

## 1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es la hortaliza más importante en muchos países del mundo. Su cultivo está difundido a todos los continentes y en muchos casos representa una de las principales fuentes de vitaminas y minerales para las personas (ESQUINAS-ALCAZAR y NUEZ, 1995). Su fruto se destina principalmente en su estado fresco para el consumo, pero también sirve como materia prima para elaborar diversos derivados, como pastas, sopas y deshidratados, entre otros (CORFO, 1986).

Es una especie sensible al frío, siendo afectada por temperaturas menores a 10°C, por lo que su cultivo se ve condicionado a zonas donde estas temperaturas no sean una limitante o se hace necesaria la ayuda de métodos artificiales para lograr su producción. El tomate se cultiva fuera de temporada en invernaderos, incrementando en definitiva el costo del cultivo. Esto ofrece una gran oportunidad para el desarrollo de genotipos que puedan tolerar bajas temperaturas (FOOLAD y LIN, 2001).

Se han descrito diferencias genéticas relacionadas a resistencias al enfriamiento entre poblaciones con diferente origen altitudinal de *Lycopersicon hirsutum* (tomate silvestre que se encuentra desde 3000 m.s.n.m. en localidades montañosas de Perú), y tomates que se encuentran a menor altitud (PATTERSON *et al.*, 1978). Su tolerancia al enfriamiento se expresa en su capacidad para germinar a temperaturas menores de 20°C, en el mayor porcentaje de sobrevivencia de las semillas tras la germinación, y en una mayor tasa de desarrollo de clorofila y tasa de crecimiento vegetativo, entre otros (MILTAU, ZAMIR y RUDICH, 1985). Además, esta especie puede ser cruzada con el tomate cultivado para obtener nuevas líneas productivas

que tengan características de resistencia al enfriamiento (ESQUINAS-ALCAZAR Y NUEZ, 1995).

El estrés por enfriamiento conlleva una serie de respuestas en la planta de tomate. Una de ellas es el aumento en los niveles de ácido abscísico asociada al tiempo de exposición a bajas temperaturas (VERNIERI, PARDOSSI y TOGNONI, 1989).

Dentro de este marco se plantea este estudio, cuyo objetivo principal es determinar el grado de resistencia al frío en plantas de tomate, evaluando crecimiento y desarrollo de tres líneas casi isogénicas de tomate cultivado *L. esculentum*, con introgresiones de la especie silvestre *Lycopersicon hirsutum*. Se contrastará resistencia/tolerancia/susceptibilidad al frío con parámetros vegetativos y la concentración endógena de ABA, cuantificada mediante pruebas inmunoenzimáticas.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características generales de la especie:

El tomate es una especie dicotiledónea, que pertenece a la familia de las Solanáceas y posee un número de cromosomas básicos ( $x=12$ ). Es una planta que se cultiva generalmente como anual, pero que en condiciones climáticas favorables puede desarrollarse por varios años (MAROTO, 1994).

Actualmente se cultivan variedades con dos tipos de hábitos de crecimiento, determinadas e indeterminadas. El primer grupo de variedades, es utilizado principalmente para agroindustria y se cultiva al aire libre; posee un período limitado de floración, seguido por un desarrollo frutal sincrónico. El segundo grupo, es utilizado generalmente para consumo fresco, especialmente en invernaderos cuando las temperaturas son una limitante. Se caracteriza por producir inflorescencias de forma continua durante el desarrollo de la planta (KINET y PEET, 1997).

#### 2.1.1 Requerimientos térmicos de la especie

Para su óptimo desarrollo el tomate requiere de un clima sub-tropical, en lo posible ausente de heladas. En climas más crudos requiere de una artificialización como la utilización de invernaderos, o realizar su cultivo en una estación estival. El tomate necesita alternancia de temperaturas, sobretodo nocturnas en etapas como la fructificación. Para la floración se considera ideal temperaturas que no oscilen de los 24°C en el día y 15°C en la noche. Durante la fructificación se esperan temperaturas cercanas a los 25°C y 18°C (diurnas/nocturnas) (MAROTO, 1994).

Como indica RODRÍGUEZ, RODRIGUEZ y MEDINA (1984), la temperatura influye en todas las funciones vitales de la planta, como fotosíntesis y floración entre otras, existiendo rangos óptimos para cada una de ellas. Por ejemplo, para un desarrollo ideal de las estructuras vegetativas de la planta se consideran rangos entre 24-25°C (día) y 15-18°C (noche).

Al ser una especie sub-tropical, temperaturas inferiores a 10-12°C pueden provocar daño en la planta, deteniendo su desarrollo vegetativo. Temperaturas menores a 6°C pueden ser mortales para la planta. Sin embargo, existen genotipos silvestres de tomate que pueden soportar bien temperaturas menores a las anteriormente nombradas (WOLF *et al.*, 1986).

Los genotipos de tomate con tolerancia al enfriamiento pueden ofrecer una serie de ventajas para el cultivo. Por ejemplo, una mayor rapidez de crecimiento, lo que se podría traducir en mayor precocidad, adaptabilidad, uso eficiente del agua, y mejores rendimientos y calidades en comparación con variedades sin resistencia al enfriamiento (FOOLAD y LIN, 2001).

## 2.2 Efectos del frío sobre la especie:

En especies vegetales de origen templado, al descender la temperatura disminuye la velocidad de las reacciones químicas, por lo que su equilibrio cambia hacia la liberación de energía. Esto se traduce en una menor disponibilidad de energía metabólica, lo que restringe la nutrición y la toma de agua. Es por ello que se genera una menor biosíntesis y asimilación, finalizando en una detención del desarrollo (LARCHER, 1995).

El daño por enfriamiento a nivel protoplasmático, se desarrolla en pasos consecutivos en especies sensibles a bajas temperaturas como el tomate. Al

principio sólo se ven afectadas algunas funciones aisladas. Si el período de frío continúa se producen perturbaciones irreversibles principalmente a nivel de permeabilidad de membranas. Toma algunos días e incluso semanas para que el daño se desarrolle completamente. El efecto primario del enfriamiento es la transición del componente lipídico de las biomembranas desde fluido a estado de gel, por lo que su selectividad se ve reducida. En ese momento se producen intercambios descontrolados de metabolitos e iones entre los compartimentos celulares y sus contenidos son vaciados. Esto favorece la respiración anaeróbica, acumulándose intermediarios y productos tóxicos en el citosol, lo que finalmente se traduce en una muerte celular (LARCHER, 1995).

La severidad del daño por enfriamiento es función de otras variables, como la intensidad lumínica y tiempo de exposición a bajas temperaturas. Como indican KRATSCH y WISE (2000), los síntomas observados por este tipo de estrés son similares en muchas especies, incluido el tomate. Los cloroplastos y mitocondrias se hinchan y desorganizan, los gránulos de almidón reducen su tamaño y cantidad, se produce una dilatación de los tilacoides, se acumulan compuestos lipídicos en los cloroplastos y se genera una condensación de cromatina en el núcleo celular.

Según TADEO (2000) el estrés por frío provoca una activación de la senescencia y abscisión foliar. La edad de la planta juega un rol importante en la capacidad de resistir al estrés, viéndose incrementada su tolerancia a medida que avanza en edad.

Temperaturas cercanas o menores a los 10°C influyen directamente sobre la escasa cuaja de frutos de tomate, atribuida principalmente a la baja viabilidad del polen producido en estas condiciones (FERNÁNDEZ-MUÑOZ *et al.*,

1995). Además, estas temperaturas afectan la iniciación y el desarrollo floral, la cuaja y el rendimiento simultáneamente, ya que influye directamente sobre la división de asimilados en la planta (ZAMSKI y SHAFFER, 1996).

En especies como el tomate las bajas temperaturas pueden reducir el vigor vegetativo, productividad y el largo de la temporada de cultivo. Las temperaturas sub-óptimas se hacen particularmente limitantes al principio de la temporada, sobre todo cuando las temperaturas del día y la noche caen de los 10-12°C (WALKER, McKERSIE y PAULS, 1991).

