



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Complejo Regional Centro, Sede
Tecamachalco

Ciencias Agropecuarias
Ingeniería Agroindustrial

Organogénesis *in-vitro* y formulación de semillas
artificiales de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

TESIS

Como requisito para obtener el grado de:

LICENCIADO EN INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

Presenta

Grisel Ruiz Andrade

DIRECTOR DE TESIS
Dr. J. Jesús Hinojosa Moya

El Salado, Tecamachalco, Puebla; marzo de 2020

AGRADECIMIENTOS

A LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD Autónoma de Puebla, por DARMER LA OPORTUNIDAD de cumplir ESTA meta.

Al Dr. Jesús Hinojosa MOYA, por DARMER LA OPORTUNIDAD de REALIZAR este TRABAJO TAN laborioso y poner siempre a prueba mis CAPACIDADES; por su ENSEÑANZA y exigencia PARA mi formación como profesional. Por esos regaños que valieron LA PENA, por su gran conocimiento y respeto como profesional. Y TODAS ESAS OPORTUNIDADES que me ofreció PARA aprender sobre mi carrera y como persona. GRACIAS, que Dios lo bendiga siempre.

A LA MTRA. Adriana Sánchez Espíndola por siempre creer en mí, por apoyarme y exigirme un TRABAJO de CALIDAD. Por su gran AMISTAD que siempre valdrá mucho PARA mí.

A todos mis compañeros y compañERAS que me apoyaron.

A todos mis amigos y AMIGAS que siempre creyeron en mí, me animaron y estuvieron conmigo DURANTE este TRABAJO.

DEDICATORIAS

A mi MADRE, YADHIRA ANDRADE Contreras por brindarme todo su apoyo en CADA PASO que he DADO en LA VIDA, por ESTAR siempre a mi lado, por creer en mi como NADIE NUNCA, por ANIMARME CUANDO SENTÍA que no podía y por su amor incondicional...

A mi padre, ALEJANDRO Ruiz MORALES, por su cariño y por los valores que me ha enseñado por esa exigencia como profesionista, por su apoyo PARA lograr esta meta más...

A mis HERMANAS Venus ALEJANDRA Ruiz ANDRADE y Nicole Ruiz ANDRADE, por su cariño y su amor que me han DADO, por ese ánimo que me dio DURANTE CADA momento...

A todos mis AMIGOS y AMISTADES...

A LA VIDA...

Índice

Introducción	11
1. Planteamiento del problema.....	14
2. Justificación	19
3. Objetivo general	21
4. Hipótesis	23
5. Capítulo I. Marco teórico	25
5.1 Patógenos principales que afectan al cultivo de jitomate	25
5.2 Las Buenas Prácticas Agrícolas.....	27
5.3 La agrobiotecnología.....	28
5.4 Cultivo <i>in-vitro</i>	29
5.5 Aplicaciones del cultivo <i>in-vitro</i>	30
5.6 Organogénesis.....	31
5.7 Fitohormonas.....	33
5.8 Semilla artificial.....	35
5.9 Métodos de encapsulación y agentes gelificantes	36
6. Metodología.....	39
6.1 Micropropagación <i>in-vitro</i> y desinfección de semillas de jitomate.....	39
6.2 Diseño matricial primario	40
6.3 Diseño de la matriz experimental	41
6.4 Siembra de explantes	43
6.5 Diseño experimental para brotación	44
6.6 Formulación y elaboración de semilla artificial	45
6.7 Análisis estadísticos	46

6.8	Captura y análisis de imágenes	46
7.	Resultados	48
7.1	Diseño matricial primario.....	48
7.2	Diseño experimental	49
8.2.1	Resultados estadísticos del ANOVA y método de Duncan para inducción de callo en tallo.....	49
8.2.2	Resultados estadísticos del ANOVA y método de Duncan para inducción de callo en hojas.	50
8.2.3	Resultados estadísticos del ANOVA y método de Duncan para inducción de callo en raíz.....	52
8.	Diseño experimental para brotación	56
9.	Formulación y elaboración de semilla artificial	57
10.	Conclusiones	60
11.	Bibliografía, ¡Error! Marcador no definido.	
12.	Anexos	66
12.1	Tabla A1 de la matriz primaria.....	66
12.1.2	Continuación de la tabla A1 de la matriz primaria.....	67
12.1.3	Continuación de la tabla A1 de la matriz primaria.....	68
12.2	Diagrama de Micropropagación <i>in-vitro</i> de semillas de jitomate saladet.	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos anuales de producción de jitomate en México.....	12
Tabla 2. Promedio del nivel de infestación por cáncer bacteriano en los principales productores del estado de México.....	16
Tabla 3. Diagnóstico de los problemas que afectan la productividad del jitomate	17
Tabla 4. Patógenos que afectan al cultivo de jitomate	26
Tabla 5. Fitohormona y su función en los procesos fisiológicos de la planta.	34
Tabla 6. Diseño matricial para la combinación de Cinetina y ANA. La secuencia numérica en el cuerpo de la tabla indica la asignación experimental para el cultivo.	40
Tabla 7. Diseño matricial para la combinación Cinetina y 2,4-D. La secuencia numérica en el cuerpo de la tabla indica la asignación experimental para el cultivo.	40
Tabla 8. Diseño matricial para la combinación de siete tratamientos con ANA y Cinetina.	41
Tabla 9. Fitohormona y componentes en la preparación de medio MS 1X para la inducción de callos.....	42
Tabla 10. Matriz experimental para brotación. Cantidad de fitohormona para 60 mL de medio MS.	44
Tabla 11. Formulación de las semillas artificiales.	45
Tabla 12. Análisis de varianza de un factor obtenido de los diferentes tratamientos para inducción de callo en tallo.....	49
Tabla 13. Prueba de comparación de múltiples medias de siete diferentes tratamientos para la inducción de callo en tallos.....	50
Tabla 14. Análisis de varianza de un factor obtenido de los diferentes tratamientos para inducción de callo en hojas.	51
Tabla 15. Prueba de comparación de múltiples medias de siete diferentes tratamientos para la inducción de callo en hojas.	51

Tabla 16. Análisis de varianza de un factor obtenido de los diferentes tratamientos para inducción de callo en raíz.....	52
Tabla 17. Prueba de comparación de múltiples medias de siete diferentes tratamientos para la inducción de callo en raíz.	53
Tabla 18. Parte 1.- Callos friables obtenidos con los diferentes tratamientos y explantes a un enfoque de 10X.	54
Tabla 18. Parte 2.- Callos friables obtenidos con los diferentes tratamientos y explantes a un enfoque de 10X.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) cáncer bacteriano en tomate verde, mostrando la aureola blanca amarillenta, típica del síntoma “ojo de pájaro”. B) el tomate rojo muestra algunas manchas marrones más oscuras (sin aureola) son causadas por otro patógeno bacteriano, Pseudomonas syrin.....	25
Figura 2. Algunas aplicaciones del cultivo de tejidos en plantas. A la izquierda, micropropagación de violeta africana a partir de trozos de hojas desinfectados e introducidos en condiciones de esterilidad. A la derecha, semillas naturales formuladas con embriones, Thorpe 1990.....	31
Figura 3. Organogénesis directa e indirecta, Muñoz de Malajovich, M. A. 2006.	32
Figura 4. Concepto de semilla artificial. Descripción ilustrativa de los elementos básicos que componen a una semilla artificial. Hail Z.R., et al. 2017.....	35
Figura 5. Procedimiento para la elaboración de una semilla artificial (Saito, E. M. et al, 1997)	37
Figura 6. Callo friable obtenido de la combinación de ANA/ Cinetina, a un enfoque de 10X.....	48
Figura 7. Callo friable obtenido de la combinación de 2,4-D/ Cinetina., a un enfoque de 10X.....	48
Figura 8. Brotación obtenida a partir de callo con una concentración de 1.5 mg de BAP	56
Figura 9. Semillas artificiales contaminadas bajo condición de almacenamiento de 24 °C.....	57
Figura 10. Semillas artificiales contaminadas bajo condición de almacenamiento de -4 °C.....	58
Figura 11. A) Semillas artificiales bajo condición de almacenamiento de -80 °C. B) semilla artificial con explantes en perfectas condiciones.....	58

Introducción

Introducción

El jitomate (*Solanum Lycopersicum L*) es considerado una de las hortalizas más importantes en México y en diversas partes del mundo, es un fruto carnoso con semillas rodeadas de pulpa muy coloreada, típicamente de tonos que van desde el amarillo hasta el rojo, debido a la presencia de pigmentos licopeno y caroteno. Es usado principalmente para la preparación de ensaladas y elaboración de jugo en fresco; la industria alimenticia actual procesa los jitomates en infinidad de formas, desde zumos, purés, conservas de jitomates enteros y pelados, fritos, en componentes de diversas salsas picantes y dulces, mermeladas, esencia para la elaboración de alimentos, saborizantes y otros productos; las variedades más utilizadas dentro de la producción agrícola en México son del tipo saladet, bola y cherry (planeación agrícola 2017-2030.gob).

México es el principal proveedor a nivel mundial de jitomate con una participación en el mercado internacional de 25.11% del valor de las exportaciones mundiales (planeación agrícola 2017-2030.gob). A pesar de que durante el periodo de 2003-2016 se experimentó una reducción en la superficie sembrada, presentó un crecimiento acumulado en la producción 54.25% y en las exportaciones en fresco 77.87%, convirtiéndolo en uno de los cultivos con mayor incremento en la productividad (tabla 1).

Tabla 1. Datos anuales de producción de jitomate en México.

Año/ Periodo	ESTIMACIONES				CRECIMIENTO ACUMULADO			CRECIMIENTO PROMEDIO ANUAL		
	2016	2018	2024	2030	2003- 2016	2016- 2018	2016- 2024	2016- 2030	2003- 2016	2016- 2030
Producción potencial (millones de toneladas)	3.35	3.95	5.76	7.76	54.26%	117.97%	45.70%	125.80%	3.39%	5.58%
Exportación (millones de toneladas)	1.61	2.17	3.84	5.50	77.88%	34.76%	77.29%	242.80%	4.53%	8.55%
Valor de exportaciones (millones de dólares a precios de 2016)	1,939.12	2,613.25	4,633.02	6,641.02						

Fuente: Elaboración propia con datos del SIAP y el SIAVI 2018.

Tanto el tomate verde como el jitomate también conocido como tomate rojo, son económicamente los cultivos hortícolas más importantes en todo el mundo, sin embargo, enfermedades causadas por patógenos (incluyendo virus, bacterias y hongos), en estos cultivos bajo condiciones de invernadero y de campo, pueden causar daños graves y grandes pérdidas económicas las cuales varían de 5 a 90%, dependiendo de factores como: la especie o variante de patógeno, la variedad de jitomate, la etapa fenológica al momento de la infección, condiciones climáticas durante el desarrollo de la enfermedad, la presencia de otras enfermedades y la forma de dispersión del patógeno en la plantación, (Jones *et al* , 2001; Hanssen *et al* , 2010; Sikora, 2011).

Planteamiento del problema

1. Planteamiento del problema

Muchas especies de la familia *Solanaceae* son de gran importancia económica y de consumo, como es el caso del jitomate, en México se cultivan alrededor de 52,374.91 ha, en los últimos años el rendimiento productivo disminuyó una tasa anual de 3.8% debido a ciertos factores: cambio climático, plagas y enfermedades que afectan directamente la productividad y el rendimiento del cultivo, lo que impacta negativamente en el ingreso económico de los productores (Panorama Agroalimentario 2016). El cáncer bacteriano es dispersado principalmente por semilla contaminada y plántulas infectadas, ocasionando daños y pérdidas que fluctúan entre un 30% y 60%, como se observa en la tabla 2 el promedio del nivel de infestación en los municipios del estado de México. Los daños y pérdidas por infestaciones varias se presentan en todas las partes de México, con un tendencia similar o superior para las regiones que cultivan Solanaceas a campo abierto, incluso en invernadero, en el estado de Puebla.

