo 1 o 2 días en el medio con auxina y luego se transfiere a otro que no contenga auxina. O bien, el propágulo puede simplemente ser sumergido inmediatamente en una solución de enraizamiento (auxina) e insertado directamente en un medio libre de auxina.

3. El tercer método consiste en introducir entre la etapa dos y etapa tres una fase de "alargamiento", colocando los propágulos en un medio de agar durante 2 a 4 semanas, sin citocinina (o con concentraciones muy bajas de la misma) y, en algunos casos, añadiendo (o aumentando) ácido giberélico. Después los propágulos se manejan como se describió anteriormente en los métodos 1 y 2.

Etapa IV. Enraizamiento In Vivo y Aclimatación

Las plantas enraizadas, o sin enraizar, se sacan del recipiente de cultivo, se lava por completo el agar que llevan adherido, para remover una fuente potencial de contaminación y se trasplantan a una mezcla de suelo estándar, esterilizada, en macetas pequeñas en una forma más o menos convencional (Fordham citado por Hartmann y Kester, 1987).

Cuando los brotes son transferidos fuera del frasco de cultivo para su enraizamiento, pueden utilizarse varios materiales como medios de soporte; Torres (1988) aclara que generalmente se utilizan mezclas de suelo, entre los cuales se incluyen la turba, perlita, vermiculita, arena, corteza de árbol y también puede agregarse limo o fertilizante. Encontrándose diversas respuestas en cuanto a la formación de raíz con la utilización de los diferentes materiales de soporte; por ejemplo, la turba puede ser muy ácida para el enraizamiento de ciertas especies; mientras que la vermiculita puede resultar muy alcalina. Por lo anterior menciona que la mezcla ideal para enraizamiento tiene que ser de preferencia neutra o ligeramente ácida, con una alta capacidad de retención de humedad y a la vez que provea un buen drenaje y aereación.

En cuanto a la aclimatación de especies cultivadas asépticamente in vitro , Brainerd y Fuchigami citados por Torres (1988) la han definido como un proceso por el cual un organismo

se adapta a un cambio ambiental. La aclimatación es necesaria porque las plántulas derivadas *in vitro* no están adaptadas ni establecidas en condiciones *in vivo*. Las plantas logran aclimatarse reduciendo gradualmente la humedad relativa en su ambiente; ésto puede lograrse simplemente reduciendo la cantidad de vapor de agua recibida o haciendo cortes en la bolsa plástica o destapando gradualmente las caja o macetas en que están contenidas las plántulas. También se ha demostrado en diversos trabajos que el empleo de antitranspirantes en forma de "spray" resulta benéfico en el endurecimiento del tejido de las plantas (Torres, 1988).

La Función de los Reguladores de Crecimiento en el Cultivo

In Vitro

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores de crecimiento juegan un papel muy importante puesto que actualmente se reconoce que la mayor parte (si no la totalidad) de la actividad fisiológica está mediada por éstos (Devlin, citado por Hurtado y Merino, 1991). Y se puede decir que el cultivo *in vitro* es generalmente imposible sin reguladores; ya sea para conseguir el alargamiento y/o la división celular (Pierik, 1990).

De los reguladores de crecimiento conocidos, los más importantes en el cultivo de tejidos vegetales son: auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico (Torres, 1988) los cuales pueden influir en múltiples procesos; por ejemplo Kyte (1983) consigna que las auxinas promueven el alargamiento celular y la iniciación de la raíz mientras que las citocininas están involucradas en la división celular y la iniciación de brotes. Sin embargo las diferencias en los requerimientos de reguladores de crecimiento para la multiplicación de brotes y la producción de callo depende del genotipo, tipo y concentración de los reguladores de crecimiento (Uddin *et al.*, 1988) así como de las hormonas endógenas de los explantes (Reynolds *et al.*, 1982; Gulati y Jaiwal, 1992). Lo anterior es apoyado por Stommel y Sinden (1991) quienes estudiaron la

variación en la respuesta de regeneración entre accesiones de tomate silvestre, a partir de explantes de hoja; encontrando que las hormonas en el medio de cultivo tuvieron un efecto significativo sobre la formación de brote para (*L. hirsutum* f. *tipicum*) y (*L. hirsutum* f. *glabratum*).

La Función de Citocininas y Auxinas

Las dos clases de hormonas más importantes son las auxinas y las citocininas, que controlan la formación de la raíz, del tallo y el callo, aunque en ocasiones se han usado las giberelinas para inducir el alargamiento de los tallos (Hartmann y Kester, 1987).

Bidwell (1979) resume de la siguiente manera las funciones en las que participan las citocininas y auxinas:

Citocininas

- División celular (inducción y promoción; interactúa con las auxinas)
- Alargamiento celular
- Formación de órganos (interactúa con auxinas)
- Contrarresta el letargo
- Liberación de la dominancia apical
- Prevención de la senescencia
- Movilización de los nutrientes
- Regulación de los polirribosomas

Auxinas

- Formación de órganos (interactúa con las citocininas)
- Organización de tejidos (interactúa con otros factores)
- Estimulación de la división celular (interactúa con las citocininas)
- Alargamiento celular (estimula a través de la secreción de protones)
- Relajación de la pared celular (estimula a través de la secreción de protones)
- Síntesis del RNA y de las proteínas
- Dirección del transporte
- Efectos enzimáticos
- Producción de etileno
- Respuestas trópicas y násticas (a veces quizá debidas al etileno)
- Dominancia apical
- Prevención de la abscisión

En el cultivo *in vitro* de plantas, las citocininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo; ya que promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical; también retardan el envejecimiento (Pierik, 1990). Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina (Bidwell, 1979; Kyte, 1983; Pierik, 1990; Hurtado y Merino, 1991).

Al respecto, Torres (1988) menciona que las citocininas son generalmente adicionadas al medio de cultivo para estimular la división celular, inducir la formación del brote y la proliferación de brotes axilares, e inhibir la formación de la raíz.

En cambio, las auxinas generalmente producen: alargamiento y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), además formación de raíces adventicias (Bidwell, 1979; Kyte, 1983; Pierik, 1990); inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios y frecuentemente inducen embriogénesis en los cultivos en suspensión (Pierik, 1990).

Lo anterior coincide con lo señalado por Torres (1988) quien menciona que las auxinas son incluidas generalmente en un medio de cultivo para estimular la producción de callo y crecimiento celular, también para el inicio de brotes y particularmente raíces; para inducir embriogénesis somática y estimular el crecimiento a partir de ápices de brote y cultivos de brotes apicales.

Torres y Murashige (1987) encontraron que el mayor número de raíces y el máximo crecimiento de callo fueron obtenidos en la ausencia de BA y en proporción directa a AIA en cultivos de cotiledón de tres especies de tomate. Además de afectar el número de raíces y brotes formados, las auxinas también inhiben la respuesta directa normal (Paterson, 1982).

Otros Reguladores de Crecimiento

Además de las auxinas y citocininas, se ha demostrado que algunos compuestos pueden actuar como reguladores, presentando algunos actividad tipo citocinina y en general se observó que participan en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas.

Con respecto al papel del etileno en la organogénesis *in vitro*, Huxter citado por Pierik (1990) menciona que no existe unanimidad de criterios, ya que solo en algunos casos, el etileno ejerce un efecto positivo.

Las oligosacarinas (definidas estructuralmente como fragmentos de los polisacáridos de la pared celular), pueden actuar como reguladores, no solo disparando los mecanismos de defensa de las plantas, contra los patógenos u otros tipos de estrés , sino también regulando la tasa de crecimiento y diferenciación, para producir raíces, flores y yemas vegetativas (Albersheim y Darvill y Albersheim *et al.* citados por Pierik, 1990).

Desde que se descubrió que el DPU (N,N,-difenilurea) presentaba actividad tipo citocinina, se ha visto que muchas otras ureas di-sustituídas tienen la misma característica. Los compuestos más activos son las piridil ureas (tidiazurón y derivados), que son hasta 10,000 veces más activas que el DPU, y más activas que las citocininas naturales, tipo adenina como la zeatina (Pierik, 1990).

Otros compuestos que se ha demostrado están relacionados con la diferenciación celular y el desarrollo durante la embriogénesis son las poliamidas. Los niveles endógenos de poliamidas, especialmente putresceína y espermidina, se incrementan de forma sustancial durante la formación del embrión en zanahoria. La embriogénesis es inhibida por la adición de

inhibidores de la síntesis de poliaminas, y se restablece con la putresceína, espermidina y espermidina (Pierik, 1990).

También se ha demostrado que algunos compuestos polifenólicos promueven el crecimiento; tal es el caso tanto del endosperma sólido como el fluido de los frutos inmaduros de (*Aesculus woerlitzensis*) producen extractos promotores del crecimiento (List *et al.*, citados por Krikorian, 1991a).

Balance de Reguladores de Crecimiento Requerido para la Proliferación In Vitro

El descubrimiento de Skoog y Miller quienes señalaron que la iniciación de raíz y brote es básicamente regulada por la interacción entre dos sustancias hormonales (auxina y citocinina) constituye el principio por el cual ha sido posible la aplicación del cultivo de tejidos en numerosas especies (Murashige, 1974); sus investigaciones mostraron que una alta relación de citocinina:auxina, estimuló la formación de yemas cuando estos químicos fueron adicionados en el medio de cultivo (Evans, 1990).