### 2.3 Mecanismos de resistencia al frío:

De acuerdo a VALLEJOS y TANKSLEY (1983), el daño por enfriamiento se produce en algunas especies vegetales -la mayoría de ellas como el tomate, de origen tropical o subtropical- sin implicar el congelamiento. De acuerdo a esta definición, las plantas sensibles a este tipo de estrés desarrollan una serie de mecanismos para sobrellevarlo.

TADEO (2000) señala que la composición de los glicerolípidos determina en qué fase se encuentran los lípidos de las membranas (cristal líquido o gel), aumentando o disminuyendo su viscosidad o fluidez. Así, el calor reduce la microviscosidad y el frío la aumenta. La adaptación de las plantas al frío se fundamenta en el incremento de la cantidad de ácidos grasos insaturados en la membrana celular.

Varios estudios sugieren que el etileno endógeno promueve la tolerancia al enfriamiento en plantas de tomate. Las aplicaciones exógenas de etileno y altas concentraciones endógenas provocan cambios fisiológicos y morfológicos que reducen el estrés producido por el enfriamiento, ya que

provocan un endurecimiento en las plantas, como una disminución en la conductividad estomática relacionada con el estrés hídrico provocado por las bajas temperaturas (CIARDI, DEIKMAN y ORZOLEK, 1997).

WALKER, McKERSIE y PAULS (1991) estudiaron la resistencia al frío en la especie silvestre *L. hirsutum*. Estos autores encontraron que existía una estrecha regulación de la cadena transportadora de electrones a bajas temperaturas, para prevenir una producción descontrolada de oxígeno activado en el interior del cloroplasto y, así evitar el daño al fotosistema II.

RAISON y BROWN (1989) evaluaron la resistencia al enfriamiento de *L. hirsutum*. Los autores explican la resistencia de esta especie por su mayor rapidez para recuperar la actividad fotosintética luego del enfriamiento y mayores tasas de elongación foliar tras un período de exposición a bajas temperaturas de crecimiento, en comparación con el tomate cultivado. Además, VENEMA *et al.* (1999) señalan que la tasa de recuperación de división y elongación celular también corresponden a factores que permiten diferenciar y clasificar a *L. hirsutum* como resistente al enfriamiento.

BLOOM *et al.* (1998) estudiaron el efecto de la temperatura en la adquisición de amonio y nitrato en plantas de *L. esculentum* y *L. hirsutum*. Descubrieron que al descender la temperatura en la que están insertas las raíces a 5°C por un período de dos horas, se produce una disminución del flujo neto de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en ambas especies, produciéndose una serie de desequilibrios nutricionales. Una vez que se incrementó la temperatura hacia el óptimo radicular (20°C), las plantas de *L. esculentum* nunca pudieron retomar las tasas de absorción de nitrato, a diferencia de las plantas de *L. hirsutum* que si lo lograron.

## 2.4 Ácido abscísico:

El ácido abscísico (ABA;  $C_{15}H_{20}O_4$ ) corresponde a un sesquiterpeno apocarotenoide. Se sintetiza en los cloroplastos y otros plastidios mediante escisión oxidativa de los epoxi-carotenoides neoxantina y violaxantina. Su forma natural es (+)-(S)-ABA. Su fotoisomerización produce un desdoblamiento en los isómeros *cis* y *trans* en proporción de 50%, siendo el último biológicamente inactivo (ZACARÍAS Y LAFUENTE, 2000).

### 2.4.1 Funciones fisiológicas del ABA

#### 2.4.1.1 ABA y estrés ambiental

El ABA está involucrado en las respuestas de las plantas a distintos tipos de estrés ambiental. En el caso del enfriamiento se ha observado un aumento en la concentración endógena de ABA, pero aun no se ha podido determinar si su incremento se produce *per se* o asociado a un estrés hídrico (VERNIERI, PARDOSSI y TOGNONI, 1989).

DAIE y CAMPBELL (1981) descubrieron que plantas de tomate expuestas a temperaturas de 10/5°C, 15/10°C, 35/25°C y 45/35°C (día/noche) incrementan sus niveles de ABA libre luego de 12 horas de comenzado los tratamientos al compararlos con el tiempo cero de medición. Sin embargo, a las 24 horas, se produce un incremento en los niveles de ABA libre en las plantas sometidas a 15/10°C, lo que se repite a las 72 horas de medición, siendo este tratamiento el que arrojó mayores concentraciones de dicha hormona en el tejido vegetal. Los niveles de ABA conjugado también aumentaron, pero sólo en los tratamientos de frío a 15/10 y 10/5°C (día/noche).

Estudios realizados en especies del género *Solanum* (*S. tuberosum* y *S. commersonii*) con y sin tolerancia al enfriamiento, determinaron que luego de un período de endurecimiento a  $-5^{\circ}\text{C}/-12^{\circ}\text{C}$  (día/noche), los contenidos de ABA endógeno en las plantas con mayor tolerancia se incrementan transitoriamente, lo que no se observó en las plantas control mantenidas a  $15^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ , ni tampoco en las plantas de la especie con menor adaptabilidad a bajas temperaturas (CHANDLER y ROBERTSON, 1994).

Cuando las plantas están bajo estrés por sequía, el ABA juega un rol fundamental, afectando el cierre estomático para evitar la pérdida de agua. También incrementa la conductividad hidráulica de la planta, mejorando su balance hídrico. Sin embargo, en otros estreses ambientales, aunque se ha detectado un aumento de su concentración, no se ha podido definir claramente el mecanismo de acción del ABA, pero parece proveer a la planta una mayor tolerancia a este tipo de acontecimientos como estrés salino o térmico (DAIE y CAMPELL, 1981). Otros estudios realizados en plantas de yuca por ALVES y SETTER (2000) demuestran que existe una estrecha relación entre el estrés hídrico y la acumulación endógena de ácido abscísico, tanto en hojas maduras como en hojas inmaduras en expansión, produciéndose un incremento en las cantidades endógenas de esta hormona en tejido foliar cuando este se produce.

#### 2.4.1.2 ABA y germinación

Los genes regulados por el ABA han sido ampliamente estudiados en relación a la germinación. De esta forma, se ha demostrado su participación en procesos que involucran la síntesis de material de reserva, comienzo de dormancia y su mantención, pérdida de agua en las semillas y tolerancia a la desecación (CHANDLER Y ROBERTSON, 1994).

Distintos enfoques experimentales han determinado que el ABA controla el desarrollo embrionario en las semillas. Se ha observado una correlación entre bajas concentraciones de ABA y germinación precoz. En embriones inmaduros cultivados *in vitro* con ABA en su medio, no se produce la germinación, a diferencia de embriones cultivados sin su presencia. El ABA también reprime la expresión de numerosos genes específicos de la germinación, entre otras características que lo ligan a este planteamiento (ZACARÍAS Y LAFUENTE, 2000).

#### 2.4.1.3 Otros efectos del ABA

El ABA también juega un rol en la inhibición del desarrollo vegetativo en relación a la latencia de yemas durante los días cortos. También estaría ligado a la abscisión, al ejercer un papel estimulador a través de la inducción de la síntesis de etileno (ZACARÍAS Y LAFUENTE, 2000).

#### 2.4.2 Extracción y análisis de ácido abscísico en el tejido vegetal

Como describe DAIE y CAMPBELL (1981) la extracción de ABA se puede realizar por medio de una homogenización del tejido vegetal congelado y metanol al 90%, en una relación 1 a 10 (p/v), la que se centrifuga para separar las fases y conseguir un sobrenadante que posteriormente es analizado para estimar la concentración de ABA.

Existen diversos métodos para cuantificar la concentración endógena de ácido abscísico. Uno de estos métodos se desarrolla ajustando el pH de la fase acuosa remanente de preparación vegetal con KOH a un valor de 11.0, calentándolo a 60°C por 45 min y re-extrayéndolo con cloruro de metileno.