La mayoría de estas pérdidas son producto de la presencia de enfermedades y plagas no cuarentenarias reglamentadas (tabla 3), es decir, no se lleva a cabo un control fitosanitario adecuado, las cuales, debido al desconocimiento, la no aplicación y mala implementación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPAs) crean las condiciones necesarias para el desarrollo de plagas y enfermedades (Pandey, P. *et al.*, 2017). En el noroeste de México, en el Estado de Sonora, su producción se ha visto afectada por la aparición de enfermedades que causan pérdidas hasta en un 100 % (Ai., *et al.*, 2019).

A pesar de que la enfermedad se consideraba confinada en los estados del noroeste de los EE. UU., en Sinaloa, México se detectó e identificó el cancro bacteriano en el Valle de Culiacán, y de 1994 a 1996 se extendió rápidamente y se estableció en las principales áreas hortícolas de exportación de los Estados de Jalisco, San Luis Potosí, Baja California Sur y

Baja California Norte (Holguin-Peña et al., 2006). Hasta la fecha, se han presentado daños en 200 ha en sistemas de producción protegida, con pérdidas de comercialización estimadas en 40 millones de dólares. En el 2006 la producción nacional de tomate fue de aproximadamente 995 000 t, y el Estado de Sonora tiene el décimo lugar con 2.7 % de la producción total, después de Sinaloa (28 %), Michoacán (11.3 %), San Luis Potosí (10.8 %), Zacatecas (9.8 %), Morelos (7.0 % en invernadero), Nayarit (4.7 %), Baja California Sur (2.9 %), Jalisco (3.8 %) y Baja California (2.7 %) (SIAP, 2008). Sonora cuenta con 1705 ha de tomate: 15 % en invernadero, 75 % en casa sombra y 10 % a cielo abierto (SIAP, 2008).

En San Luis Potosí se reportan pérdidas económicas que varían de 60 a 100 % en los municipios de Villa de Arista y Moctezuma (Alpuche et al., 2007). Desde 1986, los suelos de la región de Villa de Arista en San Luis Potosí, están infestados por esta bacteria y cuando las condiciones son favorables se desarrollan epifitias que merman la producción, por lo que ha disminuido la superficie cultivada con jitomate (Monreal, 2005), también se encuentra presente en el municipio de Rio Verde y la Delegación Bocas.

En el Estado de México se encuentra distribuido en los municipios de Zacualpan, Coatepec Harinas, Tonicato, Tepetlixpa, Ozumba, Atlautla e Ixtapaluca, en los cuales ha causado pérdidas de un 40 a 90% de la producción. Afecta tanto al jitomate de trasplante (plántulas) como al de siembra directa, de invernadero y a cielo abierto, ocasionando necrosis, marchitez, achaparramiento, roturas de tallo, decoloración de tejidos vasculares, amarillamiento y manchas pequeñas color café con halo blanco, en los frutos.

Aunado a lo anterior, suelos contaminados, temperaturas extremas, variantes genéticas en cultivos silvestres, entre otros factores, son el reflejo de la problemática que vivimos actualmente en nuestros campos, alimentación y economía de las poblaciones.

Tabla 2. Promedio del nivel de infestación por cáncer bacteriano en los principales productores del estado de México.

Municipio	Número de productores	Superficie infestada (ha)	Nivel de infestación promedio actual	Nivel de infestación esperada
Atlauta	9	11.4000	5.2857	5.0000
Coatepec harinas	75	95.2100	0.0946	0.0000
Ixtapaluca	1	2.0000	6.0000	0.0000
Ixtapan de la Sal	5	8.5000	3.3636	3.0000
Ozumba	39	76.6000	6.5897	6.0000
Tepetlixpa	45	88.9000	4.9279	4.5000
Texcaltitlan	7	1.7800	0.0000	0.0000
Tonatico	34	28.5000	0.0761	0.0000
Zacualpan	29	10.2700	0.3265	0.0000
Total	244	323.1600	2.9627	2.0556

Comité estatal de sanidad vegetal estado de México. 2015.

Promedio sobre el total de los datos: 24.4208 hectáreas.

Tabla 3. Diagnóstico de los problemas que afectan la productividad del jitomate.

Núm.	Problemas	Descriptor	Indicador
1	No se respeta el establecimiento de las ventanas fitosanitarias.	No existe un consenso positivo en el establecimiento de la ventana fitosanitaria	68% de los productores se sienten afectados por la ventana fitosanitaria, ya que deja de sembrar y además cree que la veda no es respetada por otros productores.
2	Alta incidencia en plagas	Altas poblaciones de mosquita blanca, ácaros en las parcelas, nematodos.	Afectación en la productividad, ocasionando pérdidas desde 5 hasta 50% en la producción y además de un mayor uso de insecticidas y agroquímicos.
3	Alta incidencia en enfermedades	Existencia de hongos, principalmente <i>Fusarium</i> y bacterias como el caso de <i>Clavibacter michiganensis</i> .	Mayor uso de agroquímicos para controlar las infestaciones.
4	Factores climáticos	Lluvias, heladas y vientos fuertes, afecta el rendimiento y productividad	26% de los productores, considera que es afectado en su productividad.
5	La falta de financiamiento es un riesgo en el momento de sembrar.	La falta de recursos económicos afecta las decisiones de cuanto producir.	42% de los productores, consideran el financiamiento para la planeación de su producción y la falta de éste, afecta la superficie a sembrar.
6	El incremento constante en el precio de los insumos encarece los costos de producción y disminuye el ingreso de los productores	Ocasiona una reducción en el ingreso de los productores y por lo tanto dejan de comprar semillas certificadas.	En el ciclo 2008-2009 los costos de algunos insumos se incrementaron, hasta en un 400%,
7	La sobre oferta y baja en el precio del jitomate en el mercado afecta el ingreso del productor.	La variabilidad de precios representa una incertidumbre en el mercado.	En el ciclo 2007-2008, las variaciones de precios de tomate en el mercado oscilaron de 100 a 400%
8	La falta de compromiso y regateo en la comercialización de jitomate.	La falta del pago oportuno y justo por el precio del tomate repercute en pérdidas económicas para el productor.	14% de los productores han incurrido en pérdidas en la comercialización

Imelda Chi Rosana *et al.*, 2011

Justificación

2. Justificación

La importancia de las semillas artificiales dentro de la agricultura es poder preservar alguna especie de interés, obtener variedades mejoradas, incluso poder utilizarlas como medida de prevención ante patógenos, semillas de fácil manipulación, transportación, material biológico más duradero, estable y de fácil almacenamiento; uno de los usos más importantes actualmente de la semilla artificial es para la obtención de un banco de semillas y también se utilizan para la reforestación silvestre.

Dentro de la formación como ingeniero agroindustrial además de tener conocimiento básico en agricultura podremos aplicar técnicas biotecnológicas como lo es el cultivo *in-vitro* (micropropagación y organogénesis indirecta) en el diseño y formulación para la preparación de semillas artificiales de jitomate variedad saladet. Para lograrlo se requiere trabajar con plántulas completamente sanas que por medio de técnicas de cultivo *in-vitro* y la organogénesis indirecta se obtendrán brotes que podrán ser empleados en la elaboración de la semilla artificial libre de patógenos, sin variabilidad genética por los diversos factores de estrés ambientales. Dicho material será una aportación y desarrollo de impacto económico para el productor, para la salud del consumidor, y ambiental para la sociedad en general.

Objetivos

3. Objetivo general

Aplicar técnicas de micropropagación y organogénesis indirecta para la obtención de brotes y desarrollar una formulación para la obtención de semillas artificiales libres de patógenos.

Objetivos específicos

- Propagar *in-vitro* semillas de jitomate que se encuentren libre de patógenos.
- Realizar una evaluación previa para determinar la efectividad de las diferentes fitohormonas y seleccionar las favorables para inducción de callo.
- Diseñar una matriz experimental basada en siete tratamientos combinando dos diferentes fitohormonas para llevar a cabo la inducción de callo.
- Cortar los explantes y sembrar en condiciones *in-vitro* de acuerdo a la matriz experimental diseñada.
- Inducir la brotación a partir de los callos generados.
- Formular y encapsular explantes para el diseño de la semilla artificial.

Hipótesis

4. Hipótesis:

Será posible establecer las condiciones para la inducción de callos y brotes, así como la formulación para preparar semillas artificiales a partir de la brotación inducida de callos, mediante la combinación de fitohormonas diferentes.

Hipótesis nula:

- Existirá la posibilidad de que todos los tratamientos para la inducción de callo sean iguales.
- No será posible la inducción de callos libre de patógenos.
- Existe la posibilidad de generar mayor número de brotes a partir de la obtención de callos friables.
- Existirá un método eficaz para la preservación de la semilla artificial.

Hipótesis alternativa:

- Existirá la posibilidad de que al menos uno de los siete tratamientos genere callos friables en el menor tiempo posible.
- No será posible obtener un gran número de brotes a partir de la obtención de callos.
- No existirá un método eficaz para la preservación de la semilla artificial.

Capítulo I. Marco teórico

5. Capítulo I. Marco teórico

5.1 Patógenos principales que afectan al cultivo de jitomate

Existen diferentes tipos de patógenos (tabla 4) que afectan al cultivo de jitomate durante su etapa fenológica. Dentro de ellos encontramos una gran variedad de plagas, virus, hongos y aquellas causadas por bacterias; todas ellas generan un gran problema económico y bajo rendimiento en producción.

Dentro de las enfermedades causadas por bacterias, el “Cáncer bacteriano” es una enfermedad muy seria del jitomate, causada por la bacteria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (*Cmm*). En plantas jóvenes algunos síntomas de la enfermedad son: necrosis en los márgenes de las hojas, manchas necróticas de café claro a oscuro en las hojas y tallos, pequeñas ampollas levantadas de color blanco, plantas pequeñas o enanas, marchitez y rotura de tallo también pueden ocurrir, especialmente en plantas injertadas. En los frutos de plantas infectadas se desarrollan síntomas típicos del cáncer bacteriano que consisten en pequeñas manchas oscuras, rodeadas de un halo blanco, que se denomina “ojo de pájaro” (Figura 1).

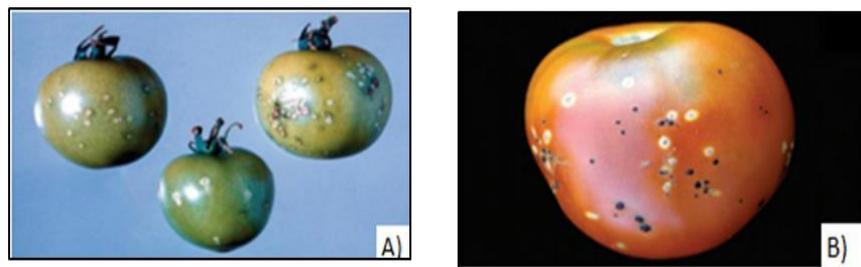


Figura 1. A) cáncer bacteriano en tomate verde, mostrando la aureola blanca amarillenta, típica del síntoma “ojo de pájaro”. B) el tomate rojo muestra algunas manchas marrones más oscuras (sin aureola) son causadas por otro patógeno bacteriano, *Pseudomonas syrin*.

Tabla 4. Patógenos que afectan al cultivo de jitomate.