Lo anterior es importante puesto que el control de iniciación de raíz y brote por el balance de auxina:citocinina parece ser un fenómeno general entre las plantas, consigna Murashige (1974) y además menciona que una alta concentración relativa de auxina favorece la iniciación de raíces, al mismo tiempo que reprime la formación del brote. En contraste, altas concentraciones relativas de citocinina induce la iniciación del brote y reprime el enraizamiento.

El tipo de morfogénesis que ocurra en una planta a través del cultivo de tejidos depende considerablemente de la relación y además de las concentraciones de auxinas y citocininas presentes en el medio (Torres, 1988).

Con respecto a lo anterior, Kurtz y Lineberger (1983) observaron distintas respuestas in vitro cuando cultivaron secciones de hoja de tomate, variando las concentraciones de auxina y citocinina. El enraizamiento fue promovido en presencia de únicamente AIA; proliferación de callo cuando ambas AIA y BA estuvieron presentes (0.2 mg.l^{-1} AIA y 1 ó 5 mg.l^{-1} BA); y regeneración del brote con concentraciones favorables de AIA y BA.

Mientras que Uddin *et al.* (1988) mencionan que utilizando combinaciones de ANA con BA en el medio de cultivo, el resultado fue la proliferación de callo en la mayoría de los cultivares de tomate probados, cuando la concentración relativa de la auxina fue mayor; y en general la proliferación de brotes a partir de explantes de cotiledón fue efectiva utilizando una combinación de AIA y cinetina o únicamente zeatina.

Reguladores de Crecimiento más Comunes Utilizados en Cultivo In Vitro

De las auxinas "naturales", el AIA es el compuesto de mayor utilización (Torres, 1988; Scott, citado por Krikorian, 1991a). Sin embargo, existen otras auxinas también llamadas "naturales", que incluyen al indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-alcetaldehído, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, ácido indolpropiónico, ácido 5-hidroxiindol-3-acético, ácido indol-3-acetilaspartico (Krikorian, 1991a).

Otras sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que han sido producidas químicamente; son las llamadas "auxinas sintéticas", entre las cuales el 2,4-D, el ANA y el AIB

se encuentran ampliamente disponibles y su utilización es muy común. En relación al AIA se les considera más activas. Existen también muchos compuestos de amplia utilización que son derivados de los ácidos fenilacético o fenoxiacético (clorosustituídos) (Pierik, 1990; Krikorian, 1991a).

En los estudios *in vitro* también han sido utilizados a bajas concentraciones el ácido 4-clorofenoxiacético o ácido p-clorofenoxiacético (4-CPA, PCPA), ácido (2,4,5,-triclorofenoxi) acético (2,4,5-T), ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba), y el ácido amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) (Torres, 1988).

Con respecto a las citocininas, Murashige (1974) y Kyte (1983) consignan a la cinetina, iso-pentil adenina (2iP, también llamada 6-(γ,γ -dimetilalil) aminopurina y la benciladenina (BA, o bencilaminopurina, BAP) como las más disponibles ya que son manufacturadas sintéticamente.

En cuanto a la cinetina, aunque no se ha demostrado como un compuesto natural, ha recibido mucha atención como una sustancia estimuladora de la división celular; mientras que otra citocinina, la zeatina, se considera generalmente como el prototipo de las adenilcitocininas que ocurren naturalmente; y es unas 10 veces más potente que la cinetina (Krikorian, 1991a).

En 1982, fue consignado que el tiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-ylurea)(TDZ) presentaba actividad citocínica; desde entonces ha sido utilizado como tal, ya que induce exitosamente la formación del brote adventicio *in vitro* y promueve la proliferación de brotes axilares; incluso, en especies leñosas recalcitrantes (Lu, 1993).

El tidiazuron es un derivado de la urea y no contiene el anillo púrico común a las otras citocininas tipo adenina. La concentración de TDZ utilizada para micropropagación va desde 0.0022 a 0.088 mg.l⁻¹; la cual es mas baja que la empleada normalmente para inducir la formación de brotes adventicios (Lu, 1993).

Así mismo, otra respuesta inducida por el TDZ, ha sido la formación de estructuras parecidas a embriones somáticos en diversas especies, cultivadas sobre un medio para leñosas conteniendo además 2,4-D. Sin embargo, recientemente Saxena *et al.*, citados por Lu (1993) encontraron que trabajando con un medio conteniendo solamente TDZ, se produjo la formación de embriones somáticos de cacahuete.

Sin embargo, Lu (1993) concluye que una de las desventajas para su utilización es que largas exposiciones al TDZ puede causar hiperhidricidad, crecimiento del brote anormal y dificultad en el enraizamiento.

Existe otro compuesto señalado por Debergh *et al.* (1993) como otra alternativa de uso para regulador de crecimiento de plantas en sistemas de cultivo de tejidos, éste es el carbendazim.

El carbendazim es el ingrediente activo de la formulación comercial Derosal (BASF). Sin embargo, surge también como el producto final del metil tiofanato y benomil, los cuales son los ingredientes activos de los productos comerciales Topsin M (distribuidos por diferentes compañías) y Benlate (distribuido por Dupont, Wilmington, DE). La conversión en carbendazim ocurre en agua y sobre las plantas. Para el caso del benomil, éste es degradado a carbendazim después de esterilizarlo junto con el medio de cultivo (Maxwell citado por Debergh *et al.*, 1993).

Antecedentes del Cultivo In Vitro de Tomate

Las especies solanáceas han sido utilizadas como modelo para estudios in vitro.

Por ejemplo, Vasil e Hildebrandt y Takebe *et al.*; citados por Evans *et al.* (1981b) mencionan que la totipotencia fue primero demostrada en (Nicotiana tabacum L.) puesto que se ha logrado la regeneración de plantas a partir de una sola célula.

Así mismo, diversas especies de Lycopersicon han sido estudiados en sistemas in vitro con distintos objetivos.

En el tomate cultivado (L. esculentum Mill.) generalmente ha sido empleado el medio MS para estudios con cultivo de tejidos (Padmanabhan *et al.*, citados por Evans *et al.*, 1981b). El callo en esta especie puede ser inducido a partir de varios explantes, sin embargo, las secciones comunmente más utilizadas han sido el hipocotilo y hoja. En la inducción de callo normalmente son utilizadas también, combinaciones de reguladores de crecimiento; de tal forma que la formación del brote puede ocurrir sobre el mismo medio o bien sobre un medio con una alta concentración de citocinina con relación a la auxina o únicamente con citocinina (Kantha *et al.*, citados por Evans *et al.*, 1981b). La relación citocinina:auxina parece ser más importante para el control de la formación del brote de tomate que de la hormona específica utilizada (Evans *et al.*, 1981b).

En un estudio sobre el desarrollo de citocultivos de (Phaseolus vulgaris L.) y (Lycopersicon esculentum Mill.) en medios adicionados con aguamiel y agua de coco, López *et al.* (1978) lograron inducir el desarrollo de plantas, a partir de yemas apicales cultivadas en el medio sólido de Cresswell y Nitsch, cuando se incubaron en presencia de luz blanca fría fluorescente.

Kartha *et al.* (1977) desarrollaron un procedimiento para regenerar plantas a partir de meristemos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Starfire*). A partir de plántulas de siete días de edad; aislaron los meristemos del brote apical y fueron cultivados asépticamente sobre el medio de Murashige y Skoog (MS) adicionado con varias concentraciones de citocininas y auxinas bajo condiciones ambientales definidas. Los resultados mostraron que la benciladenina (BA) o zeatina (Z) a varias concentraciones desde 0.1 a 10 μM inducen la diferenciación del brote en alta frecuencia. Así mismo mencionan que todos los niveles probados de BA o Z en combinación con ácido indolacético (AIA) indujeron la diferenciación del brote. Obtuvieron la regeneración de la planta completa en un medio con las concentraciones de hormonas siguiente: 1) BA y ácido naftalenacético (ANA) en el rango de 0.1 a 1.0 μM , 2) 10 μM de Z en combinación con 1.0 μM de ANA o viceversa y 3) 10 μM de AIA.

En otra investigación, Frankenberger y Tigchelaar (1980) realizaron un análisis genético de la formación del brote a partir de discos de hoja de tomate disectados de germoplasma con diferente capacidad para formación del brote. Mencionan que la capacidad de formación fue heredable y tendencias definidas en la formación del brote fueron observadas entre los híbridos F1 dialélicos.