Luego se cuantifica mediante cromatografía de gases (DAIE y CAMPBELL, 1981).

Como indica VERNIERI, PARDOSSI y TOGNONI (1989), la determinación de ABA también se puede efectuar mediante radioinmunoensayos, donde las muestras vegetales luego de ser extraídas se congelan con la ayuda de nitrógeno líquido, para proceder a obtener un extracto al disolver agua destilada por 16 h a 4°C, el que es analizado con posterioridad.

Otro método para cuantificar ABA corresponde al descrito por WALKER-SIMMONS *et al.* (2000), en el cual se utiliza un test de ELISA indirecto (Enzyme linked immunosorbent assay) para estimar la concentración de ABA.

## 2.5 Obtención de líneas con resistencia al estrés por enfriamiento:

Especies como *Lycopersicon hirsutum* han sido encontrados en regiones montañosas de Ecuador y Perú a 3000 m.s.n.m, por lo que se espera una mayor adaptabilidad a temperaturas frías, lo que ha sido corroborado con mediciones vía plastocrón por VALLEJOS y TANKSLEY (1983). Ello entrega la posibilidad de incorporar genes de especies como *L. hirsutum* a plantas cultivadas de *L. esculentum*. Además, de acuerdo a PATTERSON y PAINE (1983) estas dos especies son fácilmente cruzadas, manteniendo a *L. esculentum* como parental femenino. Como describe FEHR (1991), esto se puede realizar mediante el método de retrocruza, que consiste en una cruce reiterada de la progenie híbrida con uno de los parentales. En este método existe un parental donador o no recurrente que aporta los genes, y un parental recurrente, el cual recibe los genes.

La introducción de genes silvestres dentro del genoma de una especie cultivada puede provocar la pérdida de algunas características agronómicas, debido al arrastre de genes por ligamento con efectos indeseados de la especie silvestre. Utilizando marcadores moleculares y métodos estadísticos se han podido identificar QTL (quantitative trait locus), que poseen las características deseadas a estudiar, permitiendo descartar otras regiones geonómicas (MONFORTE y TANKSLEY, 2000), pudiendo desarrollar líneas casi isogénicas (NILs) que contienen introgresiones de la especie silvestre en una región discreta de un cromosoma.

La tecnología del mapeo molecular ha permitido identificar genes con mayor o menor efecto sobre el enfriamiento y entender la relación entre genotipo e interacciones ambientales. Además, ha facilitado la caracterización y transferencia genética de alelos específicos favorables agronómicamente desde especies silvestres o de fuentes de germoplasma a una especie de interés (FOOLAD, CHEN y LIN, 1998).

Se han desarrollado poblaciones de NILs a partir de retrocruzadas avanzadas utilizando *Lycopersicon esculentum* E6203 y *L. hirsutum*, con la accesión LA1777, que tiene una posible tolerancia al frío (OYANEDEL et al, 2000). Además, estudios realizados por GOODSTAL et al (2005) en NILs y sub-NILs derivadas de retrocruzadas de *L. esculentum* y *L. hirsutum* con la accesión LA1778 (derivada de una planta de *L. hirsutum* encontrada a una pequeña altura superior a la que contiene la accesión LA1777), han demostrado que estas poblaciones poseen mayor tolerancia al enfriamiento al analizar la turgencia radicular ante temperaturas de enfriamiento. Así, se ha podido crear un material vegetal que permite estudiar los efectos de las bajas temperaturas sobre parámetros fisiológicos y vegetativos en especies sensibles como el tomate.

OYANEDEL (2000) estudió el comportamiento de varias líneas ante condiciones de enfriamiento que poseían una introgresión derivada de *L. hirsutum* f. *typicum* accesión LA1777. En sus ensayos determinó que en la línea TA1105, con una introgresión en el cromosoma 2, se localiza un QTL que afecta el desarrollo de una mayor biomasa y un desarrollo foliar más rápido en relación al control (*L. esculentum* cv E6203). En la línea TA1111, con la introgresión en el cromosoma 3, el QTL hallado induce un crecimiento vegetativo y reproductivo más rápido que el control en condiciones de estrés por enfriamiento. Por último, en la línea con la introgresión en el cromosoma 9 (TA1325), se produce una mayor acumulación de peso seco por el posible efecto del QTL presente. Además, otros estudios realizados por OYANEDEL *et al* (2000) sobre el análisis de QTL que inciden en la fotoinhibición a bajas temperaturas en plantas de tomate, indican que locus presentes en los cromosomas 1, 5 y 6 son responsables de entre un 7.2 y 8.1% de la varianza fenotípica experimentada.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios se realizaron en el Laboratorio de Fitogenética, de la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Provincia de Quillota, Comuna de Quillota, V región, Chile.

#### 3.1 Material Vegetal:

Las plantas utilizadas correspondieron a tres NILs (TA1105, TA1111 y TA1325) y a un control que fue tomate cultivado (*Lycopersicon esculentum* cv E6203). La NIL TA1105 tiene un QTL en el cromosoma 2, cerca del locus TG169; la NIL TA1111 en el cromosoma 3, cercano al locus TG366, y finalmente la NIL TA1325 tiene su QTL en el cromosoma 9, cercano al locus TG223A (OYANEDEL, 2000). Estos QTLs posiblemente son los responsables de una mayor tolerancia al enfriamiento en tomate.

Las NILs (Nearly Isogenic Lines) fueron obtenidas a partir de cruces específicas entre *Lycopersicon esculentum* cv E6203 y una especie de tomate silvestre *Lycopersicon hirsutum* f. *typicum* accesión LA1777. Las NILs a utilizar poseen distintos segmentos de DNA introgresados desde *L. hirsutum* a *L. esculentum*. Este DNA corresponde a regiones definidas que afectan características cuantitativas (QTL) con respecto a la resistencia o tolerancia a las condiciones de enfriamiento. De esta forma se pueden estudiar aspectos específicos descartando otras regiones de material genético que puedan influir en el estudio (MONFORTE Y TANSKLEY, 2000).

### 3.1.1 Preparación del material vegetal

Se prepararon ocho semillas de cada línea a evaluar para esperar aproximadamente cuatro plantas, considerando un 50% de porcentaje de pérdidas. Estas plantas fueron utilizadas como unidad experimental. Se procedió a germinar las semillas en bandejas almacigueras rellenas de un sustrato de perlita y turba dentro de invernaderos climatizados pertenecientes a un vivero comercial durante seis a siete semanas hasta que llegaron a tener tres a cuatro hojas verdaderas, en este momento fueron transplantadas a macetas de 0.75 l con un sustrato de turba y perlita (mezcla Sunshine número 3). Posteriormente fueron aclimatadas en una cámara de crecimiento durante una semana a 25°C durante el día y 18°C en la noche. Finalmente las plantas fueron tratadas durante 20 días a temperaturas de 9/4°C (día/noche) y dejando un grupo control a 25/18°C (día/noche).

### 3.2 Parámetros evaluados:

#### 3.2.1 Concentración endógena de ABA

La concentración endógena de ABA se midió a los días 0, 10 y 20 después del período de aclimatación.

- Extracción de ácido abscísico

Se extrajo de cada planta dos trozos de tejido de 1 cm<sup>2</sup> de hojas maduras y extendidas con la ayuda de un sacabocado. Estos trozos fueron pesados e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. Luego fueron homogenizados con metanol al 99.8% en semi-oscuridad con la ayuda de un

mortero en tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. El resultado de esta homogenización se incubó por 1 h a 4°C y finalmente se centrifugó durante 7 min a 3000 *g* a 4°C (PEÑA-CORTES *et al.*, 1989).

- Cuantificación de ácido abscísico endógeno

El sobrenadante producto de la centrifugación se utilizó para la cuantificación de ABA mediante test de ELISA (Enzyme – Lynked Immunosorbent Assay). Esta medición se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal del producto comercial Phytodetek ABA (Agdia Inc. Elkhart, EEUU).