Tipo de patógeno	Microorganismo causante	Enfermedad
Virus	<ul style="list-style-type: none"> • Virus de la mancha anular del tabaco. • Virus de la marchitez manchada del tomate. • Virus mosaico del tomate. • Virus aspermia del tomate. • Virus del enanismo arbustivo del tomate. 	Se observa manchas necróticas en las hojas, enrollamiento, clorosis y enanismo durante el desarrollo vegetativo.
Bacterias	<ul style="list-style-type: none"> • Cáncer bacteriano (<i>Clavibacter michiganensis</i>). • Peca y mancha bacteriana (<i>Pseudomonas syringae</i>). 	Cáncer bacteriano en solanáceas provoca necrosis, marchitez, partimiento de tallo y decoloración del tejido vascular.
Hongos	<ul style="list-style-type: none"> • Moho gris (<i>Botrytis cinérea</i>). • Tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>). • Cenicilla (<i>Leveillula taurica</i>). • Moho blanco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>). 	Se observan lesiones de forma circular o irregular de color característico (dependiendo la especie), causan pudrición en raíz y tallo.
Plagas	<ul style="list-style-type: none"> • Pulgones (<i>Aphis gossypi</i>). • Mosquita blanca (<i>Trialeurodes vaporariorum</i>). • Trips (<i>Franklinella occidentalis</i>). • Araña roja (<i>Tetranychus urticae</i>). • Gusano del fruto (<i>liothis gelotopoeon</i>). • Minadores (<i>Liriomyza huidobrensis</i>). <p>Nemátodos</p>	Alteración de fotosíntesis, respiración y otros procesos metabólicos de diversos cultivos herbáceos, arbóreos, y algodón; dentro de ellos algunos son principales vectores que transmiten enfermedades.

FAO. 2013.

5.2 Las Buenas Prácticas Agrícolas

Para combatir y mantener un control de estos patógenos, se ha implementado el uso de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPAs), estas son un conjunto de prácticas o normas destinadas a prevenir, reducir o controlar los peligros de contaminación biológica, física y/o química durante la cadena de producción. Dentro de la producción hortícola se aplican durante todas sus acciones, desde la preparación del terreno hasta la cosecha, el embalaje y el transporte. Con el objetivo de asegurar la inocuidad del producto, la protección al medio ambiente y la salud y el bienestar de los trabajadores (Kirchner, C. F. 2010). Estas benefician a los agricultores y sus familias que obtendrán alimentos sanos y de calidad para asegurar su nutrición y alimentación y generarán un valor agregado en sus productos para acceder de mejor forma a los mercados, a los consumidores, que gozarán de alimentos de mejor calidad e inocuos, producidos en forma sostenible y a la población en general, que disfrutará de un mejor medio ambiente. Es importante comentar que toda operación agrícola debe tener un plan escrito que describa los procedimientos diarios para antes y durante la realización de las operaciones desarrolladas, así como la frecuencia con la cual serán conducidas para prevenir la contaminación directa o la adulteración del producto. Algunas de estas BAPs son:

Uso de semillas certificadas.

- Material propagativo certificados libre de patógenos.
- Eliminación de posibles reservorios de los patógenos.
- Modificación de prácticas de cosecha y siembra.
- Control o eliminación de vectores.
- Buen manejo de agroquímicos.
- Eliminación de malezas.
- Limpieza del terreno o área de siembra.
- Limpieza y desinfección de los materiales y utensilios de trabajo

5.3 La agrobiotecnología

La agrobiotecnología es una herramienta eficaz, constituida por numerosas y variadas técnicas. Dentro de ellas están la hibridación genética y sus variantes, el cultivo *in-vitro* de células, micropropagación *in-vitro*, semillas naturales, la fermentación, el control biológico con microorganismos y algunas que no utilizan organismos vivos como se observa en la figura 2. Las variadas técnicas de la agrobiotecnología se fundamentan en ciencias biológicas tales como la genética, la fisiología, la microbiología, la bioquímica y la biología celular y molecular.

Además, se relacionan con otras disciplinas como la ingeniería química, bioprocesos, informática, estadística, economía, entre otras. Aunque algunas de las técnicas biotecnológicas se utilizan desde épocas milenarias con diversos fines como en la elaboración de alimentos y bebidas, desde hace poco más de cuatro décadas, en la agricultura se han introducido técnicas caracterizadas por su especificidad, precisión, rapidez y versatilidad, que claramente han superado o potenciado algunos de los procesos naturales propios de los organismos vivos. Actualmente existe una gran diversidad de técnicas agrobiotecnológicas que ayudan al rendimiento y mejora del campo, como lo son:

- Hibridación
- Fermentación
- Control biológico usando microorganismos.
- Modificación genética
- Técnicas biotecnológicas que no emplean microorganismos vivos.
- Técnicas de cultivo *in-vitro* de células y tejidos

5.4 Cultivo *in-vitro*

El cultivo de células o tejido vegetal, también denominado cultivo *in-vitro* es una herramienta importante tanto en estudios básicos y aplicados como en temas comerciales (Thorpe 2007 y Stasolla y Thorpe 2011). Aunque Street (1977) tiene recomendado un uso más restringido del término, el cultivo de tejidos vegetales es generalmente utilizado para el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes bajo condiciones físicas y químicas definidas *in-vitro*. Quizás el primer paso hacia el cultivo de tejido vegetal fue realizado por Henri-Louis Duhumel du Monceau en 1756, quien, durante sus estudios pioneros sobre la cicatrización de heridas en plantas, observó la formación de callos (Gautheret, 1985). Las investigaciones continuaron durante esta época, otro investigador que aportó más información es Haberlandt (1902) eligió los solos aislados de las hojas utilizando tejido de *Lamium purpureum* y *Eichhornia crassipes*, la epidermis de *Ornithogalum* y pelos epidérmicos de *Pulmonaria mollissima*, para obtener una división celular.

Conforme al paso del tiempo, muchos investigadores fueron aportando diferentes técnicas de cultivo *in-vitro* con el fin ya sea de realizar réplicas de diversas variedades de plantas para estudios como de resistencia ante patógeno, resistencias climáticas, obtención de una variedad a partir de la unión de dos diferentes células, entre otras. Además de aportaciones de medios artificiales que pudieran llevar a cabo un buen desarrollo de las prácticas de cultivo *in-vitro* como es el caso del medio Murashige & Skoog (MS) diseñado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962, durante sus investigaciones de nuevos reguladores del desarrollo vegetal y se ha convertido en el medio más comúnmente usado en el cultivo *in-vitro* de tejidos vegetales. Como investigador doctoral de Skoog, Murashige originalmente estaba enfocado en encontrar la fitohormona del crecimiento presente en el jugo del tabaco, sin tener éxito; En su lugar, el análisis del jugo de tabaco reveló altas concentraciones de minerales específicos. Una serie de experimentos posteriores demostró que variando los niveles de estos minerales promovía el crecimiento

sustancialmente, en comparación con formulaciones existentes. Se determinó que el nitrógeno, en particular, promovía el crecimiento del tejido de tabaco en cultivo.

5.5 Aplicaciones del cultivo *in-vitro*

El cultivo *in-vitro* ha ido evolucionando tanto en técnicas que también involucra los diversos medios, materiales, fitohormonas, nutrientes y complementos que se utilizan hoy en día. Actualmente ya contamos con diferentes medios de cultivo, cada uno estandarizado y con una o varias utilidades en particular. Actualmente en la agrobiotecnología, la propagación *in-vitro* cuenta con numerosas aplicaciones (Fig. 2) consultar el resumen general del proceso el esquema anexo como:

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción.
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año.
- Obtención de plantas libres de virus.
- Producción de semillas sintéticas.
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal).
- Obtención de metabolitos secundarios.
- Producción de nuevos híbridos.
- Mejora genética de plantas.
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos diversos.

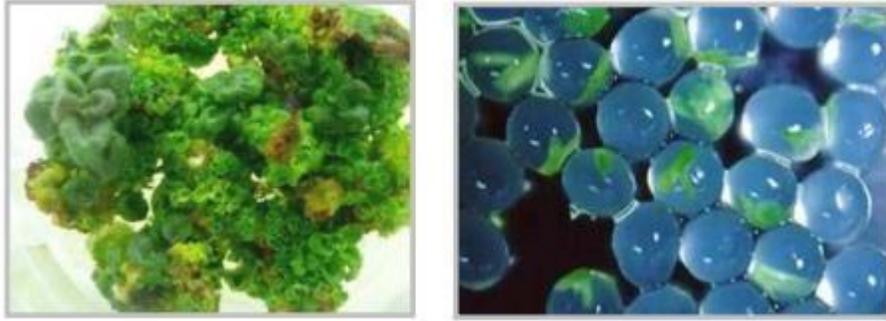


Figura 2. Algunas aplicaciones del cultivo de tejidos en plantas. A la izquierda, micropropagación de violeta africana a partir de trozos de hojas desinfectados e introducidos en condiciones de esterilidad. A la derecha, semillas naturales formuladas con embriones, *Thorpe 1990*.

5.6 Organogénesis

La organogénesis, es uno de los principales métodos de regeneración de plantas, puede clasificarse en indirecta y directa (Fig. 3). La primera tiene lugar cuando la formación de brotes ocurre mediante una fase intermedia de formación de callos, mientras que la organogénesis directa, consiste en la propagación a partir de explantes, sin fases intermedias de callo (George, 2008). Este proceso morfogénico se induce artificialmente por medio de reguladores del crecimiento (RC) también llamados fitohormonas. Generalmente se emplean auxinas como: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) y citocininas como, bencilaminopurina (6-BAP), zeatina, cinetina y tidiazurón (TDZ) con el objetivo de iniciar la multiplicación y división celular, así como la inducción de brotes, yemas, crecimiento de ápices, proliferación de raíz y tallo; todo esto en combinación de las diferentes auxinas con citocininas (Machakova *et al.*, 2008). La respuesta *in-vitro* puede variar debido a múltiples factores, entre ellos se considera el contenido endógeno y la biodisponibilidad de RC, la edad fisiológica del explante, así como la especie en estudio.

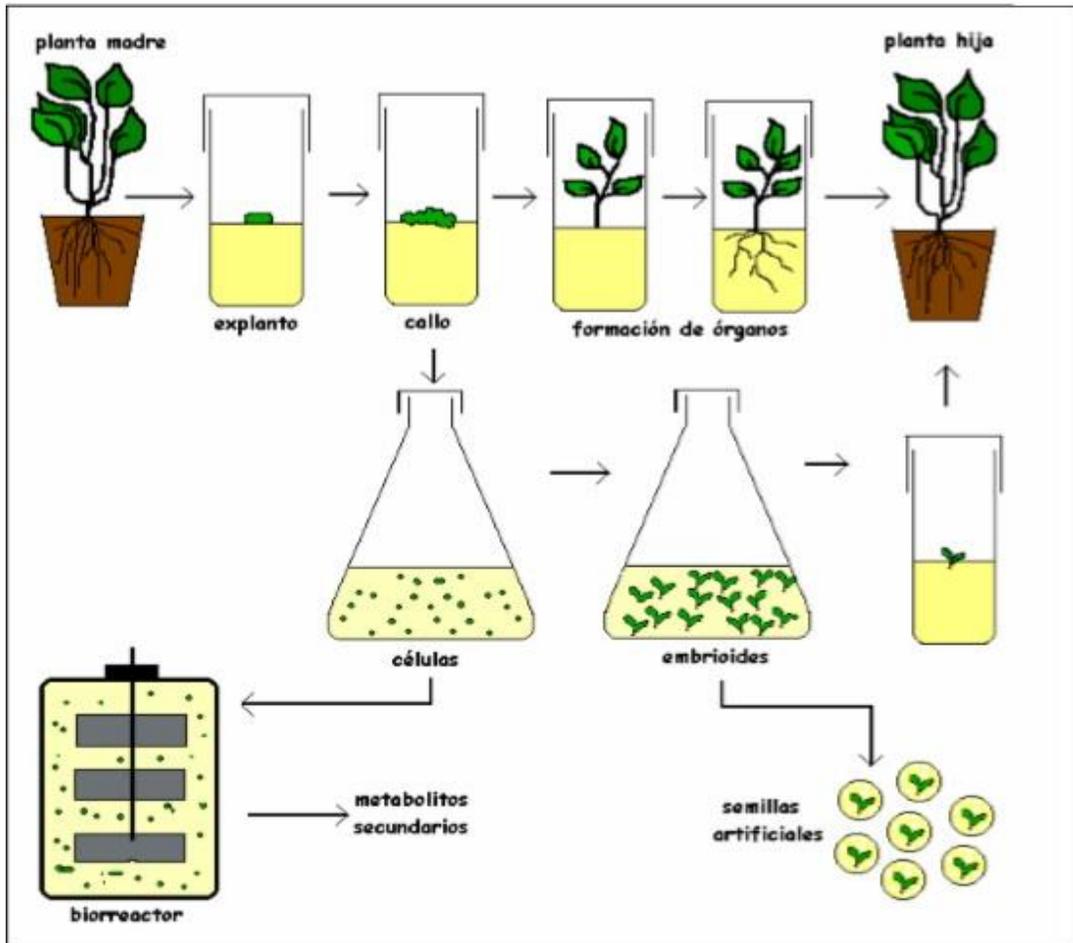


Figura 3. Organogénesis directa e indirecta, Muñoz de Malajovich, M. A. 2006.