Con los antecedentes de que han sido observadas diferencias genotípicas en la capacidad para regenerar brotes de cultivares de tomate, Kurtz y Lineberger (1983) sembraron secciones de hoja de doce cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), donde evaluaron la respuesta morfogénica a veinticuatro combinaciones de ácido indolacético (0-2.0 mg.l^{-1}) y 6-bencilaminopurina (0-10 mg.l^{-1}). Las respuestas morfogénicas fueron dependientes del cultivar y exhibieron una máxima respuesta sobre un amplio rango de concentraciones de reguladores de crecimiento. Expresaron que los medios que contenían 0.2

mg.l⁻¹ de AIA y 1.0 o 5.0 mg.l⁻¹ de BA resultaron óptimos para la inducción de callo para muchos cultivares. Los explantes de hoja de todos los cultivares enraizaron sobre un medio adicionado solamente con 0.2-2.0 mg.l⁻¹ de AIA. Fueron encontradas diferencias genotípicas en la habilidad para regenerar brotes y en el número promedio de brotes regenerados. El medio óptimo para la regeneración del brote varió con el cultivar, pero muchos responden conteniendo 0.2 o 1.0 mg.l⁻¹ de AIA + 2.5 o 5.0 mg.l⁻¹ de BA. Los cultivares "Beter Boy", "Starfire", y "UC 134-1-2" regeneraron más brotes realmente, promediando mas de 10 brotes por cultivo. El cultivar "Starfire" fue más susceptible a la regeneración de brotes *in vitro* con 19 brotes por cultivo.

La eficiencia de la regeneración del brote y la cantidad de callo producido por el explante es influenciado por el genotipo y el tipo y concentración de reguladores en el medio de cultivo (Uddin et al., 1988). Por tal motivo examinaron la eficiencia de la producción de somaclones, desarrollando un sistema más eficiente para la regeneración del brote y la producción de la plántula de tomate para proceso.

Los logros alcanzados en la mayoría de las investigaciones anteriores fueron encontrar las condiciones para la regeneración óptima de ciertos genotipos de interés; por otra parte los avances en la investigación en cuanto al cultivo de tomate han sido los estudios en lo que a sistemas de transformación de plantas se refiere, por ejemplo Davis *et al.* (1991) apoyándose de diversas investigaciones anteriores en las cuales se ha enfatizado el uso de sistemas de transformación *in vitro* mediante *Agrobacterium* a través de secciones de hoja y segmentos de tallo de tomate, con el objetivo principal de introducir genes que le confieran cierta tolerancia a insectos, enfermedades bacterianas o fungosas y a ciertos pesticidas; realizaron un estudio para evaluar el porciento de transformación de tres cultivares de tomate para proceso: Ohio 7870, UCD82b y Roma, evaluando los efectos de la densidad del inóculo bacterial, cepa bacteriana y

edad de la hoja sobre la transformación. Encontrando diferencias en la eficiencia de la transformación entre las concentraciones bacterianas, cepa bacteriana y edad de la hoja.

También han sido publicados diversos protocolos para la regeneración de planta a partir de protoplastos de tomate cultivado y a partir de especies silvestres de Lycopersicon, lo cual resulta importante para la obtención de híbridos somáticos entre las especies silvestres que son las que le confieren características de resistencia o tolerancia importantes en el *mejoramiento de tomate cultivado*.

Al respecto, Latif *et al.* (1993) establecieron un protocolo para inducir la rápida y alta frecuencia de regeneración a partir de protoplastos de especies de tomate silvestre (Lycopersicon chilense Dun.). Debido a que presenta resistencia a enfermedades similar a otras especies silvestres de Lycopersicon; además algunas accesiones son también tolerantes a bajas temperaturas y a insectos.

III. MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en lo que concierne a las etapas de establecimiento, proliferación, enraizamiento y aclimatación.

Para la fase de trasplante a suelo, parte del material genético micropropagado se trasladó al invernadero y otra parte se trasplantó directamente al campo experimental, ambos pertenecientes a la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. ubicada en el municipio de Marín, Nuevo León.

Establecimiento In Vitro

Desinfestación de la Semilla

Con el propósito de obtener plántulas en condiciones asépticas, la semilla se sometió a pre-desinfestación con alcohol etílico al 70% v/v durante dos segundos e inmediatamente se procedió a la desinfestación sumergiendo la semilla en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% (solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% en solución acuosa) adicionada con 0.5 ml de polioxietileno sorbitan monolaurato (Tween-20) por un tiempo de 15 minutos. Enseguida se procedió al lavado de la semilla con agua bidestilada esterilizada por tres veces consecutivas para eliminar residuos de las soluciones que se utilizaron; el lavado o enjuague se realizó en la campana de flujo laminar Alder®.

Germinación de la Semilla

Previo a la siembra de la semilla se preparó el sustrato que consistió de agua-agar a razón de 8 g.l⁻¹. Para lograr que el agar quedara disuelto uniformemente se utilizó un microondas Panasonic® por un tiempo de 3 minutos; el agar se vertió en recipientes de vidrio para alimento infantil en un volumen de 25 ml por frasco, los cuales fueron tapados con una capa de papel aluminio y esterilizados en una autoclave eléctrica marca All american Modelo No. 25x a una presión de 1 kg/cm² y a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

Una vez llevada a cabo la desinfección, se sembraron lotes de semillas de los híbridos Heat Wave y Celebrity en el sustrato de agar en la campana de flujo laminar; lo anterior se efectuó con el auxilio de pinzas para disección (previamente flameadas sobre una lámpara de alcohol y completamente frías para evitar quemaduras a la semilla), sembrándose tres semillas en cada recipiente de cultivo (diez para cada híbrido).

Etapa de Proliferación de Brotes

Para la etapa de proliferación de brotes se diseñó un experimento con arreglo factorial en donde los factores bajo estudio fueron: las citocininas bencilaminopurina, cinetina y zeatina a dos concentraciones cada una: 1 mg.l⁻¹ y 10 mg.l⁻¹, aplicadas todas ellas a los híbridos Heat Wave y Celebrity; además se probaron los dos híbridos sin citocininas; la combinación de los niveles de los factores resultó con una estructura factorial de 2x3x2 + 2 dando un total de catorce tratamientos.

Los tratamientos resultantes del arreglo factorial se muestran en el Cuadro 1.

Medio de Cultivo

El medio de cultivo que se utilizó fueron las sales básicas de Murashige-Skoog (1962) con la adición de mio-inositol; glicina, piridoxina, ac. nicotínico y tiamina como fuentes de vitamina y azúcar.

Cuadro 1. Tratamientos probados en la etapa de proliferación de brotes.

Tratamiento	Híbrido	Citocinina	Concentración
1	Heat Wave	Sin citocinina	
2	Celebrity	Sin citocinina	
3	Heat Wave	Bencilaminopurina	1 mg.l ⁻¹
4	Heat Wave	Bencilaminopurina	10 mg.l ⁻¹
5	Heat Wave	Cinetina	1 mg.l ⁻¹
6	Heat Wave	Cinetina	10 mg.l ⁻¹
7	Heat Wave	Zeatina	1 mg.l ⁻¹
8	Heat Wave	Zeatina	10 mg.l ⁻¹
9	Celebrity	Bencilaminopurina	1 mg.l ⁻¹
10	Celebrity	Bencilaminopurina	10 mg.l ⁻¹
11	Celebrity	Cinetina	1 mg.l ⁻¹
12	Celebrity	Cinetina	10 mg.l ⁻¹
13	Celebrity	Zeatina	1 mg.l ⁻¹
14	Celebrity	Zeatina	10 mg.l ⁻¹

Preparación del Medio de Cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo fueron preparadas soluciones madre a diferentes concentraciones y agrupadas por afinidad (Cuadro 1A), así también las vitaminas se diluyeron en grupo y para el caso del ácido indolacético y las citocininas fueron preparadas soluciones concentradas en forma individual (10/100 p/v); el nitrato de potasio y el nitrato de amonio se adicionaron en forma directa cada vez que se preparó el medio; así como el mio-inositol, azúcar comercial y el agar-gel.

Utilizando un volumen de 350 ml de agua bidestilada como solvente, se agregaron las siguientes sustancias:

- Sales inorgánicas del medio basal de Murashige-Skoog 1962 (Cuadro 2).
- Glicina (2 mg.l^{-1}).
- Piridoxina.HCl (0.5 mg.l^{-1}).
- Ac. Nicotínico (0.5 mg.l^{-1}).
- Tiamina (0.1 mg.l^{-1}).
- Mio-inositol (100 mg.l^{-1}).

Enseguida se aforó con agua bidestilada hasta un volumen de 560 ml, posteriormente se tomaron 80 ml de medio por separado en siete vasos de precipitado con capacidad de 250 ml.

Antes de agregar los 80 ml a los vasos de precipitado, se agregaron en probetas de 100 ml las citocininas en solución (10/100 p/v) a 1 mg.l^{-1} o 10 mg.l^{-1} según correspondiera para cada tratamiento (T3-T14) y para todos los tratamientos se agregó además 1 mg.l^{-1} de ácido indolacético (solución 10/100 p/v), enseguida se aforaron con las sales disueltas hasta 80 ml; se agregó azúcar comercial a razón de 30 g.l^{-1} y una vez disuelta se ajustó el pH hasta 5.7 con un potenciómetro Corning pH 103[®] adicionando HCl o NaOH tanto al 0.1N como al 1.0N para

disminuir o elevar el pH según el caso; por último a cada tratamiento se le adicionó agar-gel al 0.5% como agente gelificante y para lograr que éste quedara suficientemente disuelto, se utilizó un microondas por un tiempo de 2.5 minutos.