Primero se preparó la solución indicadora. Se agregó 1 ml de agua destilada a cada indicador-ABA liofilizado requerido y se esperó por cinco minutos para lograr una reconstitución completa. Luego se agregó 4 ml de diluyente de indicador a cada indicador-ABA y se mezcló vigorosamente para asegurar una dilución adecuada.

Posteriormente se preparó la curva de calibrado (Figura 1), a partir de las diluciones expuestas en el (Cuadro 1), creando una solución stock con una concentración de 0.1  $\mu\text{mol}$  ABA/ml a partir de una solución concentrada de 10  $\mu\text{mol}$  ABA/ml. Esta solución concentrada se preparó disolviendo 5 mg de 2-*cis*-(S)-ABA en 1.89 ml de metanol absoluto. Para obtener la solución stock con la concentración de 0.1  $\mu\text{mol}$  ABA/ml se mezclaron 10  $\mu\text{l}$  de solución concentrada y 990  $\mu\text{l}$  de metanol absoluto. Los estándares se prepararon realizando una dilución seriada entre la solución stock y el buffer TBS, siguiendo las instrucciones del fabricante del kit.

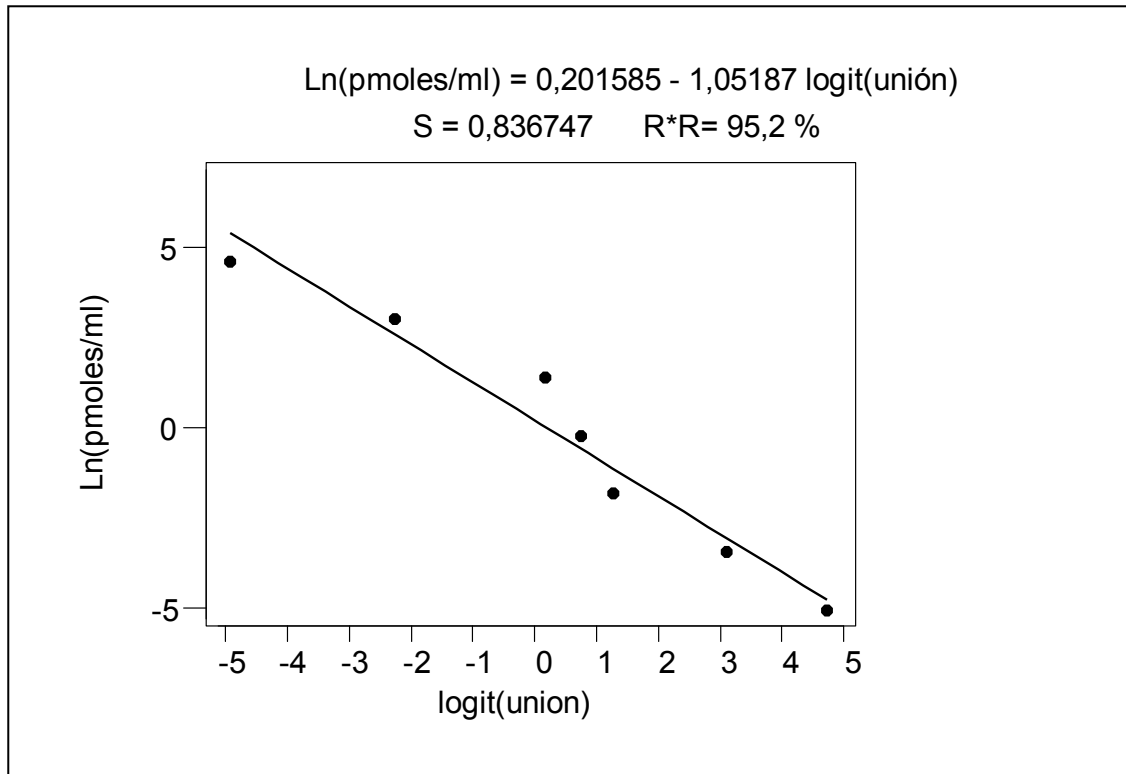


FIGURA 1: Curva de calibrado de ABA creada a partir de una dilución seriada de la solución stock.

CUADRO 1: Preparación curva de calibrado (estándares de ABA), absorbancias y porcentaje de unión.

Nombre	Solución ABA( $\mu$ l)	TBS Buffer( $\mu$ l)	picomol ABA/ml	Absorbancia	% unión	Dilución
A1=NSB	5 de SS	495	1000	0.180	0	1 a 100
B1	25 de A1	225	100	0.193	7	1 a 10
C1	25 de B1	100	20	0.352	9.5	1 a 5
D1	25 de C1	100	4	1.166	54.4	1 a 5
E1	25 de D1	100	0.8	1.409	67.8	1 a 5
F1	25 de E1	100	0.016	1.597	78.1	1 a 5
G1	25 de F1	100	0.032	1.916	95.7	1 a 5
H1	25 de G1	100	0.0064	1.978	99.1	1 a 5
A2=Bo	100 de TBS			1.994	100	

Donde:

SS = Solución stock con una concentración de 0.1 ( $\mu$ mol ABA/ml) = 100000 (picomoles ABA/ml)

NSB = unión no específica, con 0% de unión.

Bo = 100% de unión.

Se extrajeron placas de prueba y se llenaron con 100  $\mu$ l de extracto de muestra (sobrenadante de la extracción). Se agregó 100  $\mu$ l de indicador diluido preparado utilizando una micropipeta. Se procedió a mezclar cuidadosamente para luego depositar la placa en una caja húmeda, e incubarla por 3 h a 4°C. Antes de finalizar la incubación se preparó la

solución sustrato, disolviendo una pastilla sustrato por cada 16 muestras en 5 ml de diluyente sustrato.

Una vez finalizada la incubación, se retiraron las placas del refrigerador y se agregó 200  $\mu$ l de solución de lavado a cada celda, eliminando el contenido de las placas y repitiendo el procedimiento dos veces más. Después, se sostuvo la placa boca abajo y con una toalla absorbente en la boca de la placa se agitó para eliminar el resto del contenido de las celdas. Luego se realizó una adhesión con 200  $\mu$ l de solución sustrato y se sellaron las placas para depositarlas en una incubadora por 1 h a 37°C.

Finalmente se retiraron las placas de la incubadora y se agregó 50  $\mu$ l de agente de detención a cada test, para cuantificar la absorbancia de la placa a 405 nm en un lector de placas de ELISA.

Luego de cuantificada la absorbancia se procedió a calcular los porcentajes de unión de cada muestra y de los estándares de ABA mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{unión} = \frac{(\text{absorbancia estándar o muestra} - \text{absorbancia NSB})}{(\text{absorbancia } Bo - \text{absorbancia NSB})} \times 100$$

Donde:

NSB = 100  $\mu$ l de A1 (100 picomol ABA/ml) + 100  $\mu$ l Tracer = 0% unión.

Bo = 100  $\mu$ l de A2 (TBS buffer) + 100  $\mu$ l de Tracer = 100% unión.

El último paso fue realizar un análisis de regresión entre el porcentaje de unión y las concentraciones de ABA de los estándares, para interpolarlos con

los valores de las muestras y así calcular sus concentraciones de ácido abscísico. También se establecieron las diferencias de las concentraciones de ABA entre los distintos tiempos de medición.

### 3.2.2 Parámetros vegetativos

Los parámetros vegetativos fueron medidos a los días 0, 10 y 20 de terminado el período de aclimatización.