5.7 Fitohormonas

Las fitohormonas son sustancias endógenas bioactivas presentes en las plantas, que controlan diversos procesos del desarrollo vegetal, éstas se encargan de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas (Srivastava, 2002). Son conocidos también como fitoreguladores, estos compuestos orgánicos se encuentran en pequeñas cantidades y pueden ya sea modificar o inhibir cualquier proceso fisiológico de las plantas.

Las fitohormonas se producen en pequeñas cantidades en tejidos vegetales, a diferencia de las hormonas animales, las cuales son sintetizadas en glándulas. Estas pueden actuar en el propio tejido donde se generan o bien a largas distancias, utilizando como medio de transporte los vasos del xilema y floema. Las hormonas vegetales controlan un gran número de procesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. Una fitohormona puede intervenir en varios procesos, y del mismo modo todo proceso está regulado por la acción de varias fitohormonas que actúan en conjunto de acuerdo con el proceso fisiológico (Tabla 5).

En algunos casos, la presencia y acción conjunta de dos fitohormonas, por ejemplo, auxinas y citocininas, puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfogénica de acuerdo con los niveles relativos entre sí, o de cada una de ellas, en un tejido y de acuerdo con su nivel relativo pueden conducir a la formación de brotes, alternativamente de raíces y/o a la proliferación de masas celulares (Taiz, *et al.*, 2006).

Tabla 5. Fitohormona y su función en los procesos fisiológicos de la planta.

Fitohormona	Tipos	Lugar de síntesis	Función
Auxinas	(AIA) ácido indolacético. (ANA) ácido naftalenacético. (2,4-D) ácido diclorofenoxiacético.	Brotes terminales de los tallos.	Crecimiento de los tallos por alargamiento celular.
Giberilinas	Ácido giberélico GA3	Tallos	Germinación de semillas.
Citocininas	Cinetina Zeatina 6- Bencilaminopurina	Raíces	Crecimiento de la planta por multiplicación celular.
Etileno	Etileno Etefón	Frutos	Maduración de frutos.
Ácido abscísico	(ABA) ácido abscísico	Hojas	Inhibe desarrollo de semillas y controla el cierre de estomas.

Pérez y Martínez- Laborde, 1994.

5.8 Semilla artificial

La demanda de tecnología de la semilla artificial comenzó después del descubrimiento de la producción de embriones somáticos en diversas especies de plantas *in-vitro*. Las semillas artificiales, que también se conocen con otros nombres como "synseeds", fueron descritas por primera vez por Murashige. Él definió las semillas artificiales como "un solo embrión somático encapsulado". La estructura artificial de la semilla imita la de la semilla convencional, consiste tanto en material de explante, quien simula el embrión cigótico en la semilla convencional, como en la cápsula (agente de gel y materiales adicionales tales como: nutrientes, reguladores de crecimiento, anti patógenos, biocontroladores y biofertilizantes), que emula el endospermo de la semilla convencional como se observa en la figura 4.

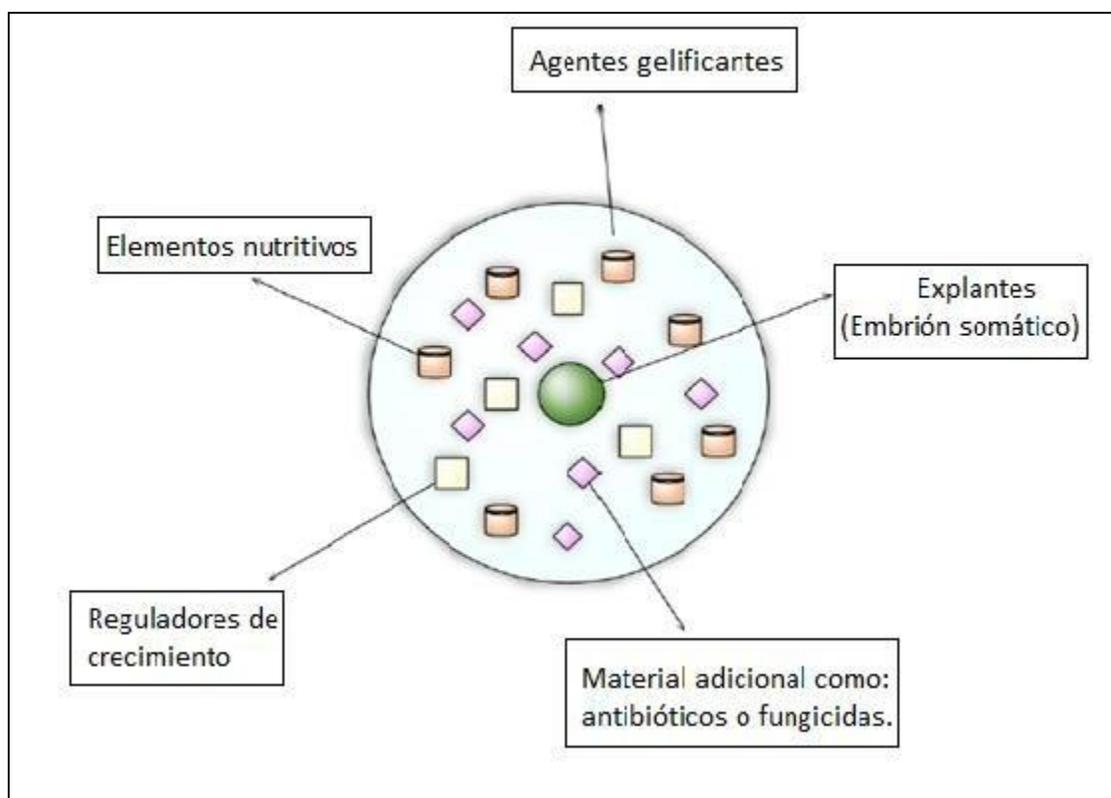


Figura 4. Concepto de semilla artificial. Descripción ilustrativa de los elementos básicos que componen a una semilla artificial. Hail Z.R., *et al.* 2017.

Por otro lado, el beneficio más importante del desarrollo y cultivo con semillas artificiales ofrece un sistema de regeneración vegetativa con capacidad de almacenamiento ya sea a corto o largo plazo. Los cultivos que se utilizan para la producción de semillas artificiales se pueden clasificar en dos categorías:

- Aquellos que tienen una alta calidad de embriones somáticos.
- Aquellos con una fuerte base comercial.

5.9 Métodos de encapsulación y agentes gelificantes

Existen diferentes tipos de agentes gelificantes que se usan para la elaboración de la semilla artificial, dentro de ellos tenemos el polioxietileno y los hidrogeles, dentro de los hidrogeles tenemos el alginato, alginato o ácido algínico y sus sales; se obtiene de las algas pardas, especies pertenecientes a la familia de las Feofíceas. El uso de este biopolímero ha adquirido una gran relevancia, ya que es utilizado en diversos campos, desde la industria farmacéutica hasta protección ambiental (Vicini *et al*, 2015). Es el más empleado debido a sus diversas ventajas: baja toxicidad, bajo costo, rápida gelificación, disponibilidad y características de biocompatibilidad.

Existen diferentes métodos de encapsulación basados en la formación de una sola capa o doble capa, para ello se recubre el explante o tejido vegetal con solución de alginato de sodio al 4% (p/v) hasta que este quede totalmente cubierto, con ayuda de una espátula o molde obtiene la forma aperlada. Una vez recubierto el explante o tejido vegetal, se sumerge en una solución de cloruro de calcio al 1.4 % (p/v) durante 1 a 2 minutos dependiendo la consistencia que se desee, así obtendremos una semilla artificial construida con una sola capa de medio. En caso de que se requiera una semilla de doble capsula, una vez realizado el primer recubrimiento, se sumerge la perla o capsula en medio MS líquido durante tres minutos, posteriormente se vuelve a recubrir con la solución de alginato y se sumerge en la solución de cloruro de calcio; de esta manera generamos la semilla de doble capsula o recubrimiento (figura 5).