Una vez elaborados, los tratamientos se vertieron en tubos de ensaye marca Pyrex (20 x 150 mm), agregando 20 ml por tubo, los cuales con anterioridad fueron marcados para identificar el tratamiento correspondiente; posteriormente los tubos se esterilizaron en una autoclave eléctrica a una presión de 1 kg/cm² y a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Con este procedimiento se logró la preparación de dos repeticiones para cada tratamiento. Posteriormente se prepararon las repeticiones restantes siguiendo la misma metodología.

La lista de soluciones concentradas, materiales y equipo empleados para la realización de los medios de cultivo se presentan en el Cuadro 1A y 2A, respectivamente.

Cuadro 2. Sales inorgánicas del medio básico Murashige-Skoog (1962) en mg.l⁻¹.

Compuesto	Concentración
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.60
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
Na ₂ · EDTA	37.30
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8

Siembra del Inóculo

Para iniciar el proceso de micropropagación de los híbridos de tomate Heat Wave y Celebrity se seleccionó como fuente de inóculo los epicótilos de plántulas germinadas bajo condiciones de asepsia total.

El criterio que se tomó para la selección del inóculo fue que los cotiledones estuvieran completamente desplegados. Posteriormente se eliminaron el hipocótilo y las hojas cotiledonares desde su base, quedando únicamente el epicótilo con ambas yemas axilares. Lo anterior se realizó en la campana de flujo laminar sobre una caja petri esterilizada y con el auxilio de una pinza de disección tipo "relojero" y bisturí flameados mediante una lámpara de alcohol. Inmediatamente, cada epicótilo se sembró en los tubos de ensaye que contenían los diferentes tratamientos a probar.

Luego de sellar los tubos con tapas de plástico transparente, pasaron al cuarto de incubación y se mantuvieron a una temperatura constante de 25-26°C y un fotoperíodo de 16 horas (con lámparas fluorescentes de 75 watts) por un tiempo de seis semanas al cabo del cual se evaluaron las siguientes variables: número de brotes, longitud total de los brotes, número de hojas y crecimiento total del inóculo.

Enraizamiento In Vitro

Los brotes obtenidos en la etapa de proliferación fueron transferidos a un medio nuevo para inducir la formación de raíces. Cada híbrido fue cultivado sobre la concentración total de las sales de MS y así como a la mitad de la concentración de sales, sin reguladores de crecimiento o adicionados con 1 mg.l⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB). Los tratamientos estudiados en la etapa de enraizamiento in vitro se muestran en el Cuadro 3.

Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado para la etapa de enraizamiento fué también el medio MS, con la variante de que en algunos tratamientos se utilizó la concentración total y en otros

tratamientos fue utilizada solo la mitad de la concentración de las sales, libres de reguladores de crecimiento o con la adición de 1 mg.l^{-1} de AIB. Cabe señalar que solo se adicionó con tiamina como fuente de vitamina a razón de 1 mg.l^{-1} ; además de mio-inositol 100 mg.l^{-1} , 3% de azúcar comercial y 0.5% de agar para todos los tratamientos, también ajustando el pH a 5.7.

En la preparación del medio se utilizaron las mismas soluciones concentradas utilizadas en la etapa de proliferación (Cuadro 1A). Para la adición de AIB en los tratamientos correspondientes, se preparó una solución a una concentración de 10/100 (p/v), igualmente se procedió para la adición de tiamina al medio.

Todos los brotes que presentaron una yema y primordios foliares fueron disectados de cada inóculo y sembrados en 25 ml de medio para enraizamiento contenido en frascos de vidrio de 125 ml de capacidad, sembrándose un brote por cada frasco. Todo esto se realizó en la campana de flujo laminar. Cuando en algunos tratamientos hubo formación de raíces en la etapa de proliferación (T1 y T2), éstas fueron eliminadas al transferir los brotes al medio de enraizamiento al momento de disectar cada brote para que todos los tratamientos estuvieran en condiciones homogéneas.

Después de la siembra, los brotes pasaron al cuarto de incubación bajo condiciones controladas con fotoperíodo de 16 horas y $24-26^{\circ}\text{C}$; se mantuvieron por un período de tres semanas al término de las cuales se observó la formación o la no presencia de raíces.

En esta etapa fué utilizada la prueba de χ^2 para evaluar el porcentaje de enraizamiento.

Etapa de Aclimatación

Al pasar a esta etapa las plántulas completas fueron trasplantadas directamente a un sustrato de perlita previamente esterilizada contenida sobre vasos de plástico transparente con algunos orificios para favorecer el drenaje y la ventilación.

Todavía en la campana de flujo laminar, las plántulas que presentaron al menos una raíz se trasplantaron sobre perlita; con el auxilio de una pinza de disección, se sacaba la plántula del frasco de vidrio cuidadosamente para evitar que las raíces se rompieran, luego con una pizeta que contenía agua bidestilada se asperjaba en la zona de raíces para eliminar todos los residuos del medio en el que se encontraba para evitar contaminaciones posteriores. Después de la siembra en los vasos, se taparon con otro vaso del mismo material en forma invertida. Enseguida se regaron con agua abundante y con una solución de MS a la mitad de su concentración. Los riegos persistieron cada tercer día con la solución de MS, al cabo de una semana se destaparon completamente. Cabe señalar que durante esta etapa las plántulas se mantuvieron en el área general del Laboratorio de Biotecnología por un período de 21 días.

Trasplante al Suelo en Macetas

Se utilizaron macetas de polietileno negro y una mezcla de suelo de la región para el trasplante, aquí permanecieron durante un período de 22 días en el invernadero, aunque una parte del material permaneció aquí hasta la floración y fructificación y otro lote de plántulas fueron trasplantadas al campo.

Trasplante al Campo

Se trasplantaron plántulas de los híbridos Heat Wave y Celebrity al campo experimental de la Facultad de Agronomía, bajo el sistema de riego por goteo el día 11 de marzo de 1994. Aplicándose las prácticas culturales de fertilización adicionada con el agua de riego, control de plagas y enfermedades, cultivos, control de malezas etc., es decir bajo un sistema de siembra comercial.

Variables de Estudio

Proliferación de Brotes

A las seis semanas de iniciado el cultivo, para la etapa de proliferación de brotes se evaluaron las siguientes variables: número de brotes, longitud total de los brotes, número de hojas y crecimiento total del inóculo.

Número de Brotes

Se evaluó el número total de brotes provenientes de las yemas apical y axilares; se consideró como brote aquel que presentaba una yema y por lo menos una hoja bien diferenciada. Para el análisis estadístico se utilizó la transformación σ para cada valor.

Longitud Total de los Brotes

Es la medida en mm tomada desde la base de la región nodal hasta el ápice de cada yema. Posteriormente la longitud de todos los brotes inducidos por inóculo fueron sumados,

constituyendo así la variable de longitud total de los brotes. Para la medición fué utilizada una hoja de papel milimétrico adherida en la superficie externa del fondo de una caja de petri.

Número de Hojas

Se contaron las hojas producidas por cada brote inducido por inóculo; se sumaron todas las hojas completamente desplegadas y también aquéllas que sobrepasaran los 3 mm de longitud aunque no tuvieran todos los folíolos característicos de cada genotipo. Para realizar el análisis de varianza, primeramente los datos fueron sometidos a transformación mediante $\sigma x + 1$.

Crecimiento Total del Inóculo

Es la longitud final en mm alcanzada por cada inóculo desde la cicatriz donde fue disectado hasta el ápice de la yema del eje principal. Para su medición se utilizó papel milimétrico.

Etapas de Enraizamiento

Para la etapa de enraizamiento, se evaluó el porcentaje de éste para ambos híbridos; el conteo se realizó a las tres semanas de la siembra de cada brote.

Porcentaje de Enraizamiento

Independientemente de la procedencia de cada brote, considerando únicamente el híbrido correspondiente, se contabilizó para cada tratamiento el porcentaje de formación de raíces.

Análisis Estadístico

Proliferación de Brotes

En la etapa de proliferación de brotes se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 3 \times 2 + 2$ y diferente número de repeticiones (6-8). Los factores estudiados fueron dos híbridos, tres tipos de citocininas con dos dosis cada una, además los dos híbridos sin citocininas; lo anterior originó un total de 14 tratamientos (Cuadro 1).

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete computacional SPSS (Statistical Package for the Social Science).

Etapa de Enraizamiento

En la etapa de enraizamiento se estudiaron los dos híbridos con dos concentraciones del medio MS libre de auxina o con la adición de 1 mg.l^{-1} de ácido indolbutírico. El diseño de tratamientos fue un arreglo factorial $2 \times 2 \times 2$ con diferente número de repeticiones por tratamiento.

Los tratamientos estudiados se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos estudiados en la etapa de enraizamiento in vitro.

Tratamiento	Híbrido	Conc. de MS	Conc. de AIB
1	Heat Wave	total	
2	Heat Wave	1/2	
3	Heat Wave	total	1 mg.l ⁻¹
4	Heat Wave	1/2	1 mg.l ⁻¹
5	Celebrity	total	
6	Celebrity	1/2	
7	Celebrity	total	1 mg.l ⁻¹
8	Celebrity	1/2	1 mg.l ⁻¹

La variable observada en la etapa de enraizamiento fue el número de plantas que formaron al menos una raíz. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando pruebas de χ^2 .

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se presentan los resultados de los análisis de varianza obtenidos para las variables bajo estudio en la etapa de proliferación de brotes.