- Área foliar

El área foliar se estimó de acuerdo a lo descrito por SWARTZ y KLARING (2001), midiendo el ancho de las hojas y considerando un factor específico para plantas de tomate. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$AF = 0.203 \times (AH)^{1.674}$$

Donde:

AF: área foliar

AH: ancho de hoja

- Índice del plastocrón

El índice de plastocrón se estableció midiendo el largo de las dos últimas hojas de las plantas, considerando un largo de referencia de 20 mm (LAMOREAUX, CHANEY y BROWN, 1978). Estos datos fueron introducidos en la siguiente fórmula para establecer el valor del índice de plastocrón (IP):

$$IP = n + \frac{\ln L_n - \ln \lambda}{\ln L_n - \ln L_{n+1}}$$

Donde:

IP: índice del plastocrón

$\lambda$ : valor de referencia de largo de la hoja (20 mm)

$L_n$ : largo de hoja n

n: número correlativo de la hoja mayor o igual a longitud de la hoja de referencia

- Materia seca

Al finalizar la medición del día 20 se procedió a cortar las plantas a nivel del cuello, para secarlas dentro de una bolsa de papel en una estufa a 80°C hasta obtener un peso constante.

De los valores de índice del plastocrón (IP) y área foliar (AF) se calcularon las diferencias entre los distintos períodos de medición. También se calculó la tasa relativa de crecimiento (TRC) del área foliar, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$TRC_{Tf-Ti} = \frac{Vf - Vi}{Vi}$$

Donde:

TRC: tasa relativa de crecimiento

Tf: tiempo final

Ti: tiempo inicial

Vf: valor final (IP o AF, según corresponde)

Vi: valor inicial (IP o AF, según corresponde)

### 3.3 Análisis estadístico:

El método estadístico correspondió a un diseño completamente al azar, con arreglo factorial. El primer factor son dos niveles de temperaturas, 25/18°C (día/noche) y 9/4°C (día/noche). El segundo factor son cuatro líneas genéticas (tres NILs y un control cv. E6203). La unidad experimental fueron cuatro plantas de tomate individuales y el número de repeticiones fue tres. Se consideró como una repetición al conjunto de plantas dispuestas a las mismas temperaturas y al mismo tiempo.

El modelo matemático para el diseño factorial es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  : es el k-ésimo valor observado en cada unidad experimental

$\mu$  : es el efecto de la media general sobre cada información

$\alpha_i$  : es el efecto causado por el i-ésimo valor de temperatura

$\beta_j$  : es el efecto causado por el j-ésimo nivel de cada línea genética

$(\alpha\beta)_{ij}$  : es el efecto causado por la interacción causada por la i,j-ésima combinación de los niveles de los factores.

$\varepsilon_{ijk}$  : es el efecto del error experimental aleatorio sobre cada observación.

Los resultados fueron analizados a través de una tabla ANDEVA. En los casos en que el análisis de varianza indicó que al menos un tratamiento fue distinto con un valor de  $P \leq 0.05$ , se realizó una comparación de medias utilizando el test de Tukey, comparando cada tratamiento con el testigo, con un  $\alpha = 0.05$ . Los datos fueron analizados por el programa MINITAB (Minitab Inc., 2006) con un modelo lineal general, donde se analizó la interacción de la concentración de ABA con las temperaturas y líneas de estudio. También se realizó un análisis de la concentración a través del período de exposición, con la utilización del mismo programa por medio de un diseño de mediciones repetitivas.

## 4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Concentración endógena de ABA:

Los resultados de las concentraciones endógenas de ácido abscísico de cada línea fueron obtenidos tras realizar un test de ELISA a las plantas sometidas a dos niveles de temperaturas (9/4 y 25/18°C) durante 20 días. Las mediciones se realizaron a los días 0, 10 y 20 de comenzado el período.

La Figura 2 presenta los niveles foliares de ABA. Se les realizó un análisis de varianza, detectándose diferencias significativas para el factor temperatura, pero no para el factor línea. Esto no concuerda con lo planteado en la hipótesis del presente ensayo, ya que se esperaba que las líneas genéticas presentasen mayores niveles de ABA que el tomate cultivado, debido a la introgresión de *L. hirsutum* que confiere tolerancia al enfriamiento (OYANEDEL *et al.*, 2000). ESCALONA (2003) analizó ABA en estos materiales vegetales y encontró que la concentración aumenta al exponer las líneas TA1111 y TA1325 a una temperatura de 10/5°C durante siete días. El comportamiento de las líneas en estudio se puede deber a la relación entre temperatura y el estado hídrico de las plantas. Al producirse condiciones de enfriamiento el movimiento del agua se reduce tanto dentro como fuera de los tejidos vegetales, lo que genera un estrés hídrico (VERNIERI, PARDOSSI y TOGNONI, 1989). Esto provoca un aumento en la concentración de ABA producido por las bajas temperaturas *per se* o asociado al desbalance hídrico, por lo que las plantas se comportan de manera similar al estar influenciadas por un estrés que no presenta asociación a los QTLs en estudio. Por lo tanto, para estudios posteriores se propone realizar mediciones periódicas del estado hídrico interno de las plantas, para lograr

separar los efectos del enfriamiento sobre los de las relaciones hídricas. Las plantas sometidas a condiciones de enfriamiento aumentaron su nivel de ABA en 2.64 veces al día 10 y 4.19 veces al día 20, en comparación al día 0 de exposición. Las plantas sometidas a 25/18°C mantuvieron sus valores casi constantes, mostrando un leve descenso de concentración en los tiempos 10 y 20 (Figura 2). Las líneas genéticas se comportan de manera similar ante ambos niveles de temperatura, no existiendo diferencias significativas entre ellas.

Al analizar los datos como una serie de tiempo con ANDEVA para mediciones repetitivas, se encontró que la concentración de ABA aumenta en función del tiempo de exposición a baja temperatura, fenómeno que no ocurrió a 25/18°C donde los valores se mantuvieron constantes. El factor línea genética tampoco presentó diferencias significativas en función de la serie de tiempo, tanto en condiciones de enfriamiento como en temperaturas ideales. DAIE y CAMPBELL (1981) y VERNIERI, PARDOSSI y TOGNONI (1989), señalan que la acumulación de ABA y el daño en la membrana celular por efecto de temperaturas de enfriamiento están estrechamente relacionadas en cultivos de climas sub-tropicales como el tomate. Ellos observaron que a bajas temperaturas, los niveles de ABA aumentan de forma significativa y se incrementan en función del tiempo de exposición a este estrés. Dichas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos en el presente ensayo.