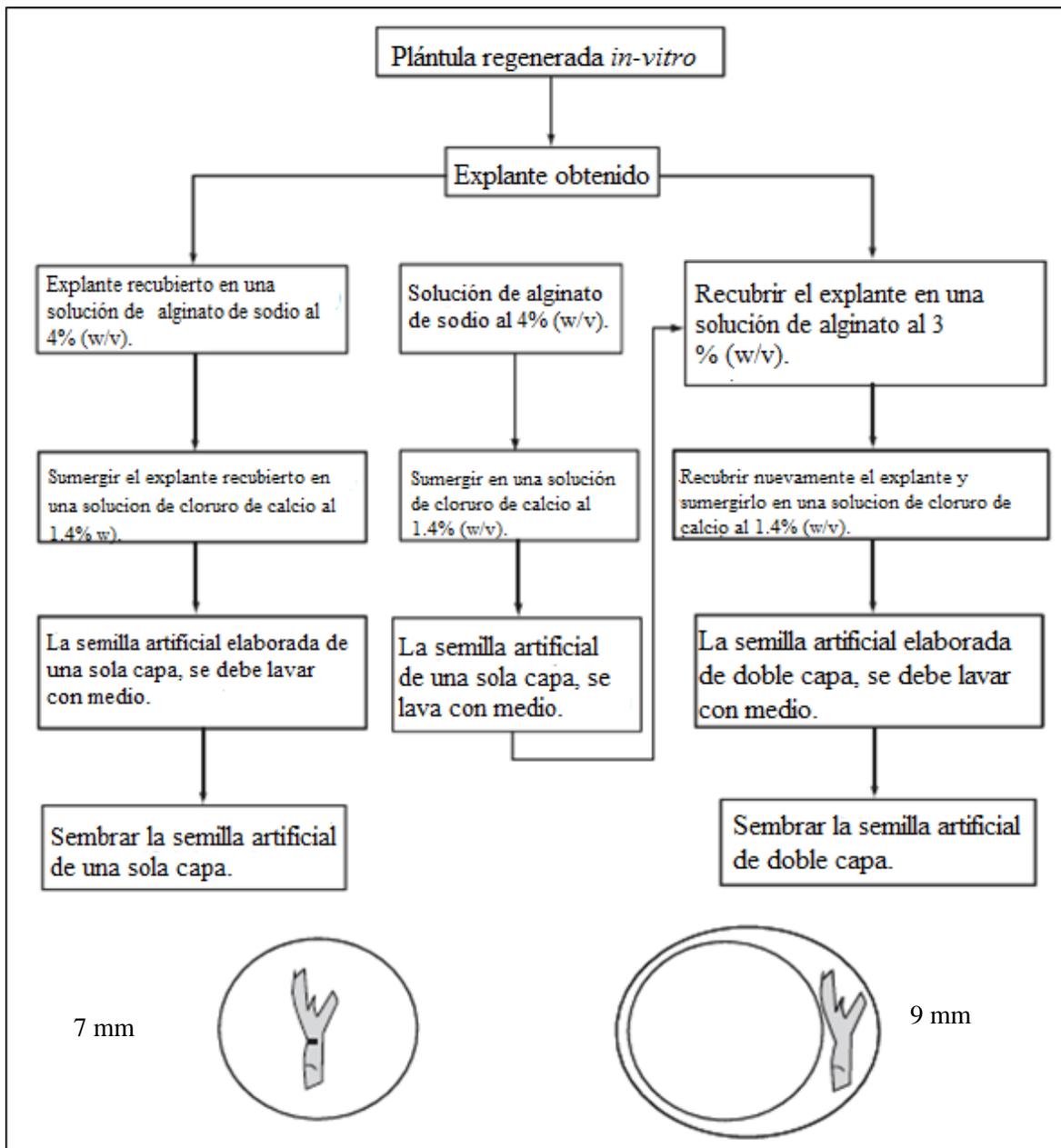


Figura 5. Procedimiento para la elaboración de una semilla artificial (Saito, E. M. *et al*, 1997)

Capítulo II.

Metodología

6. Metodología

6.1 Micropropagación *in-vitro* y desinfección de semillas de jitomate

Se seleccionaron 25 semillas de jitomate Saladet las cuales se lavaron con agua estéril (el método de esterilización consistió en que todos los materiales y reactivos se encuentre limpios, desinfectados o esterilizados) para eliminar el resto de fungicida. Las semillas se depositaron en un vaso de precipitado estéril, donde se agregó una solución de hipoclorito al 80% (v/v) hasta cubrir las completamente durante 10 minutos (esta solución se preparó con 40 ml de cloro comercial y 10 ml de agua estéril) y se realizaron 3 enjuagues con agua estéril para eliminar el excedente de la solución. Posteriormente se agregó etanol al 70% hasta cubrir totalmente las semillas durante 1 minuto para finalmente permitir su secado, para lo anterior, con ayuda de pinzas estériles se colocaron en una caja petri con papel filtro por un tiempo indeterminado hasta lograr su secado total.

Para sembrar se utilizaron tubos con 25 ml de medio sólido basal Murashige y Skoog (MS) y con ayuda de pinzas estériles previamente flameadas se sembraron tres semillas por tubo, todo realizado en campana de bioseguridad tipo A2 *Airstream ESCO*. Por último, se incubaron durante 8 días en condiciones controladas a 27°C en la cámara de crecimiento de precisión para plantas *Thermo Fisher scientific* logrando su germinación. Durante este periodo se monitoreó diariamente el cultivo para controlar la presencia de patógenos o cualquier otro tipo de contaminación. Lograda la germinación, las plántulas se llevaron al cuarto de cultivo con un fotoperiodo crecimiento de 18 hrs de luz y 6 de oscuridad durante 4 semanas, para completar el desarrollo fisiológico y obtener plántulas experimentales.

6.2 Diseño matricial primario

Como se observa en las tablas 6 y 7 se diseñaron dos matrices para evaluar diferentes fitohormonas, combinaciones y concentraciones requeridas para la formación de callos en menor tiempo. Se preparó una solución stock por cada fitohormona requerida, en este caso fueron ANA (ácido 1- naftalenacético), Cinetina y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) a una concentración de 1mg/mL. Durante su preparación se utilizó como disolvente agua estéril para el caso de ANA y 2,4-D y etanol al 96% para Cinetina, todas fueron esterilizadas mediante filtración en campana de bioseguridad tipo A2 *Airstream ESCO*.

Tabla 6. Diseño matricial para la combinación de Cinetina y ANA. La secuencia numérica en el cuerpo de la tabla indica la asignación experimental para el cultivo.

Cinetina	0.0 $\mu\text{M/L}$	0.5 $\mu\text{M/L}$	5.0 $\mu\text{M/L}$
ANA			
0.0 $\mu\text{M/L}$	1	2	3
0.5 $\mu\text{M/L}$	4	5	6
5.0 $\mu\text{M/L}$	7	8	9

Tabla 7. Diseño matricial para la combinación Cinetina y 2,4-D. La secuencia numérica en el cuerpo de la tabla indica la asignación experimental para el cultivo.

Cinetina	0.0 $\mu\text{M/L}$	0.5 $\mu\text{M/L}$	5.0 $\mu\text{M/L}$
24-D			
0.0 $\mu\text{M/L}$	10	11	12
0.5 $\mu\text{M/L}$	13	14	15
5.0 $\mu\text{M/L}$	17	16	18

6.3 Diseño de la matriz experimental

Posteriormente se diseñó la matriz experimental para la inducción de callos con explantes de tallo, hoja y raíz, en el cual se establecieron siete diferentes tratamientos incluyendo a menos un testigo. Cada tratamiento consistió de seis repeticiones con cinco explantes cada uno. Se utilizaron las siguientes fitohormonas ANA (ácido 1- naftalenacético) y Cinética con el fin de obtener la combinación primordial para la inducción de callos friables. Como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Diseño matricial para la combinación de siete tratamientos con ANA y Cinetina.

TRATAMIENTO	ANA mg/L	KCINETINA mg/L	REPETICIÓN	EXPLANTES	VOLUMEN mL
1	0	0	R1 R4 R2 R5 R3 R6	30	300
2	0.5	0	R1 R4 R2 R5 R3 R6	30	300
3	1.0	0	R1 R4 R2 R5 R3 R6	30	300
4	1.5	0	R1 R4 R2 R5 R3 R6	30	300
5	0.5	0.1	R1 R4 R2 R5 R3 R6	30	300
6	1.0	0.1	R1 R4 R2 R5 R3 R6	30	300
7	1.5	0.1	R1 R4 R2 R5 R3 R6	30	300

Con la matriz ya elaborada, se preparó una solución stock de ANA a 5mg en 100mL de agua destilada y cinetina a 1.0 mg en 100mL de agua destilada (previamente disuelta en 5mL etanol al 96%), fueron agregadas antes de que el medio se esterilizara. Posteriormente se calculó las cantidades necesarias para cada uno de los tratamientos, así como, las cantidades de sacarosa, phytigel y medio MS en polvo (diferentes volúmenes de medio: 300 mL, 150 mL, 100mL y 75mL para cada uno de los tratamientos tabla 10), haciendo uso de la balanza analítica HR-250AZ con capacidad de 252 g x 0.1 mg y el medidor de pH de sobremesa Orion Star A211 *Thermo Fisher Scientific*, para la preparación del medio MSX1 y las soluciones stock de fitohormonas, para su esterilización se utilizó la autoclave vertical marca *Yamato*.

Tabla 9. Fitohormona y componentes en la preparación de medio MS 1X para la inducción de callos.

TRATAMIENTO	300 mL	150 mL	100 mL	75 mL
	Cantidad (g)			
MS	1.32	0.66	0.44	0.33
SACAROSA	5.4	2.7	1.8	1.35
PHYTAGEL	0.6	0.3	0.2	0.15
FITOHORMONA	Cantidad (mL)			
	ANA / CINETINA			
T 1	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
T2	3/0	1.5 / 0	1 / 0	0.75 / 0
T3	6 / 0	3 / 0	2 / 0	1.5 / 0
T4	9 / 0	4.5 / 0	3 / 0	2.25 / 0
T5	3 / 3	1.5 / 1.5	1 / 1	0.75 / 0.75
T6	6 / 3	3 / 1.5	2 / 1	1.5 / 0.75
T7	9 / 3	4.5 / 1.5	3 / 1	2.25 / 0.75

Logrado el desarrollo adecuado de las plántulas, aproximadamente 30 días, el material vegetal fue empleado para obtener explantes de tallos, hojas y raíces los cuales fueron tratados para su desinfección y sembrados en condiciones de esterilidad en las diferentes condiciones de fitohormonas como ya se presentó en las tablas 6 a 9.

6.4 Siembra de explantes

La siembra se realizó en condiciones asépticas en campana de bioseguridad tipo A2 *Airstream ESCO*, empleando papel filtro, mechero, pinzas, etanol al 70%, bolsa para desechos, balanza analítica, bisturí, agua MQ, cajas Petri con papel filtro y encendedor. Las cajas Petri individualmente, sin explantes, fueron pesadas y sobre otra caja petri de vidrio se realizaron los cortes de explantes, la cual fue desinfectada previamente con etanol. Con todo el material esterilizado mediante flameo y apoyado principalmente de pinzas de disección y bisturí se tomaron cuidadosamente tejidos de raíz, hojas y tallos, sin lastimar la raíz; los tejidos fueron depositados sobre un papel filtro contenido en una caja Petri la cual se mantuvo cerrada para evitar que los tejidos se deshidrataran. Los tejidos fueron seccionados en cortes longitudinales y transversales sobre un soporte de vidrio y con ayuda de pinzas y bisturí en cortes de aproximadamente 0.3 mm usando un papel milimétrico. Se colocaron al menos cinco explantes de cada tipo de corte y tejido por caja los cuales fueron orientados de tal manera que el corte se mantuviera en contacto con el medio MS 1X. Como variable de control se registró el peso neto de todo el tejido colocado por placa de cultivo. Todos los explantes se obtuvieron de plántulas propagadas *in-vitro*, por lo que no fue necesario su tratamiento antimicrobiano previo, caso contrario cuando los explantes se generaron de cultivos en macetas. Finalmente, todos los cultivos fueron incubados en la cámara de crecimiento de precisión para plantas *Thermo Fisher scientific* a un régimen de temperatura de 23 °C y un ciclo continuo de 24 horas de oscuridad.

Durante todo el periodo de incubación, diariamente se monitorearon los explantes para regular el desarrollo de microorganismos contaminantes, en caso de ser así, se procedió a los pases de tejidos a nuevas placas de medio MS para rescatar la mayoría de los tejidos. Después de tres semanas de desarrollo, se realizó la evaluación mediante un conteo de aquellos explantes que generaron callos para obtener un porcentaje de inducción. La segunda evaluación se realizó dos semanas después de la primera evaluación, igualmente se registró el porcentaje de inducción de callo soportado con el registro mediante imágenes

macro y microscópicas de cada tratamiento empleando una microcamara Motic 3M acoplada a un esteromicroscopio triocular (Motic).

6.5 Diseño experimental para brotación

Se prepararon 120 mL medio MS con fitohormona iniciadora de brotación, se utilizó BAP (6- bencilaminopurina) de acuerdo a la matriz que se muestra a continuación (tabla 10)

Tabla 10. Matriz experimental para brotación. Cantidad de fitohormona para 60 mL de medio MS.