Número de Brotes

Los resultados de los análisis de varianza para número de brotes en los 14 tratamientos probados mostraron que no hubo diferencia significativa (Cuadro 3A). El número de brotes promedio por tratamiento fue entre 1.0 y 4.33, con una media general de 2.22 (Cuadro 9A).

Los resultados de la presente investigación coinciden en parte por lo consignado por Reynolds *et al.* (1982) quienes encontraron que la alteración del potencial de regeneración no puede ser significativamente cambiada por la aplicación exógena de la citocinina benciladenina. Para el caso de la presente investigación, en los tratamientos 4, 5, 9 y 10 que son los que corresponden a la aplicación de la bencilaminopurina (benciladenina) no se ve incrementado el número de brotes y además resultan ser estadísticamente iguales al resto de los tratamientos.

Compton y Veilleux (1991) tampoco encontraron diferencia significativa entre la zeatina y benciladenina para el número de brotes por explante de pedicelo de tomate (2.8 y 2.5 brotes respectivamente), pero para el caso de la zeatina encontraron que produjo el mayor número de brotes al compararla con la cinetina y 2iP (1.7 y 1.3 brotes respectivamente). Estos resultados los obtuvieron utilizando medio MS, conteniendo 0.001 μM de AIA y 10 μM para todas las citocininas.

Sin embargo, Kartha *et al.* (1977) lograron una alta frecuencia en la inducción y diferenciación de brotes con la utilización de benciladenina y zeatina, adicionadas en forma

individual o en combinación con ácido indolacético a partir de meristemas del brote apical de la variedad de tomate Starfire; obtuvieron de 15-20 brotes con todas las dosis probadas de benciladenina (BA) o zeatina (Z) en combinación con ácido indolacético.

Por otra parte, Kurtz y Lineberger (1983) utilizando secciones de hoja como inóculo, encontraron diferencias en la respuesta dependiendo del genotipo, puesto que de todos los genotipos probados, el cultivar Starfire resultó con el más alto promedio de brotes producidos, con dosis de 1 mg.l^{-1} de ácido indolacético (AIA) y 1 mg.l^{-1} de benciladenina (BA) con lo cual se obtuvieron 14.5 brotes; mientras que con la misma dosis de auxina pero variando la concentración de BA a 2.5 mg.l^{-1} fueron 19.3 los brotes producidos; y con la dosis más alta de BA (10 mg.l^{-1}), la cantidad de brotes producidos se reduce drásticamente hasta 1.3.

En otra investigación sobre inducción de brotes *in vitro* a partir de explantes foliares de tomate híbrido Blazer, Zárate *et al.* (1988) también encontraron diferencias a la aplicación de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, consignando que la mejor respuesta se obtuvo con los explantes cultivados en $10 \mu\text{M}$ de BAP o cinetina en combinación con $1 \mu\text{M}$ de AIA; con un promedio de 4.2 y 3.03 brotes respectivamente para cada citocinina.

En la presente investigación no se encontró diferencia significativa en la respuesta a la aplicación de varios tipos y concentraciones de citocininas y sin la adición de las mismas entre los genotipos probados sobre la inducción de brotes a partir de brotes apicales y axilares como fuente de inóculo; sin embargo si los resultados se comparan con los obtenidos por Zárate *et al.* (1988), quienes también utilizaron semilla híbrida y diferente tipo de inóculo (cotiledón) en su esquema; aunque no se trate del mismo genotipo, podemos considerar aceptables los resultados del presente experimento, ya que el número de brotes se puede incrementar a través del subcultivo repetido.

Por lo tanto, los trabajos de Kartha *et al.* (1977), Kurtz y Lineberger (1983), Zarate *et al.* (1988) y Compton y Veilleux (1991) muestran evidencias de que la respuesta *in vitro* es altamente influenciada por el genotipo, tipo de explante, concentración y tipo de citocinina (Murashige, 1974).

Sin embargo, para el caso del presente trabajo no se encontraron evidencias de lo consignado por Murashige (1974) y por Reynolds *et al.* (1982) quienes además mencionan que la composición del medio, las condiciones ambientales y el pretratamiento del tejido de las plantas donadoras, aunque en menor proporción, influyen sobre la regeneración de tomate.

Una explicación probable de los resultados obtenidos para la variable número de brotes en el presente trabajo podría ser lo expresado por Reynolds *et al.* (1982) quienes además mencionan que la morfología del crecimiento y el grado de dominancia apical de ciertos genotipos puede estar correlacionado con el potencial de regeneración *in vitro*.

Longitud Total de los Brotes

El análisis de varianza para los 14 tratamientos resultó con diferencias altamente significativas (Cuadro 4A). Considerando la varianza del error experimental en el ANVA se realizó una prueba de comparación de medias por diferencia mínima significativa (DMS) con la finalidad de comparar los tratamientos 1 y 2 (sin citocininas) contra el promedio de los tratamientos 3 al 14 (con citocininas). Los resultados de la comparación de medias mostraron que los tratamientos 1 y 2 (sin la aplicación de citocininas) resultaron diferentes y superiores al compararlos con los tratamientos que conforman el factorial (con citocininas). La comparación de medias de los tratamientos 1 y 2 mostró que no hay diferencia significativa entre éstos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de medias de tratamientos con y sin citocininas para la variable longitud total de brotes.

Tratamiento	No. observaciones	Media (mm)
2*	7	37.81 a
1*	8	20.43 a
3-14**	91	9.04 b

a,b Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

* (1 y 2) sin citocininas

** (3-14) con citocininas

Kut y Evans (1982) obtuvieron longitudes de brotes de tomate semejantes a los obtenidos en ésta investigación en cuanto al tiempo en el cual alcanzaron la longitud final; sin embargo, para el caso de la presente investigación se logró inducir brotes de hasta 3.78 cm sobre un medio sin citocinina, pero adicionado con 1 mg.l^{-1} de AIA, para el híbrido Celebrity (Cuadro 4).

Los autores antes mencionados encontraron diferencias en el tamaño de los brotes regenerados a partir de inóculos de hoja cultivados sobre medio MS adicionado con las vitaminas del medio B₅ y con una concentración de $5 \mu\text{M}$ de 6BA entre el tomate silvestre y cultivado.

Mientras que Uddin *et al.* (1988), manifiestan que utilizando inóculos de cotiledón de cultivares de tomate para proceso, tratándolos con zeatina, produjeron brotes que crecieron de 2-3 centímetros de longitud, después de dos a tres subcultivos cada dos o tres semanas sobre el mismo medio. Si se compara los resultados del presente trabajo en cuanto a la variable longitud de los brotes con los obtenidos por Uddin *et al.* (1988), se observa que el tratamiento con zeatina que ellos utilizaron, implicó mas mano de obra para realizar los subcultivos cada dos o

tres semanas y mayor consumo de medio de cultivo; sin embargo, en el presente trabajo se alcanzaron longitudes de brotes de 3.78 cm en un medio sin citocininas y sin subcultivar hasta las seis semanas en que se tomaron los datos (Cuadro 4).

Los 12 tratamientos que formaron el factorial se estudiaron con un análisis de varianza independiente. Según el análisis de varianza los tratamientos fueron diferentes para longitud total de los brotes. Los factores híbridos y tipos de citocininas fueron no significativos, sin embargo, las dosis de citocininas fueron diferentes ($p=0.003$) (Cuadro 5A). Al realizar la comparación de medias por el método DMS (Diferencia mínima significativa) se encontró que la longitud de los brotes disminuyó cuando las dosis de citocininas se incrementaron (Cuadro 5).

Al respecto, Kyte (1983) menciona que cuando se presentan los brotes muy cortos, tallos gruesos y además hojas pequeñas y pálidas, una de las causas posibles de ésta sintomatología es que probablemente crecieron sobre un medio con concentraciones muy elevadas de citocininas. A su vez, menciona que una práctica común que se realiza para inducir el alargamiento de los brotes es transfiriéndolos a un medio sin reguladores de crecimiento; con la concentración total de sales o a la mitad de su concentración.

Los resultados obtenidos para la variable longitud de los brotes y las observaciones hechas hasta la etapa de enraizamiento mostraron que generalmente los brotes pequeños también fueron capaces de enraizar fácilmente con el tratamiento adecuado, siempre y cuando presentaran al menos dos hojas bien diferenciadas.

Cuadro 5. Longitud total de los brotes a dos niveles de citocinina a las seis semanas del inicio del cultivo.

Concentración (mg.l ⁻¹)	No. observaciones	Media (mm)
1	45	13.48 a
10	46	4.70 b

a,b Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

El análisis de varianza reveló un efecto significativo ($p=0.036$) de la interacción simple de citocininas por dosis para la longitud total de los brotes (Cuadro 5A).

Para interpretar la interacción se compararon las citocininas en cada una de las dosis; además se compararon las dosis en cada citocinina. En la comparación de medias para tipos de citocininas en cada dosis, se encontró que hubo diferencia significativa entre los tipos de citocininas a la dosis de 1 mg.l⁻¹, resultando una mayor longitud de brotes con la aplicación de cinetina, a diferencia de la BAP y zeatina, las cuales resultaron iguales promoviendo una menor longitud total de brotes. En la dosis de 10 mg.l⁻¹ no se encontró diferencia entre los tres tipos de citocininas (Cuadro 6). Aquí se manifiesta nuevamente la tendencia de que a mayor concentración de citocininas, se presentaron brotes de menor tamaño (Kyte, 1983).