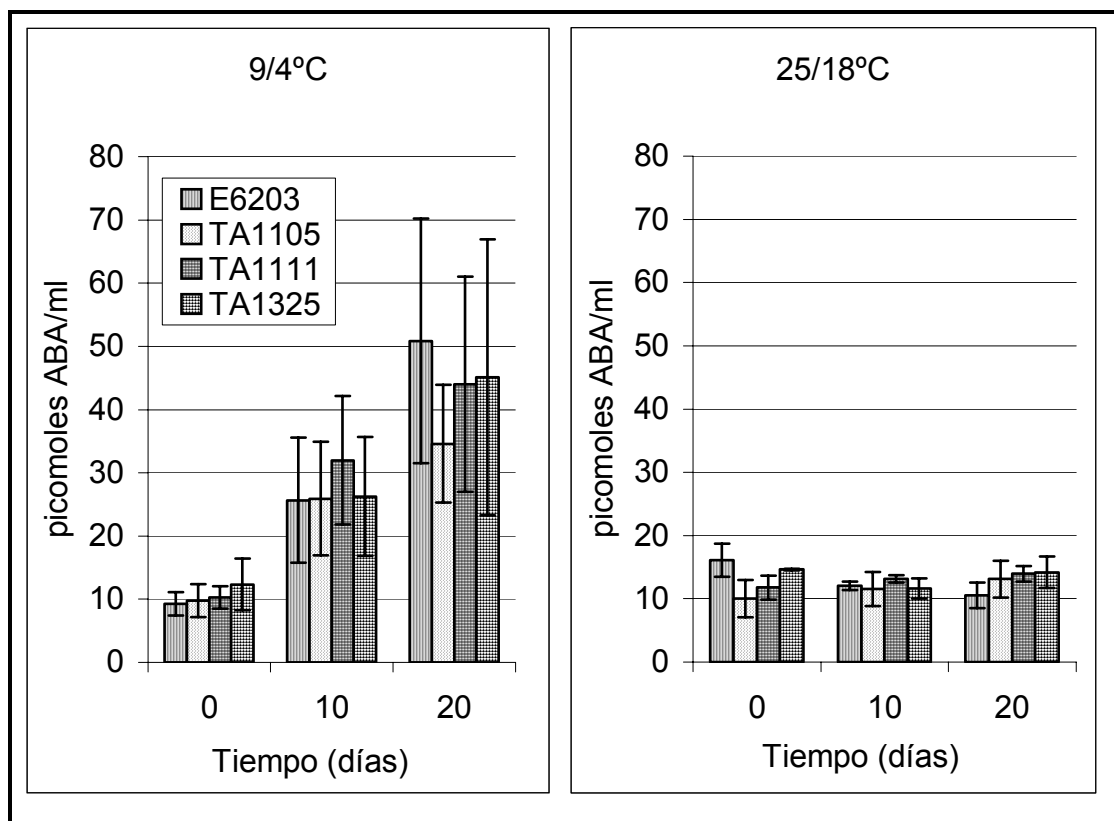


FIGURA 2. Concentración endógena de ácido abscísico en tres NILs de tomate (TA1105, TA1111 y TA1325) y un control isogénico (E6203), en dos regímenes de temperatura (9/4° y 25/18°C, día/noche) y tres tiempos de medición (día 0, 10 y 20).

Al realizar un análisis de varianza sobre las diferencias de concentración de ABA entre los diferentes tiempos de medición, se detectó una diferencia significativa en el factor temperatura entre los días 10 y 0, y 20 y 0. Las diferencias son más marcadas en las plantas sometidas a bajas temperaturas, ya que aumentan sus valores en relación a las expuestas a condiciones óptimas en 2.1 veces entre 10 y 0, y 2.2 veces entre 20 y 0. Estos datos son confirmados con lo observado por DAIE y CAMPBELL (1981) en plantas de *L. esculentum* de cinco semanas de edad sometidas a temperaturas sub-óptimas de 10/5, 15/10, 25/15, 35/25 y 45/35°C, donde los niveles de ABA aumentaron significativamente en los tratamientos mas estresantes (10/5 y 45/35°C) luego de 72 horas de exposición. En dicho estudio, las plantas sometidas al frío exhibieron casi dos veces mas ABA total que el resto de los tratamientos.

En la Figura 3 también se observa una diferencia significativa al analizar las líneas en función del nivel de temperatura 25/18°C, debido a que el control (E6203) tiene valores inferiores a TA1105 y TA1111 entre 10 y 0, y 20 y 0. Además, en los últimos 10 días de exposición a estas temperaturas, TA1325 incrementa su concentración en referencia a E6203. Este efecto puede ser causa del mayor crecimiento que tuvieron las plantas sometidas a altas temperaturas en comparación a las de condiciones de enfriamiento, lo que implica un menor tamaño radicular y una mayor propensión a producirse un estrés hídrico (BLUM y SULLIVAN, 1997); lo que en definitiva provoca un aumento en los niveles de ABA, los que se incrementan en tiempos sucesivos (ALVES y SETTER, 2000).

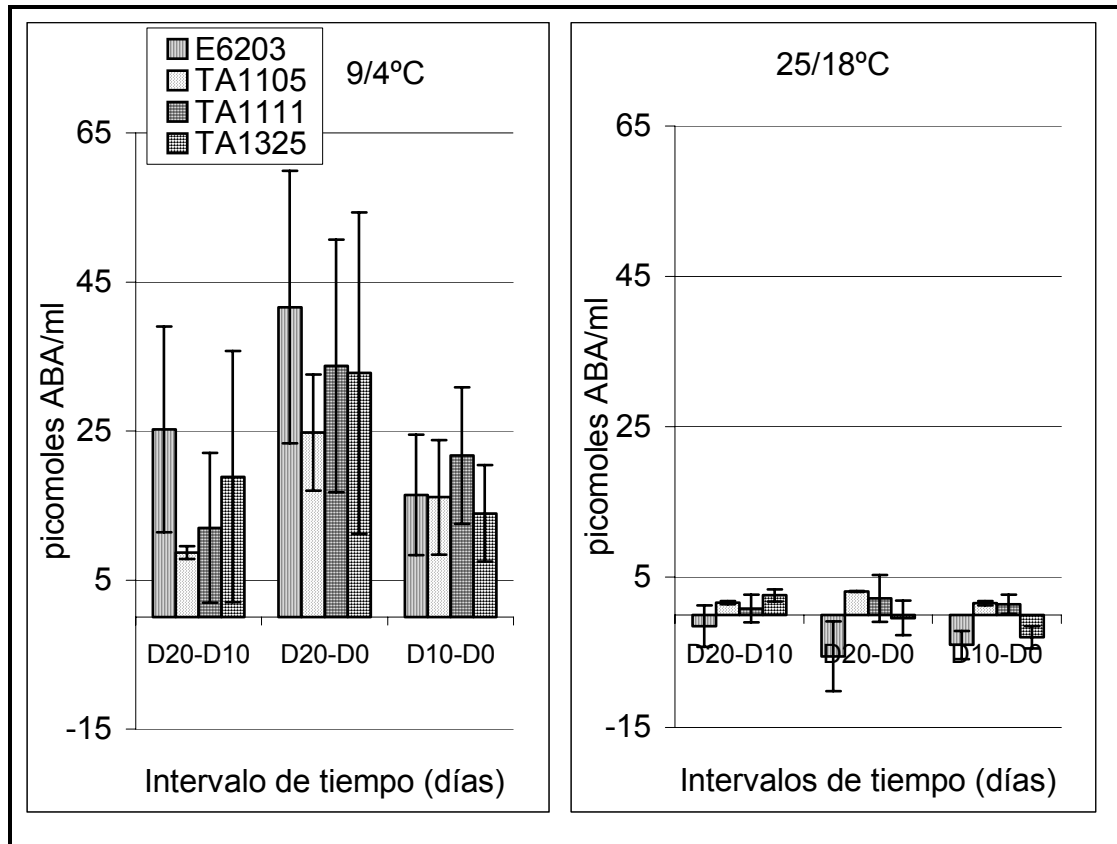


FIGURA 3. Diferencias en la concentración endógena de ácido abscísico en tres NILs de tomate (TA1105, TA1111 y TA1325) y un control isogénico (E6203), en dos regímenes de temperatura (9/4° y 25/18°C, día/noche) y tres tiempos de medición (día 0, 10 y 20).

## 4.2 Parámetros vegetativos:

### 4.2.1 Índice del plastocrón

El índice del plastocrón es una herramienta desarrollada por Erickson y Michelini en 1957 que ayuda a minimizar el efecto de la variabilidad entre plantas de una misma edad cronológica, pero de diferente estado ontológico, y plantas que morfológicamente parecen iguales, pero son cronológicamente distintas. Ellos desarrollaron un índice numérico de la edad del desarrollo de las plantas, al que denominaron índice del plastocrón (IP) (LAMOREAUX *et al.*, 1978).

El IP se muestra en la Figura 4. Se observa que solo las plantas de la línea TA1325 poseen un índice del plastocrón levemente mayor que el control isogénico (E6203) antes y durante el período de enfriamiento. Estudios de estrés por frío realizados por WOLF *et al.* (1986) indican que plantas de tomate con introgresiones de ecotipos de montaña como *L. hirsutum*, poseen un índice del plastocrón (IP) mayor que el tomate cultivado.

El análisis de varianza para mediciones repetitivas del IP en relación a los tiempos de medición y las líneas de tomate, indicó que sólo existía una diferencia significativa al relacionar la serie de tiempo con el factor temperatura en 25/18°C. Estas diferencias no se encontraron al comparar el factor línea con la serie de tiempo en los dos niveles de temperatura. Esto significa que a condiciones óptimas las plantas evaluadas experimentan un crecimiento sostenido, lo que de acuerdo a VALLEJOS *et al.* (1983), es normal en especies del género *Lycopersicon* en tratamientos de regímenes de altas temperaturas.