Cantidad de fitohormona para 60 mL de medio MS		
1.0 mg/L	1.5 mg/L	2.0 mg/L

Preparados los medios, se colocaron de dos a cuatro callos friables previamente seleccionados. Se preparó la campana de bioseguridad tipo A2 *Airstream ESCO* con la disponibilidad de mechero, pinzas, etanol al 70%, bolsa para basura, bisturí, agua MQ, cajas Petri estériles con papel filtro y encendedor. Con la precaución de desinfectar todo material que tenga contacto directo con las células vegetales. Preparado el medio de brotación se colocaron los callos seleccionados y las placas se incubaron en una cámara de precisión para crecimiento de plantas *Thermo Fisher scientific* en ciclos programados de 23°C y 16°C, día noche respectivamente, y un régimen de fotoperiodo de 16-8 horas luz oscuridad.

6.6 Formulación y elaboración de semilla artificial

Se diseñó una matriz con diferentes concentraciones de alginato y cloruro de calcio aplicados a tres diferentes temperaturas de prueba para su preservación 24-26 °C, 4 °C y -80 °C; a la formulación se adicionó criopreservadores como glicerol 1.62 M y sacarosa 0.32M. para cada temperatura a menos se probaron cuatro semillas artificiales de las diferentes concentraciones de alginato y cloruro de calcio. Posteriormente se preparó 100 mL de medio MS líquido, en campana previamente estéril se cortaron 54 explantes de plántula germinada bajo condiciones *in vitro*, estos se depositaron en una caja Petri con agua estéril que fueron empleados para la capsulación y moldeado. Se utilizaron tres diferentes moldes de capsulas de fármacos los cuales se lavaron y desinfectaron en una solución de cloro al 80% (v/v/); después de enjuagar se dejaron secar por completo en un horno/incubadora *Riossa E-41* a 55 °C durante 40 minutos o por el tiempo necesario. Durante el tiempo de espera se prepararon las diferentes concentraciones de alginato utilizando agua estéril y medio MS 0.5 X como diluyente de acuerdo con la siguiente tabla 11.

Tabla 11. Formulación de las semillas artificiales.

Reactivo	Concentración		
Alginato de calcio	3%	4%	5%
Diluyente	Agua estéril		
Cloruro de calcio	1.4%	1.4%	1.5%
Diluyente	Medio MS 0.5 X		

Para las semillas a temperatura ambiente, cada molde se rellenó con alginato, después se colocó un explante por capsula y se agregó 1 mL de cloruro de calcio durante 10 minutos. En el caso de los moldes para las temperaturas de 4 °C y -80 °C se agregó glicerol, sacarosa y el explante al inicio y, por último, se rellenó con alginato y se agregó 1 mL de cloruro de

calcio durante 10 minutos. Finalmente se guardaron 4 semillas formuladas por cada concentración de alginato en bolsas herméticas medianas de 20.3 cm x 17.8 cm, previamente expuestas a luz UV durante 20 minutos, de acuerdo a cada temperatura de conservación. Se evaluó la presencia de contaminación, respuesta del explante y mejor temperatura de almacenamiento después de un periodo de sesenta días de almacenamiento.

6.7 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos del diseño de la matriz experimental fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANOVA) con un arreglo factorial y una prueba de comparación de medias de Duncan, con un valor de significancia del 5%, utilizando el software de análisis estadístico (SAS) para determinar si los tratamientos son significativos y por medio de la comparación de medias saber cuál es el mejor para la inducción de callo.

6.8 Captura y análisis de imágenes

Todas las imágenes fueron tomadas con apoyo de un microscopio trinocular estero (Motic SMZ 171) complementado con una micro cámara (motic 3M) a un aumento de 10X. Las fotos tomadas fueron analizadas en primera instancia con el software Motic Image Plus, para un análisis confirmativo con el software Image G, tanto del diseño matricial primario como el diseño de la matriz experimental.

Capítulo III.

Resultados y

Conclusiones

7. Resultados

7.1 Diseño matricial primario

De acuerdo a la matriz diseñada, la combinación de fitohormona de Cinetina con ANA a una concentración de 5.0 $\mu\text{M/L}$ -0.0 $\mu\text{M/L}$ generó callos friables con un perímetro promedio de 36.17 mm y un área de 46.48 mm^2 a los treinta días. Las condiciones propias del cultivo nos permitieron mantener las células hasta por sesenta días, al final de dicho periodo los callos friables (Figura 6) presentaron 65.9 mm en su perímetro y un área de 241 mm^2 . La combinación de Cinetina con 2,4-D ANA a una concentración de 5.0 $\mu\text{M/L}$ -0.5 $\mu\text{M/L}$ generó un crecimiento tardío de un periodo de 60 días con un perímetro de 23.665 mm y un área de 29.0415 mm^2 (Figura 7) a diferencia de las fitohormonas anteriores; por lo que se optó utilizar la combinación de Cinetina con ANA para la inducción de callo (consultar las combinaciones en la tabla 1 de anexos).

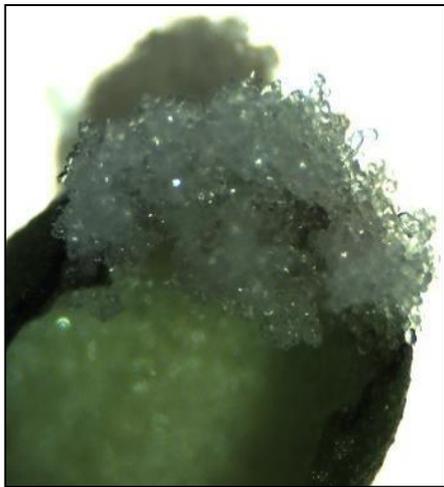


Figura 6. Callo friable obtenido de la combinación de ANA/ Cinetina, a un enfoque de 10X.



Figura 7. Callo friable obtenido de la combinación de 2,4-D/ Cinetina., a un enfoque de 10X.

7.2 Diseño experimental

8.2.1 Resultados estadísticos del ANOVA y método de Duncan para inducción de callo en tallo.

De acuerdo con el análisis de varianza (tabla 12) se obtuvo un valor de F de 83.92 con una significancia de <0.0001 , lo que indica que nuestro experimento fue bien establecido y existen diferencias significativas con un 99% de confianza entre los tratamientos.

Tabla 12. Análisis de varianza de un factor obtenido de los diferentes tratamientos para inducción de callo en tallo.

FUENTE	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- valor	Pr >F
Modelo	6	37253.085	6208.847	83.92	<0.0001
Error	28	2071.600	73.985		
Total correcto	34	39324.685			

Sin embargo, también se realizó una comparación de múltiples medias mediante el uso del método de Duncan, para poder evaluar que tratamiento es más efectivo y que concentración es la adecuada para llevar a cabo la inducción de callo en cada uno de los diferentes explantes utilizados: tallo, hoja y raíz. Por lo que cada explante tiene representado mediante tablas su análisis de varianza para determinar si es significativo o no lo es y para determinar que tratamiento puede utilizarse para la inducción de callo como se muestra en las tablas 12-17.

Tabla 13. Prueba de comparación de múltiples medias de siete diferentes tratamientos para la inducción de callo en tallos.

GRUPO	MEDIA %	No. DE REPETICIONES	TRATAMIENTO
A	97.400	5	5
A	96.000	5	4
A	94.600	5	6
A	92.200	5	2
A	84.400	5	7
A	86.600	5	3
B	0.0000	5	1

La prueba de medias obtenida por el método de Duncan (tabla 13) indica que el tratamiento cinco que contiene 0.5 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de Cinetina fue superior al resto de los tratamientos con un 97.4% de producción de callo. Por lo que el tratamiento cinco es el adecuado para la inducción y obtención de callo friable en tallo.

8.2.2 Resultados estadísticos del ANOVA y método de Duncan para inducción de callo en hojas.

De acuerdo con el análisis de varianza (tabla 14) se obtuvo un valor de F de 208.25 con una significancia de $<.0001$, lo que indica que nuestro experimento fue bien establecido y existen diferencias significativas con un 99% de confianza entre los tratamientos.

Tabla 14. Análisis de varianza de un factor obtenido de los diferentes tratamientos para inducción de callo en hojas.

FUENTE	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- valor	Pr >F
Modelo	6	34557.487	5759.580	208.25	<.0001
Error	28	774.400	27.657		
Total correcto	34	35331.885			

Tabla 15. Prueba de comparación de múltiples medias de siete diferentes tratamientos para la inducción de callo en hojas.

GRUPO	MEDIA %	No. DE REPETICIONES	TRATAMIENTO
A	100.000	5	5
A	100.000	5	6
A	100.000	5	7
BA	94.600	5	2
BC	90.800	5	4
C	86.600	5	3
D	6.600	5	1

La prueba de medias obtenida por el método de Duncan (tabla 15) indica que el tratamiento cinco que contiene 0.5 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de Cinetina fue superior al resto de los tratamientos con un 100% de producción de callo. Por lo que el tratamiento cinco es el adecuado para la inducción y obtención de callo friable en hoja. Sin embargo, el tratamiento dos y cuatro que tiene en su agrupamiento la combinación de dos letras BC y BA nos indica que al aplicar cualquier dosis de estos tratamientos diferentes obtendremos los mismos resultados para la inducción de callos friable.

8.2.3 Resultados estadísticos del ANOVA y método de Duncan para inducción de callo en raíz.

Tabla 16. Análisis de varianza de un factor obtenido de los diferentes tratamientos para inducción de callo en raíz.

FUENTE	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- valor	Pr >F
Modelo	6	32241.885	5373.647	34.25	<.0001
Error	28	4392.800	156.885		
Total correcto	34	36634.685			

De acuerdo con el análisis de varianza (tabla16) se obtuvo un valor de F de 34.25 con una significancia de <.0001, lo que indica que nuestro experimento fue bien establecido y existen diferencias significativas con un 99% de confianza entre los tratamientos.

Tabla 17. Prueba de comparación de múltiples medias de siete diferentes tratamientos para la inducción de callo en raíz.

GRUPO	MEDIA %	No. DE REPETICIONES	TRATAMIENTO
A	92.000	5	6
A	80.000	5	7
B	44.200	5	4
CB	32.000	5	5
CB	28.000	5	3
C	21.000	5	2
D	0.000	5	1

La prueba de medias obtenida por el método de Duncan (tabla 17) indica que el tratamiento seis que contiene 1.0 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de Cinetina fue superior al resto de los tratamientos con un 92% de producción de callo. Por lo que el tratamiento seis es el adecuado para la inducción y obtención de callo friable en raíz. Sin embargo, el tratamiento cinco y tres que tiene en su agrupamiento la combinación de dos letras CB y CB nos indica que al aplicar cualquier dosis de estos tratamientos diferentes obtendremos los mismos resultados para la inducción de callos friable.

En la tabla 18 se presentan las fotografías tomadas de los callos obtenidos de los diferentes tratamientos y explantes utilizados.

Tabla 18. Parte 1.- Callos friables obtenidos con los diferentes tratamientos y explantes con 10X de aumentos.

TRATAMIENTO	TALLO	HOJA	RAÍZ
T1			
T2			
T3			

Tabla 18. Parte 2.- Callos friables obtenidos con los diferentes tratamientos y explantes con 10X de aumentos.

TRATAMIENTO	TALLO	HOJA	RAIZ
T4			
T5			
T6			
T7			

8. Diseño experimental para brotación

Las respuestas obtenidas hasta el momento durante el diseño experimental para brotación se pueden observar en la figura 8. La única concentración con una respuesta hasta el momento fue de 1.5 mg de BAP durante un periodo de treinta días. Actualmente nos encontramos dando seguimiento a esta parte de la investigación.



Figura 6. Brotación obtenida a partir de callo con una concentración de 1.5 mg de BAP.