Cuadro 6. Comparación de medias de citocininas dentro de cada dosis aplicada para longitud total de brotes.

Citocinina	Dosis	
	1 mg.l ⁻¹	10 mg.l ⁻¹
BAP	12.14 b	4.57 a
Cinetina	21.97 a	4.10 a
Zeatina	5.67 b	5.38 a

a,b Las letras iguales de las columnas indican que las citocininas no difieren significativamente.

Al hacer el análisis de la comparación de medias para las dosis en cada tipo de citocinina, se encontró una diferencia significativa entre la dosis de 1 mg.l^{-1} y de 10 mg.l^{-1} para el caso de la cinetina, encontrándose una mayor longitud de los brotes con la aplicación de la dosis baja (1 mg.l^{-1}); además se encontró que no hay diferencia significativa entre las dosis probadas para la bencilaminopurina y la zeatina (Cuadro 7).

Estos resultados favorecen en el aspecto económico; al obtener brotes de mayor longitud al estar ausentes las citocininas en el medio o con la aplicación de la dosis baja de una de las citocininas (cinetina) disponible en el mercado y a un precio más aceptable que otras (zeatina).

Cuadro 7. Comparación de medias de las dosis aplicadas de los tres tipos de citocininas para longitud total de brotes.

Citocinina	Dosis	
	1 mg.l^{-1}	10 mg.l^{-1}
BAP	12.14 a	4.57 a
Cinetina	21.97 a	4.10 b
Zeatina	5.67 a	5.38 a

a,b Las letras iguales de las hileras indican que las dosis no difieren significativamente.

Número de Hojas

Para la variable número de hojas se obtuvo una media general de 2.86 (Cuadro 9A). El análisis de varianza no mostró una diferencia estadística significativa entre los tratamientos para la variable número de hojas (Cuadro 6A).

Crecimiento Total del Inóculo

El análisis de varianza para los 14 tratamientos mostró una diferencia significativa para la variable crecimiento total del inóculo (Cuadro 7A). Así mismo considerando la varianza del error experimental en el ANVA, se realizó la prueba de comparación de medias por DMS; comparándose los tratamientos 1 y 2 (sin citocininas) contra el promedio de los tratamientos 3 al 14 (con citocininas). La comparación de medias mostró una diferencia significativa entre el promedio de tratamientos que conforman el factorial (T3 al T14) y los tratamientos a los cuales no se les aplicó citocininas (T1 y T2); estos resultados muestran que el crecimiento total del inóculo se ve incrementado con la ausencia de citocininas en el medio, mientras que con la presencia de citocininas en el medio de cultivo, el crecimiento disminuye drásticamente (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de medias de tratamientos con y sin citocininas para crecimiento total del inóculo.

Tratamiento	No. observaciones	Media (mm)
2*	7	27.88 a
1*	8	20.29 a
3-14**	91	8.34 b

a,b Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

* (T1 y T2) = sin citocininas

** (T3-14) = con citocininas

Se realizó un análisis de varianza independiente para estudiar los 12 tratamientos que formaron el factorial para la variable crecimiento total del inóculo. El crecimiento total del inóculo mostró una diferencia estadística significativa entre los tipos de citocininas ($p=0.037$) y dosis de citocininas aplicadas ($p=0.001$)(Cuadro 8A). La comparación de medias mostró que la

cinetina produjo un mayor crecimiento, mientras que la zeatina y BAP mostraron una respuesta similar promoviendo un crecimiento menor (Cuadro 9).

Cuadro 9. Medias de crecimiento total del inóculo inducido por tres tipos de citocinina a las seis semanas del inicio del cultivo.

Hormona	No. observaciones	Media (mm)
Cinetina	31	13.16 a
BAP	29	7.45 b
Zeatina	31	4.35 b

a,b Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Estos resultados concuerdan en parte con las observaciones hechas por Montango citado por Uddin *et al.* (1988), en cuanto a la respuesta tan baja que presento la zeatina, los autores mencionan que generalmente cuando el regulador de crecimiento usado para la regeneración del brote es la zeatina, el explante tiene que ser subcultivado dos a tres veces a intervalos de tres semanas antes de que se hayan iniciado los brotes en el explante. Sin embargo, con ésta práctica probablemente se podrá obtener un mayor crecimiento; pero también probablemente se requerirá de un período mayor que podrá ser compensado si a la par el número de brotes se incrementa.

Para los niveles de citocininas, la tendencia observada en el crecimiento total del inóculo es la disminución de éste a medida que las dosis de citocininas aumentan (Cuadro 10). Según las observaciones realizadas durante el desarrollo del experimento en la fase de proliferación, en general, con la aplicación de las dosis bajas de citocinina ó sin la presencia de la misma, se presentó el fenómeno de dominancia apical; al respecto Bidwell (1983) menciona que de acuerdo a la teoría alimenticia-direccional la dominancia apical se mantiene porque la

corriente de alimentos que asciende por el tallo se dirige a la yema apical y no a las ramas laterales, debido al gradiente auxínico que resulta de la producción de auxina en el ápice; y más aún porque se aplicó 1 mg.l^{-1} de ácido indolacético a todos los tratamientos, corroborando lo anterior ya que el crecimiento del inóculo fué la longitud del brote principal y a partir de la base del nudo cotiledonar.

Cuadro 10. Medias de crecimiento total del inóculo inducido por dos niveles de citocinina a las seis semanas del inicio del cultivo.

Concentración (mg.l^{-1})	No. observaciones	Media (mm)
1	45	13.14 a
10	46	3.64 b

a,b Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Los resultados obtenidos para la etapa de enraizamiento *in vitro* evaluada a través del porcentaje de enraizamiento se presentan a continuación.

Porcentaje de Enraizamiento

Para estudiar la capacidad de enraizamiento de los brotes producidos en la primera etapa del estudio, se probaron dos niveles del medio MS, la adición de AIB y la capacidad de formación del sistema radicular de cada híbrido; evaluándose el porcentaje de enraizamiento en cada medio de cultivo.

El efecto del medio sobre el porcentaje de enraizamiento se estudió por medio de la prueba de χ^2 . Los resultados mostraron una diferencia estadística significativa entre los medios probados ($\chi^2=9.47$). Así para el medio MS a la mitad de la concentración de sales se obtuvo un

34.3 % de brotes enraizados, mientras que cuando se utilizó el medio MS a la concentración total propuesta por Murashige y Skoog (1962), el porcentaje de brotes enraizados fue de 78.9 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Prueba de χ^2 para el % de enraizamiento obtenido con la mitad de la concentración y la concentración total de MS.

	Conc. total	1/2 Conc.	Total
Brotos enraizados	15	11	26
Brotos no enraizados	4	21	25
Total	19	32	51
%	78.9	34.3	
	$\chi^2 = 9.47$		

La prueba de χ^2 mostró independencia entre los factores estudiados (variedad y enraizamiento) ($\chi^2=0.16$) (Cuadro 12); lo que indica que no hay diferencia en el porcentaje de enraizamiento entre los híbridos Heat Wave y Celebrity. Los porcentajes de enraizamiento para los híbridos Heat Wave y Celebrity fueron de 47.8% y 53.5%, respectivamente.

Cuadro 12. Prueba de χ^2 para el % de enraizamiento en ambos híbridos.

	Heat Wave	Celebrity	Total
Brotes enraizados	11	15	26
Brotes no enraizados	12	13	25
Total	23	28	51
%	47.8	53.5	
	$\chi^2 = 0.16$		

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de enraizamiento cuando se comparó el medio de cultivo libre de auxina y el medio con 1.0 mg.l^{-1} de AIB utilizando el mismo estadístico de prueba ($\chi^2=0.98$) (Cuadro 13). Independientemente de la concentración del medio de cultivo (1/2 ó total) los valores encontrados para el medio MS libre de auxina fué de un 58.3%, mientras que cuando se adicionó con 1.0 mg.l^{-1} de AIB se obtuvo un 44.4%.

Cuadro 13. Prueba de χ^2 para el % de enraizamiento con y sin AIB.

	1 mg.l^{-1}	Sin AIB	Total
Brotes enraizados	12	14	26
Brotes sin enraizar	15	10	25
Total	27	24	51
%	44.4	58.3	
	$\chi^2 = 0.98$		

Al analizar los resultados de la comparación de los medios de cultivo (MS y MS 1/2) el porcentaje de enraizamiento resultó mas favorable (79.9%) con la concentración propuesta por

Murashige-Skoog (1962) en comparación con el medio MS reducido a la mitad de la concentración (34.3%)(Cuadro 11). Además, los resultados también nos muestran que no hay diferencia significativa entre la aplicación de 1 mg.l^{-1} de AIB y sin la aplicación de esta auxina, independientemente de la concentración del medio; sin embargo, el porcentaje de enraizamiento resultó con un valor más alto (58.3%) cuando el medio de cultivo se encuentra libre de reguladores de crecimiento (Cuadro 13). Por lo anterior expuesto, el tratamiento del subcultivo de los brotes al medio MS libre de reguladores de crecimiento resultó superior a los demás. En cuanto a la capacidad de enraizamiento de cada híbrido, según los resultados obtenidos se encontró que no existen diferencias entre los mismos (Cuadro 12).