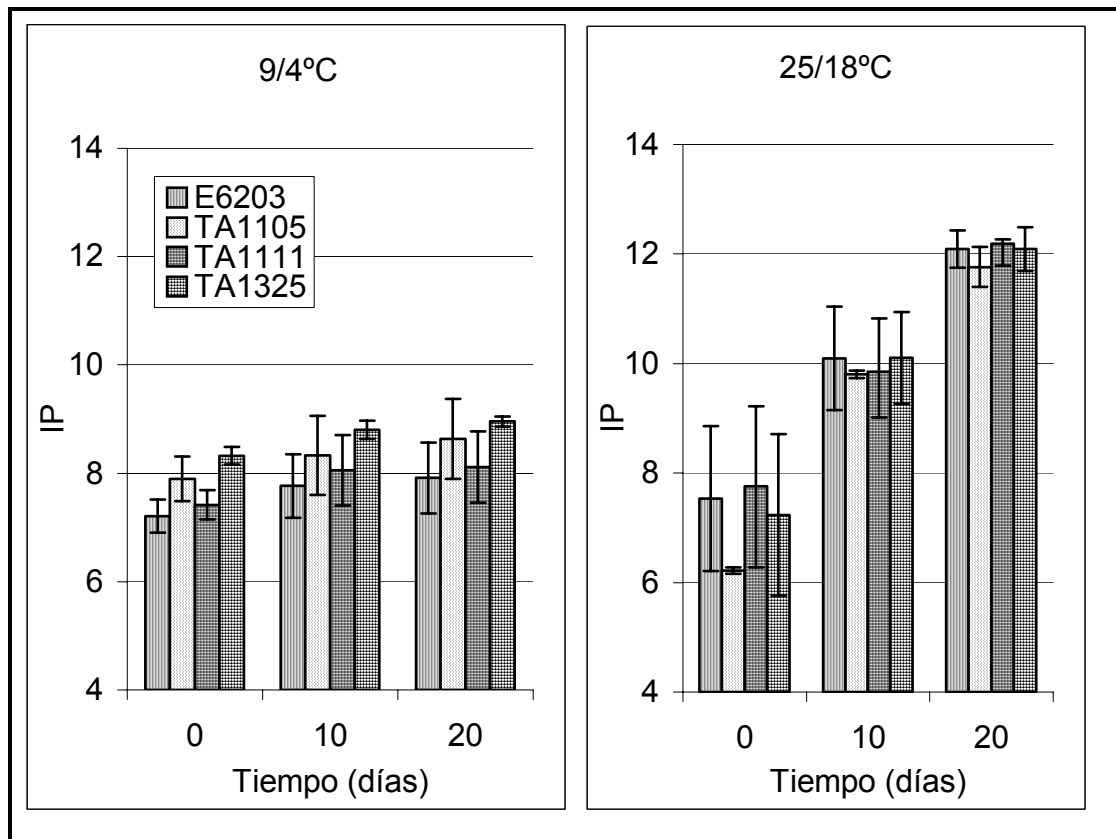


FIGURA 4. Índice del plastocrón (IP) en tres NILs de tomate (TA1105, TA1111 y TA1325) y un control isogénico (E6203), en dos regímenes de temperatura (9/4° y 25/18°C, día noche) y tres tiempos de medición (día 0, 10 y 20).

El análisis de varianza para el factor temperatura indicó que existe un marcado efecto de los regímenes de temperatura sobre el IP. Las plantas sometidas a 25/18°C tuvieron un incremento sostenido en su IP de 1.39 y 1.67 veces a los días 10 y 20 en relación al día 0 de medición, mientras que las que estuvieron a condiciones de enfriamiento mantuvieron sus valores casi constantes en el tiempo. Este fenómeno se repite al analizar 25/18°C con la diferencia del IP entre los días 20 y 10; 20 y 0, y 10 y 0, como muestra la Figura 5, donde los incrementos son de 12.4, 7.0 y 5.3 veces respectivamente, al compararlos con las mismas diferencias en las condiciones de enfriamiento. Las plantas bajo temperaturas de enfriamiento ven afectada directamente su fotosíntesis neta, lo que se traduce en consecuencias sobre su morfología, anatomía, división y translocación de asimilados (ÖSQUIST, 1983). Esto podría explicar el comportamiento de los valores de IP, que fueron mayores a 25/18°C, temperaturas ideales para el desarrollo del tomate, que a 9/4°C.

La diferencias entre los tiempos de medición que se muestran en la Figura 5, indican la dimensión y dirección de la diferencia a nivel de línea al comparar TA1105 con E6203 a 9/4°C entre el día 20 y 10, ya que la línea con la introgresión tiene una mayor diferencia del IP en 1.05 veces en condiciones de enfriamiento en las últimas dos mediciones al compararla con el control. Esta observación sugiere que posiblemente el tiempo de exposición a bajas temperaturas fue muy corto para evaluar las líneas con la introgresión, ya que esta diferencia indica un mayor crecimiento en los últimos días de ensayo, por lo que es posible que los genes presentes en el QTL se expresen en períodos fenológicos posteriores al analizado. Por lo tanto, para posteriores estudios se propone alargar el período de exposición, incluyendo otras etapas fenológicas de evaluación.

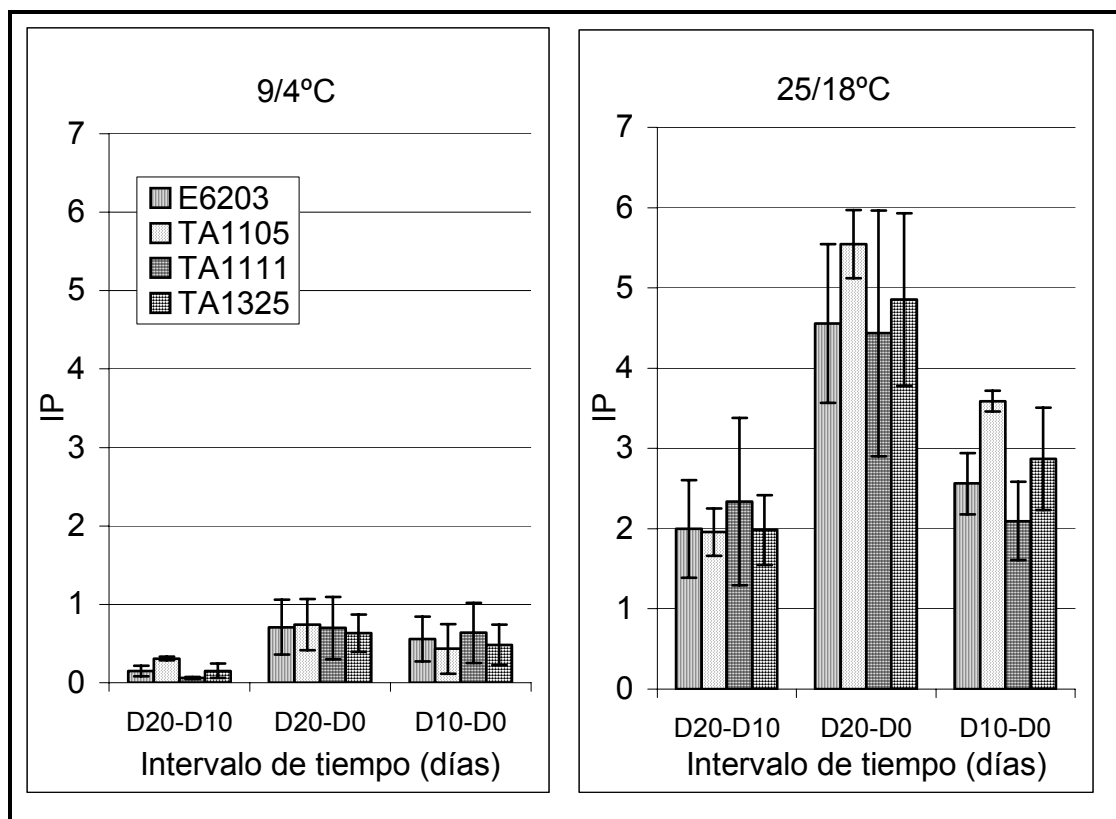


FIGURA 5. Diferencias del IP en tres NILs de tomate (TA1105, TA1111 y TA1325) y un control isogénico (E6203), en dos regímenes de temperatura (9/4° y 25/18°C, día/noche) y tres tiempos de medición (día 0, 10 y 20).