Como se puede apreciar con la imagen preliminar presentada en la figura anterior, los indicios de brotación para lograr la organogénesis indirecta completa de las plantas de jitomate deberán de seguir experimentando, ya que la friabilidad del brote presentado no tiene las características ideales esperadas. Por lo anterior se deberá atender un diseño experimental más amplio que abarque diferentes tipos y mayores márgenes en las concentraciones de las fitohormonas. Así como la respuesta con los callos generados a partir de diferentes explantes.

9.

10. Formulaci3n y elaboraci3n de semilla artificial

Al concluir los sesenta d3as de almacenamiento se evaluaron tres par3metros: ausencia de contaminaci3n, respuesta y calidad del explante. Las semillas almacenadas a temperatura ambiente (Fig. 9) presentaron contaminaci3n durante la primera semana de ser formuladas. Las semillas almacenadas bajo condiciones de temperatura de -4 3C (Fig. 10) presentaron contaminaci3n a los veinte d3as, por lo que estas dos condiciones de almacenamiento se descartaron. Las semillas almacenadas a -80 3C no presentaron contaminaci3n despu3s de sesenta d3as, el explante se mantuvo sin ninguna respuesta de crecimiento, desarrollo y tampoco de necrosis, manteni3ndose en perfecto estado fisiol3gico con una coloraci3n de c3lulas viables. La mejor condici3n de almacenamiento fue a -80 3C (Fig. 11), la mejor formulaci3n de alginato seleccionada fue la de 4% ya que su manipulaci3n fue mejor que la concentraci3n de 5% y su consistencia fue mejor que la concentraci3n de 3% ya que se diluye demasiado cuando se agrega glicerol y sacarosa.



Figura 7. Semillas artificiales contaminadas bajo condici3n de almacenamiento de 24 3C.



Figura 8. Semillas artificiales contaminadas bajo condición de almacenamiento de -4 °C.



Figura 9. A) Semillas artificiales bajo condición de almacenamiento de -80 °C. B) semilla artificial con explantes en perfectas condiciones.

Con estos ensayos se puede apreciar que se logró nuestro primer objetivo, estandarizar y seleccionar la mejor formulación de la semilla artificial. Aunque ahora el reto estará enfocado en la tecnificación y mecanización para lograr semillas de buena presentación, con una forma uniforme y tamaño uniforme de acuerdo al tamaño del explante, el cual también deberá ser preseleccionado. También deberá de prestar tiempo experimental para la encapsulación de células en suspensión que sustituyan a los explantes, así mismo evaluar las respuestas de regeneración, crecimiento, fisiología y todo el ciclo de vida de la planta regenerada sin dejar a un lado el rendimiento y valor nutricional en sus frutos. Una vez estandarizados dichos parámetros, se proyectará dichas condiciones a la formación de semillas artificiales de plantas varias en riesgo de extinción para la generación de un banco de especies vulnerables a diversos factores o condiciones ambientales.

11. Conclusiones

La culminación del trabajo nos permite formular las conclusiones siguientes. La combinación de ANA y cinetina fue la adecuada para llevar a cabo la inducción de callo desarrollado en el menor tiempo posible, por lo cual se recomienda utilizar dicha combinación.

En el caso de nuestros resultados de la matriz experimental se puede concluir que todos los tratamientos fueron significativos, sin embargo, para la inducción de callo a partir de hojas y tallos, para la combinación seleccionada se sugiere trabajar a la concentración de 0.5 mg/l de ANA con 0.1 mg/L de Cinetina siendo esta la misma para tallos y hojas, con un porcentaje en resultados del 97.4% al 100%, respectivamente.

Para la inducción de callo a partir de explantes de raíz, la generación se logró con una combinación diferente de 1.0 mg/L de ANA más 0.1 mg/L de Cinetina. Esta combinación a una concentración mayor de ANA, es debido a que la raíz como tal, es un explante que tiene en menor presencia las fitohormonas a comparación de hoja y tallo.

Para la inducción de brotación, con la concentración y combinación experimental solo se logró la regeneración de una pequeña inducción, pero no el desarrollo de una brotación como tal. Por lo que se recomienda experimentar con otras concentraciones o agregar otros nutrientes en la preparación del medio de encapsulación.

La mejor concentración a utilizar de alginato para la elaboración de las semillas artificiales fue del 4%, esta concentración permitió una fácil y mejor preparación del alginato, así como, una consistencia uniforme de la semilla. La temperatura de -80 °C fue la de mejor condición para la preservación, teniendo en cuenta que solo permite mantener el tejido en buenas condiciones junto con los criopreservadores durante un periodo de sesenta días, posteriormente, el tejido comienza a deteriorarse.

Referencias

12. Bibliografía

- A., F. L. (2007). Etiología, Epidemiología y manejo de enfermedades virales en papa y chile en el sur de sonora. *Campo Experimental Valle del Yaqui INIFAP*, 74-76.
- Agricultura, S. d. (2019). Planeación agrícola nacional 2017- 2030. *Segob*, 35.
- Barcélo. (1980). *Fisiología Vegetal*. Editorial Pirámide.
- Barthelemy R, D. J. (1977). *Técnicas para el laboratorio de biología*. Compañía Editorial Continental . Castillo, A. (2008). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una nueva biotecnología. *INIA*, 8.
- E., S. (1981). *Tratado de Botánica*. Editorial Marín.
- F., M. T. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol*, 473- 497.
- Faria RTd, D. D. (2002). Introgression of in vitro regeneration capability of *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. into recalcitrant tomato cultivars. *Euphytica*, 124.
- George EF, D. P. (2008). *Micropropagation: Uses and Methods*. Springer: Plant propagation by tissue culture 3rd edition.
- Hail Z. Rihan., F. K. (2017). Artificial seeds (Principle, Aspects and Applications). *Agronomy*, 15.
- Hall, R. D. (1999). *Plant Cell Culture Protocols*.
- Imelda Rosana Cih-Dzul., J. L. (2011). Caracterización de los sistemas de producción de tomate en el estado de Jalisco, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 512.
- José Julián Apraez M1., J. F. (2011). REGENERACION DE PLANTAS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt.) MEDIANTE ORGANOGÉNESIS INDUCIDA A PARTIR DE CALLOS. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 117.
- Kirchner, C. F. (2010). Manual de prácticas agrícolas para jitomate. *Programa de competitividad del norte grande*, 36.
- M. A. Karim, M. K. (2007). In vitro regeneration of tomato plant from leaf and internode segments. *J. Bangladesh Agril* , 216.
- Machakova I, Z. E. (2008). Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. *Springer*, 204.

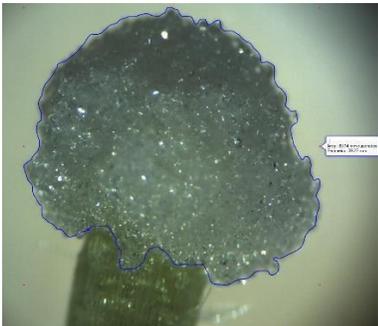
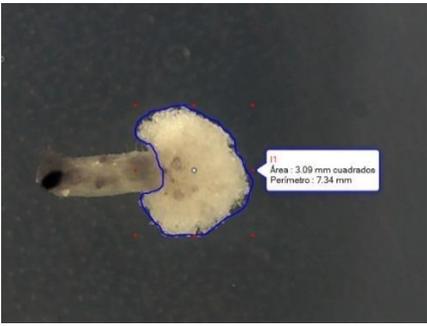
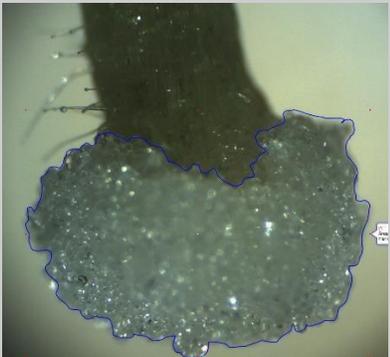
- Miguel Angel Sánchez-Hernández, 3. C.-H.-V.-V.-R.-C. (2009). MULTIPLICACIÓN IN VITRO VÍA ORGANOGÉNESIS EN CALABAZA. *Agronomía Mesoamericana*, 22.
- Muñoz de Malajovich, M. A. (2006). *Bioteología*. Editorial Universidad Nacional de Quilmes.
- Murashige, T. (1977). Plant cell and organ cultures as horticultural practices. . *Ghent, Blegium*, 60.
- Park J, Y. B. (2001). Effects of plant growth regulators, bud length, donor plant age, low temperature treatment and glucose concentration on callus induction and plant regeneration in another culture of cherry tomato 'Mini-carol'. *J. Korea soc*, 42.
- POONAM BHATIA, N. A. (2005). EFFECTS OF GENOTYPE, EXPLANT ORIENTATION, AND WOUNDING ON SHOOT REGENERATION IN TOMATO. *Bio One*, 463.
- R., D. (1976). *Fisiología vegetal*. Editorial Omega.
- R.L.M, P. (1987). *In vitro culture of higher plants*. Editorial Martinus Nijhoff Publishers.
- Rafael Gómez Jaimes, L. M. (2013). Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de tomate en el estado de Nayarit. *SAGARPA*, 63.
- Randel Martín, B. C.-P.-A. (2015). Organogénesis in vitro en el género *Digitalis*. *Bioteología Vegetal*, 195.
- Redenbaugh K., J. . (1988). Encapsulated plant embryos. *Alan R. Liss New York*, 225- 248.
- Redenbaugh K., P. B. (1986). Somatic seeds-encapsulation of asexual plant embryos. *Nat. Biotechnol*, 797- 801.
- Redenbaugh, K. . (1988). Encapsulated plant embyos. *Alan R. Liss New York*, 225- 248.
- Redenbaugh, K., Fujii, J., & Slade, D. (1988). Encapsulated plant embryos. *Alan R. Liss New York*, 225- 248.
- Redenbaugh, K., Paasch, B., Nichol, J., Kossler, M., Viss, P., & Walker, K. (1986). Somatic seeds encapsulation of asexual plant embryos. *Nat. Biotechnol*, 797 - 801.
- Rodríguez, V. (2010). Manual de plagas y enfermedades en jitomate. *SAGARPA*, 28.
- Saito, E. M. (1967). Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25 °C . *Springer*, 396.
- Segretín, M. E. (2006). Cultivos celulares y sus aplicaciones. *Argen Bio*, 16.

Vicini S. M. Castellano, M. M. (2015). Gelling process for sodium alginate. *Carbohydrates polymers*, 767- 774.