Kartapradja (1989) presentó resultados similares en cuanto a la inducción del enraizamiento de los brotes obtenidos a partir de secciones de hoja de tomate de los cultivares Delmar y Rutgers, mencionando que cuando se transfirieron los brotes a un medio MS libre de reguladores de crecimiento se produjo el enraizamiento; aunque no menciona la frecuencia o porcentaje del mismo.

En otra investigación sobre el cultivo *in vitro* del embrión del híbrido F1 (*L. esculentum* Mill.) x (*L. minutum*), Uralets (1984) logró inducir el enraizamiento con una alta frecuencia (96%) de las plantas regeneradas del callo producido; esta alta frecuencia de enraizamiento fue el resultado después de cultivar por 2-7 días los brotes regenerados sobre medio Linsmaier y Skoog sin reguladores de crecimiento.

Los resultados obtenidos por Uralets (1984) concuerdan con los resultados de la presente investigación en cuanto al tiempo necesario para la inducción del enraizamiento; en la cual a pesar de que se tomaron los datos para esta variable a las tres semanas después del cultivo de los brotes sobre el medio para enraizamiento, la presencia de raíces se definió a partir

del tercer día hasta el séptimo día, después de esta fecha y hasta la tercera semana los brotes presentaron un crecimiento vigoroso.

Por otra parte, Kurtz y Lineberger (1983) encontraron que todos los explantes de hoja de doce cultivares enraizaron sobre un medio adicionado solamente con 0.2-2.0 mg.l⁻¹ de ácido indolacético y el enraizamiento de todos los cultivares se redujo con la adición de 0.2 mg.l⁻¹ de BA y además se inhibió completamente con altas concentraciones de BA.

Mientras que Yurkova y Galetskaya (1990) consignan que algunos de los brotes obtenidos de la regeneración de accesiones de tomate cultivado a partir de secciones de hoja formaron raíces sobre el mismo medio de inducción, sin embargo, otros necesitaron ser transferidos a un medio sin reguladores de crecimiento para que esto ocurriera.

Otro sistema para inducir el enraizamiento que contribuye a hacer más económico en el futuro el sistema de cultivo de tejidos para tomate es el propuesto por Uddin *et al.* (1988) en el cual todos los brotes fueron transferidos al invernadero bajo lluvia intermitente durante dos semanas.

V. CONCLUSIONES

1. No se encontraron diferencias importantes en la proliferación de brotes entre los híbridos Heat Wave y Celebrity, sin embargo se observó una mayor longitud de los brotes y un crecimiento total del inóculo en el híbrido Celebrity.
2. En general, se encontró una mayor longitud de los brotes y crecimiento total del inóculo en los tratamientos sin citocininas.
3. Se encontró una mayor longitud de brotes y crecimiento total del inóculo cuando se aplicó Cinetina comparado con la BAP y Zeatina, en la dosis baja.
4. No se encontró diferencia entre los híbridos en cuanto a la capacidad de enraizamiento in vitro.
5. El medio completo de MS mostró una mayor capacidad para promover el enraizamiento de tomate, comparado con el medio MS a la mitad de su concentración.
6. No se encontró efecto de la aplicación de auxina al medio MS sobre el enraizamiento de híbridos de tomate.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Anónimo. 1993. Commonly Used Tissue Culture Terms. Sigma Plant Cell Culture Catalogue. P-82.
- Bidwell, R.G. 1979. Fisiología Vegetal. 1a Ed. en Español. AGT. México, D.F. Pp. 496-497, 624.
- Cárdenas, M.L., T.E. Torres, R. Mercado, J.A. Villarreal y E. Cárdenas. 1994. Bulbet formation from three varieties of (Allium sativum L.) *in vitro*. *In Vitro*. 30A(3):70 Abstr. P-1052.
- Chauhan, V.A., P.C. Josekutty and G. Prathapasenan. 1994. Rapid micropropagation of (Dalbergia sissoo Roxb.) *In Vitro*. 30A(3): 81 Abstr. P-1096.
- Chu, I. and S.L. Kurtz. 1990. Commercialization of plant Micropropagation. In: P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and P.S. Bajaj (Ed). (V) Handbook of plant cell culture. Ornamental species. McGraw-Hill. Pp. 126-164.
- Compton, M.E. and R.E. Veilleux. 1991. Shoot, root and flower morphogenesis on tomato inflorescence explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 24:223-231.
- Davis, M.E., R.D. Lineberger and A.R. Miller. 1991. Effects of tomato cultivar, leaf age, and bacterial strain on transformation by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 24:115-121.
- Debergh, P.C., G. De Coster and W. Steurbaut. 1993. Carbendazim as an alternative plant growth regulator in tissue culture systems. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29P:89-91.
- Deshpande, S.R., P.C. Josekutty and G. Prathapasenan. 1994. Rapid micropropagation of (Ficus religiosa L.). *In Vitro*. 30A(3):81 Abstr. P-1098.
- Evans, D.A., W.R. Sharp and C.E. Flick. 1981a. Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis. In: T.A. Thorpe (Ed). *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture*. Academic. U.S.A. Pp. 89-91.

- Evans, D.A., W.R. Sharp and C.E. Flick. 1981b. Plant Regeneration from Cell Cultures. In: Jules Janick (Ed). Horticultural Reviews. Avi. USA. Vol. 3. Pp. 214-314.
- Evans, N.E. 1990. Micropropagation. Axillary Bud Multiplication. In: J.W. Pollard y J.M. Walker. Methods in Molecular Biology. Vol. 6. Plant Cell and Tissue Culture. Humana. Clifton, New Jersey. pp. 93-103.
- Frankenberger, E.A. and E.C. Tigchelaar. 1980. Genetic analysis of shoot formation from excised leaf discs of tomato. *In Vitro* 16(3). 53 Abstr. P-217.
- Franklin, C.I., T.N. Trieu, R.A. Gonzales and R.A. Dixon. 1991. Plant regeneration from seedling explants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 24:199-206.
- Gulati, A. and P.K. Jaiwal. 1992. In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 29:199-205.
- Hartmann, H. T. y D.E. Kester. 1987. Propagación de Plantas. *Principios y Prácticas*. C.E.C.S.A. Primera Ed. México, D.F. Pp. 549, 551, 572, 599, 605-607.
- Hurtado, D.V. y M.A. Merino. 1991. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. 2a. reimpression. Pp. 48, 58-59.
- Kartapradja, R. 1989. *In vitro* morphogenetic response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill., cvs. Delmar and Rutgers) leaf and stem discs to various combinations and concentrations of auxina and cytokinin. *Buletin-Penelitian-Hortikultura*. 17: 3. 7-12.
- Kartha, K.K., S. Champoux, O.L. Gamborg and K. Pahl. 1977. *In vitro* propagation of tomato by shoot apical meristem culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102(3):346-349.
- Krikorian, A.D. 1991a. Medios de cultivo : generalidades, composición y preparación. En: W.M. Roca y L.A. Mroginski (Ed). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT. Colombia. Pp. 41-77.

- Krikorian, A.D. 1991b. *Propagación clonal in vitro*. En: W.M. Roca y L.A. Mroginski (Ed). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT. Colombia. Pp. 95-125.
- Kurtz, S. M. and R.D. Lineberger. 1983. Genotypic Differences in morphogenic capacity of cultured leaf explants of tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108(5):710-714.
- Kut, S.A. and D.A. Evans. 1982. Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species. *In Vitro* 18(7):593-598.
- Kyte, L. 1983. Plants from test tubes. An introduction to micropropagation. Timber Press. U.S.A. Pp. 46-47, 73-74.
- Latif, M.,N. Mumtaz, M. Davey and J.A. Power. 1993. Plant regeneration from protoplasts isolated from cell suspension cultures of the wild tomato, (*Lycopersicon chilense* Dun.). *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 32:311-317.
- Lambardi, M., K.K. Sharma and T.A. Thorpe. 1993. Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29P:189-199.
- López, M.C., G. Carrillo y V.M. Salceda. 1978. Estudio sobre el desarrollo de citocultivos de (*Phaseolus vulgaris* L.) y (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en medios suplementados con aguamiel y agua de coco. *Agrociencia*. Num. 31. Pp. 75-81.
- Lu, CH. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29P:92-96.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-66.
- Navarro, L., C.N. Roistacher and T. Murashige. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100(5):471-479.