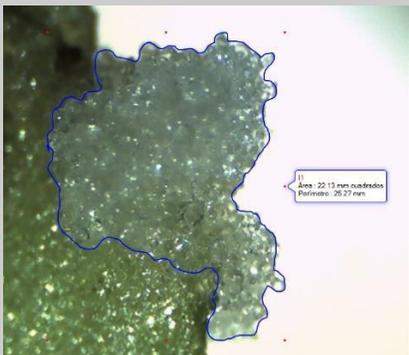
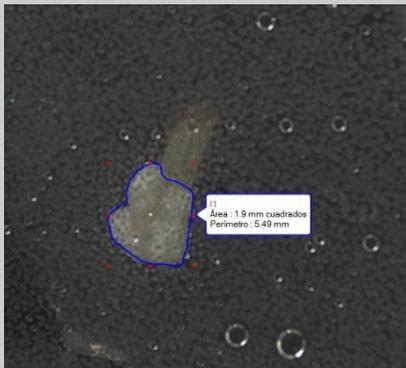
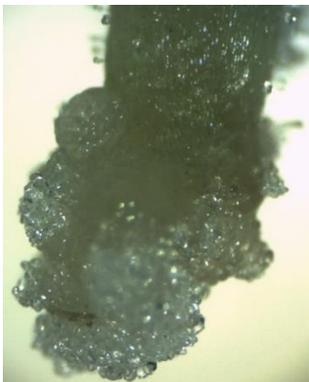
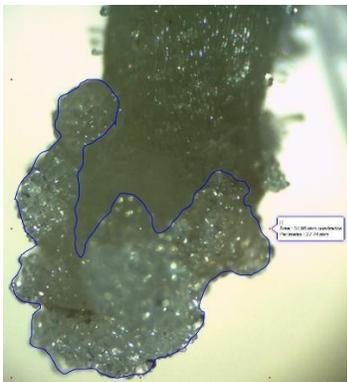
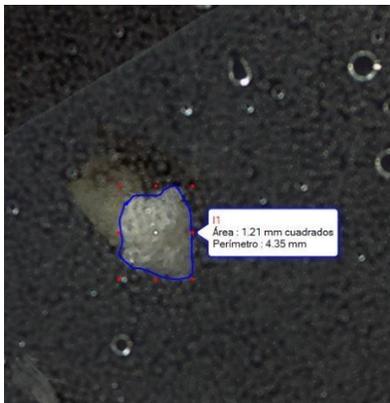
Anexos

13.Anexos

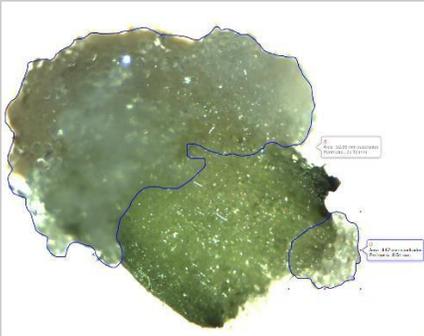
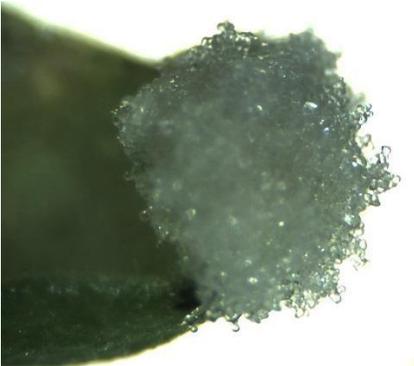
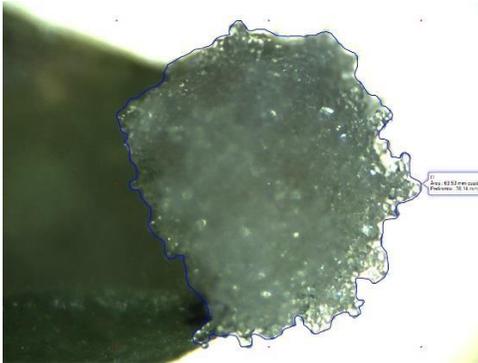
12.1 Tabla A1 de la matriz primaria

Caja 4 concentración: 0.5 μ M/L ANA/ Cinetina 0.0 μ M/L		
Tallo	Medidas	Callo desarrollado durante 2 meses
 <p>Tallo 1</p>	 <p>Perímetro: 39.27 mm Área: 80.14 mm^2</p>	 <p>Perímetro: 39.27 mm Área: 80.14 mm^2</p>
 <p>Tallo 2</p>	 <p>Perímetro: 40.96 mm Área: 66.6 mm^2</p>	 <p>Perímetro: 7.34 mm Área: 3.09 mm^2</p>

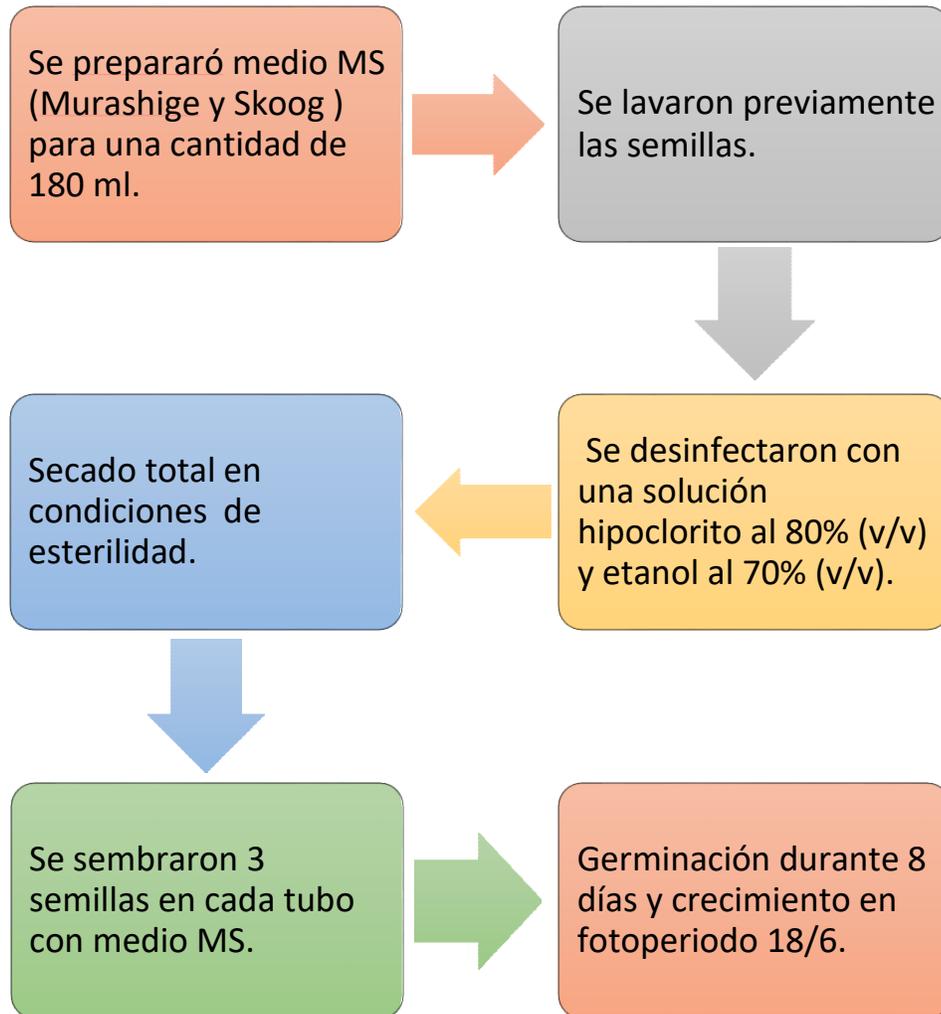
12.1.2 Continuación de la tabla A1 de la matriz primaria

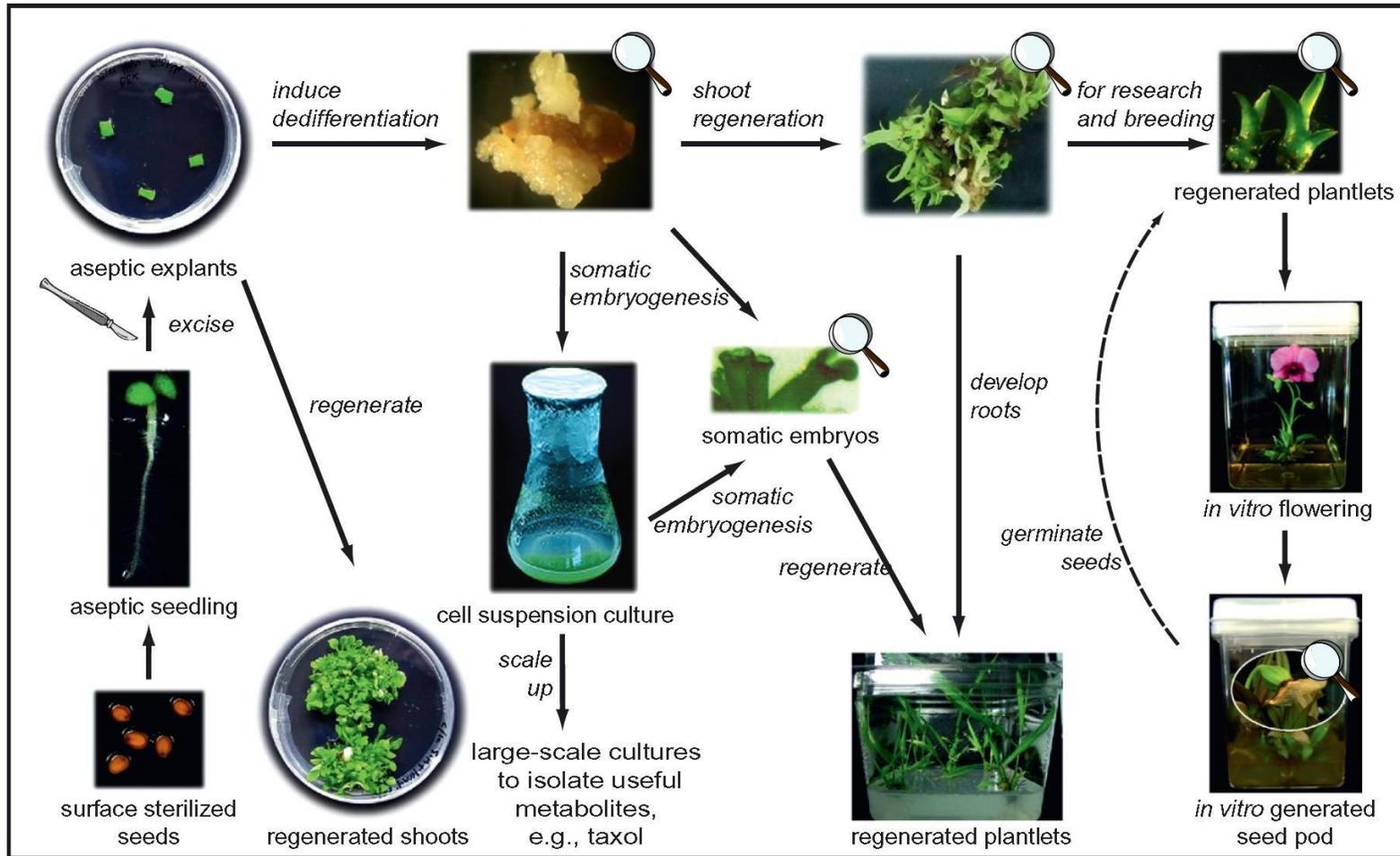
Caja 7 concentración: 5.0 $\mu\text{M/L}$ ANA/ Cinetina 0.0 $\mu\text{M/L}$		
	Medidas	Callo desarrollado durante 2 meses
 <p>Hoja</p>	 <p>Perímetro: de 36.17mm Área: 46.48 mm^2</p>	 <p>Perímetro: 5.49 mm Área: 1.9 mm^2</p>
 <p>Tallo 1</p>	 <p>Perímetro: 37.34 mm Área: 34.96 mm^2</p>	 <p>Perímetro: 4.35 mm Área: 1.21 mm^2</p>

12.1.3 Continuación de la tabla A1 de la matriz primaria

Caja 16 concentración: 5.0 $\mu\text{M/L}$ ANA/ Cinetina 0.5 $\mu\text{M/L}$		Callo desarrollado durante 2 meses
 <p>Hoja 1</p>	<p>MEDIDAS</p>  <p>Perímetro: 35.18 mm y 8.54 mm Área: 52.66 mm^2 y 4.62 mm^2</p>	No se desarrollo el callo
 <p>Hoja 2</p>	 <p>Perímetro: 38.14 mm Área: 63.53 mm^2</p>	No se desarrollo el callo

12.2 Diagrama de Micropropagación *in-vitro* de semillas de jitomate saladet.





12.3. Esquema general de las diversas rutas del cultivo *in-vitro* que van desde la toma de explantes hasta la regeneración de nuevas plantas. tomada de Altman A., Hasegawua P. 1999.