- Paterson, K.E. 1982. Organogenesis from cultured leaf segments of (Crassula argentea): A role of cytokinin on developmental pattern changes and a role of auxin on polarity. *In Vitro* 18(3) Part II. 181 Abstr. P-318.
- Pierik, R.L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. Pp. 71-73, 76-78, 181-182.
- Reynolds, J.F., N.E. Bieber y E.L. Sun. 1982. Environmental, genotype and pretreatment influences on regeneration of tomato *in vitro*. *In Vitro*. 18(3) Part II. 180 Abstr. P-318.
- Rodríguez, G. 1982. Producción de varetas de cítricos *in vitro* técnica auxiliar del microinjerto. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 53p.
- Sagawa, Y. and J.T. Kunisaki. 1990. Micropropagation of floricultural crops. In: P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp y P.S. Bajaj (Ed). Handbook of plant cell culture. Ornamental species. McGraw-Hill. Pp. 25-56.
- Sandhu, J.S., S.S. Gosal, M.S. Gill and H.S. Dhaliwal. 1994. Micropropagation of Indica rice through proliferation of axillary shoots. *In Vitro*. 30A(3):72 Abstr. P-1062.
- Stommel, J.R. and S.L. Sinden. 1991. Genotypic differences in shoot forming capacity of cultured leaf explants of (Lycopersicon hirsutum). Hort Science 26(10):1317-1320.
- Tisserat, B. 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: R.A. Dixon. Plant Cell Culture: a practical approach. IRL Press. England. Pp. 79-104.
- Torres, K. 1988. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Van Nostrand Reinhold. New York. Pp. 31-34, 53-60, 66-68.
- Torres, A.C. and T. Murashige. 1987. Morphogenesis in cultures of cotyledon and hypocotyl and root segments of (L. esculentum Mill. "Ace"), (L. esculentum Mill. "Rutgers") and (L. peruvianum L.). *In Vitro* 23(3) Part II. 228 abstr. P-68A.
- Uddin, M. Rafique, S. Z. Berry and A.D. Bisges. 1988. An improved shoot regeneration system for somaclone production in tomatoes. Hort Science 23(6):1062-1064.

- Uralets, L.I. 1984. *In vitro* embryo culture in tomato. *Fiziologiya i-Biokhimiya-Kul'turnykh-Rastenii*. 16: 5, 495-499.
- Van der Valk, P., O.E. Scholten, F. Verstappen, R.C. Jansen and J.J. Dons. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three (Allium) species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30:181-191.
- Villalobos, V.M. y T.A. Thorpe. 1991. *Micropropagación: conceptos, metodología y resultados*. En: W. M. Roca y L.A. Mroginski (Ed). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT. Colombia. Pp.127-141.
- Yasseen, Y.M., W.E. Splittstoesser and R.E. Litz. 1994. *In vitro* shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. *Plant Cell, Tiss. and Organ Culture*. 36: 243-247.
- Yurkova, G.N. and G.R. Galetskaya. 1990. Regenerative ability of collection accesions of cultivated tomato. *Problemy teoreticheskoi i prikladnoi genetiki y Kazakhstane: Materialy Respublikanskoi konferentsii, Alma-Ata, 18-22 noyabrya*. 122-123. Alma-Ata, Kazakhstan.
- Zárate, D., M. Arce, P. Solano, M. Gutiérrez, L. Domínguez y M. Chávez. 1988. Inducción de brotes *in vitro* a partir de explantes foliares del tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) híbrido Blazer. *Fitotecnia Mex*. 11:199-204.

VII. APENDICE

Cuadro 1. Soluciones concentradas utilizadas para la preparación del medio de cultivo MS.

Solución A (1000x):	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22.0 g en 50 ml
Solución B:	KNO_3	se agregan 1.9 g.l^{-1} directamente en el medio
	NH_4NO_3	se agregan 1.65 g.l^{-1} directamente en el medio
Solución C (1000x):	KI	41.5 mg en 50 ml
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.25 mg en 50 ml
Solución D (400x):	KH_2PO_4	3.4 g en 50 ml
	H_3BO_3	0.124 g en 50 ml
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.0 mg en 50 ml
Solución E (400x):	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.0 g en 50 ml
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.44 g en 50 ml
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.172 g en 50 ml
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5 mg en 50 ml
Solución F (200x):	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.557 g en 100 ml
	Na_2EDTA	0.745 g en 100 ml
Solución G (100x):	Glicina	50 mg en 250 ml
	Piridoxina.HCl	12.5 mg en 250 ml
	Ac. nicotínico	12.5 mg en 250 ml
	Tiamina	2.5 mg en 250 ml

Cuadro 2. Materiales, Equipo y reactivos utilizados para la preparación del medio de cultivo MS.

1. Vasos de precipitado (1.0, 100, 250 y 1000 ml)
2. Probetas (100 y 1000 ml)
3. Pipetas (0.5, 1, 2, 5 y 10 ml)
4. Pizetas
5. Plancha magnética y agitadores
6. Balanza analítica Sartorius 125V [®]
7. Potenciómetro Corning pH 103 [®]
8. Horno de microondas Panasonic [®]
9. Autoclave eléctrica All american modelo No. 25x [®]
10. Solución de 0.1 y 1.0N de HCl y NaOH
11. Solución buffer (pH 7)
12. Agua bidestilada
13. Papel aluminio
14. Soluciones concentradas de sales inorgánicas y aditamentos del medio de cultivo
15. Cajas de petri

Cuadro 3. Análisis de varianza para el número de brotes transformado (14 tratamientos).

FV	GL	SC	CM	F	SIG. DE F
Tratamientos	13	1.265	0.097	0.613	0.838
Factorial	11	1.075	0.098	0.620	0.808
Testigos	2	0.190	0.095	0.601	0.555
Error	92	14.517	0.158		
Total	105	15.782	0.150		

Cuadro 4. Análisis de varianza para la longitud total de brotes (14 tratamientos).

FV	GL	SC	CM	F	SIG. DE F
Tratamientos	13	12883.403	991.031	1.964	0.032
Factorial	11	6257.852	568.896	1.127	0.349
Testigos	2	6625.551	3312.775	6.568	0.002
Error	92	46401.946	504.369		
Total	105	59285.349	564.622		

Cuadro 5. Análisis de varianza para la longitud total de los brotes (12 tratamientos).

FV	GL	SC	CM	F	SIG. DE F
Híbridos	1	593.196	593.196	3.480	0.066
Citocininas	2	928.951	464.475	2.725	0.072
Dosis	1	1659.864	1659.864	9.738	0.003
H x C	2	668.622	334.311	1.961	0.147
H x D	1	461.753	461.753	2.709	0.104
C x D	2	1179.605	589.803	3.460	0.036
H x C x D	2	640.481	320.241	1.879	0.160
Error	79	13466.263	170.459		
Total	90	19724.115	219.159		

Cuadro 6. Análisis de varianza para el número de hojas transformado (14 tratamientos).

FV	GL	SC	CM	F	SIG. DE F
Tratamientos	13	5.035	0.387	0.789	0.670
Factorial	11	4.681	0.426	0.869	0.573
Testigos	2	0.354	0.177	0.361	0.703
Error	92	45.040	0.490		
Total	105	50.075	0.477		

Cuadro 7. Análisis de varianza para el crecimiento total del inóculo (14 tratamientos).

FV	GL	SC	CM	F	SIG. DE F
Tratamientos	13	9959.998	766.154	2.098	0.021
Factorial	11	6451.384	586.489	1.606	0.109
Testigos	2	3508.614	1754.307	4.805	0.010
Error	92	33583.860	365.042		
Total	105	43543.858	414.703		

Cuadro 8. Análisis de varianza para el crecimiento total del inóculo (12 tratamientos).

FV	GL	SC	CM	F	SIG. DE F
Híbridos	1	602.634	602.634	3.519	0.064
Citocininas	2	1180.308	590.154	3.446	0.037
Dosis	1	1941.861	1941.865	11.340	0.001
H x C	2	614.394	307.197	1.794	0.173
H x D	1	406.138	406.138	2.372	0.128
C x D	2	1095.357	547.679	3.198	0.046
H x C x D	2	480.678	240.339	1.404	0.252
Error	79	13527.557	171.235		
Total	90	19978.940	221.988		

Cuadro 9. Medias de tratamientos para número de brotes, longitud total de brotes, número de hojas y crecimiento total del inóculo.

TMTO.	H	C	D	NB	LB	NH	CI
	Media	General		2.2222	5.5333	2.8667	4.1778
1	H. Wave			3.0000	5.5000	3.0000	4.0000
2	Celebrity			1.6667	4.3333	0.6667	2.0000
3	H. Wave	BAP	1	2.3333	5.0000	4.0000	5.3333
4	H. Wave	BAP	10	4.3333	7.3333	0.6667	1.6667
5	H. Wave	Cinetina	1	2.0000	3.8750	2.5000	4.0000
6	H. Wave	Cinetina	10	1.5000	3.2500	1.5000	3.2500
7	H. Wave	Zeatina	1	2.2500	5.7500	4.2500	3.2500
8	H. Wave	Zeatina	10	1.0000	1.5000	0.5000	4.0000
9	Celebrity	BAP	1	2.0000	4.6667	2.3333	3.0000
10	Celebrity	BAP	10	2.0000	9.0000	5.5000	5.5000
11	Celebrity	Cinetina	1	3.3333	17.8333	7.3333	13.6667
12	Celebrity	Cinetina	10	2.0000	4.5000	2.0000	4.2500
13	Celebrity	Zeatina	1	2.0000	4.0000	4.2000	4.1000
14	Celebrity	Zeatina	10	2.0000	3.3333	1.3333	1.5000

H = Híbrido

C = Citocinina

D = Dosis

NB = Número de brotes

LB = Longitud total de brotes (mm)

NH = Número de hojas

CI = Crecimiento total del inóculo (mm)