También se encontró una diferencia significativa entre TA1105 y E6203 entre el día 10 y 0 a 25/18°C, donde la primera línea tuvo un mayor incremento del IP. Estos resultados concuerdan parcialmente con lo reportado por MILTAU, ZAMIR y RUDICH (1985) en plantas de *L. hirsutum*, las cuales presentaron mayores IP tanto en temperaturas de 25/17°C como 12/6°C.

#### 4.2.2 Área foliar

El área foliar (AF) se estimó de acuerdo a la fórmula propuesta por SCHWARZ y KLÄRING (2001). Este método permite la determinación del área foliar de una forma no destructiva, pudiendo medir la hoja en forma repetitiva en el tiempo.

Al analizar los resultados de AF, diferencias de AF y tasas relativas de crecimiento (TRC), por medio de un análisis de varianza, se observa que existe una diferencia significativa entre los dos niveles de temperatura, siendo 25/18°C el que posee valores más elevados en comparación con 9/4°C, tanto a los días 10 y 20 de medición de AF. Lo mismo se observa en la diferencia de AF y la TRC. A los días 10 y 20, las plantas sometidas a 25/18°C incrementaron sus valores en 2.33 y 2.82 veces en relación a los mismos tiempos a 9/4°C (Figura 7). Las diferencias de AF (Figura 8) son ampliamente superiores en las plantas sometidas a condiciones óptimas en comparación a los mismos períodos en ambiente frío. Finalmente las TRC (Figura 9) aumentaron en 2.75, 6.26 y 8.03 veces entre los días 20 y 10, 20 y 0, y 10 y 0 respectivamente, en relación a 9/4°C. Esta información concuerda con lo estudiado por WOLFE (1991) en especies sensibles y tolerantes a condiciones de estrés por enfriamiento en relación a su interacción con el tejido fotosintéticamente activo, donde en tratamientos con temperaturas sub-óptimas de 18/12°C (día/noche) todas las especies evaluadas obtuvieron

valores de AF menores en comparación con los tratamientos de temperaturas óptimas de 28/18°C (día/noche). MILTAU, ZAMIR y RUDICH (1985), detallan que plantas de *L. hirsutum* sometidas a bajas temperaturas de 12/6°C, tienen una superficie fotosintética mayor en comparación con el tomate cultivado a esas mismas condiciones. Dicha información hacía suponer que en el presente ensayo el AF sería mayor en las líneas con introgresiones de *L. hirsutum*, lo que no se pudo establecer. Los valores oscilaron entre 5.99 y 6.88 (cm<sup>2</sup>) comenzado el ensayo, 6.5 y 7.71 (cm<sup>2</sup>) en día 10, y 7.2 y 8.1 (cm<sup>2</sup>) en el día 20, sin poder encontrar diferencias significativas entre las líneas evaluadas. ESCALONA (2003), en ensayos con seis líneas con introgresiones de *L. hirsutum*, encontró que la línea TA1315 tuvo un incremento en su AF de 17.9% en comparación a E6203, luego de siete días de exposición a bajas temperaturas.

También se realizó un análisis de varianza para mediciones repetitivas. Los resultados señalan que en 25/18°C el AF aumenta en la serie de tiempo en todas las líneas evaluadas. Ello no ocurre en condiciones de enfriamiento, donde no existe una diferencia significativa entre los valores de AF de las líneas y el tiempo de exposición. Al analizar los resultados entre las líneas y la serie de tiempo a los dos niveles de temperatura, no se encontró diferencias que pudiesen establecer si alguna de las líneas tenía valores superiores de AF en el tiempo. Ante condiciones adversas de temperatura y a medida que se incrementa el tiempo de exposición a este ambiente, las plantas generan lesiones de forma progresiva que involucran daños a nivel celular en cloroplastos, retículos, mitocondrias y vacuolas, entre otros; lo que provoca un desequilibrio general en las plantas, que se traduce en un menor desarrollo vegetativo de ellas, como por ejemplo un descenso en la tasa de producción de hojas (KRATSCH y WISE, 2000).

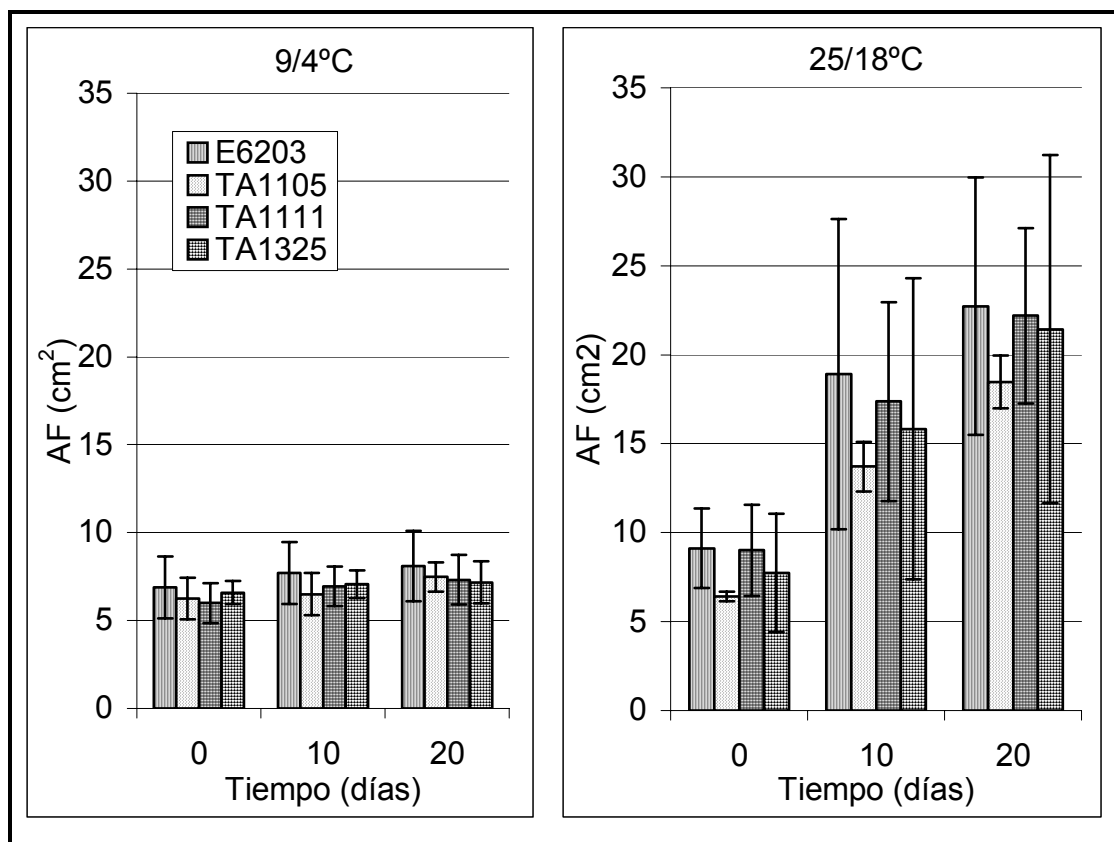


FIGURA 6. Área foliar (AF) en tres NILs de tomate (TA1105, TA1111 y TA1325) y un control isogénico (E6203), en dos regímenes de temperatura (9/4° y 25/18°C, día/noche) y tres tiempos de medición (día 0, 10 y 20).

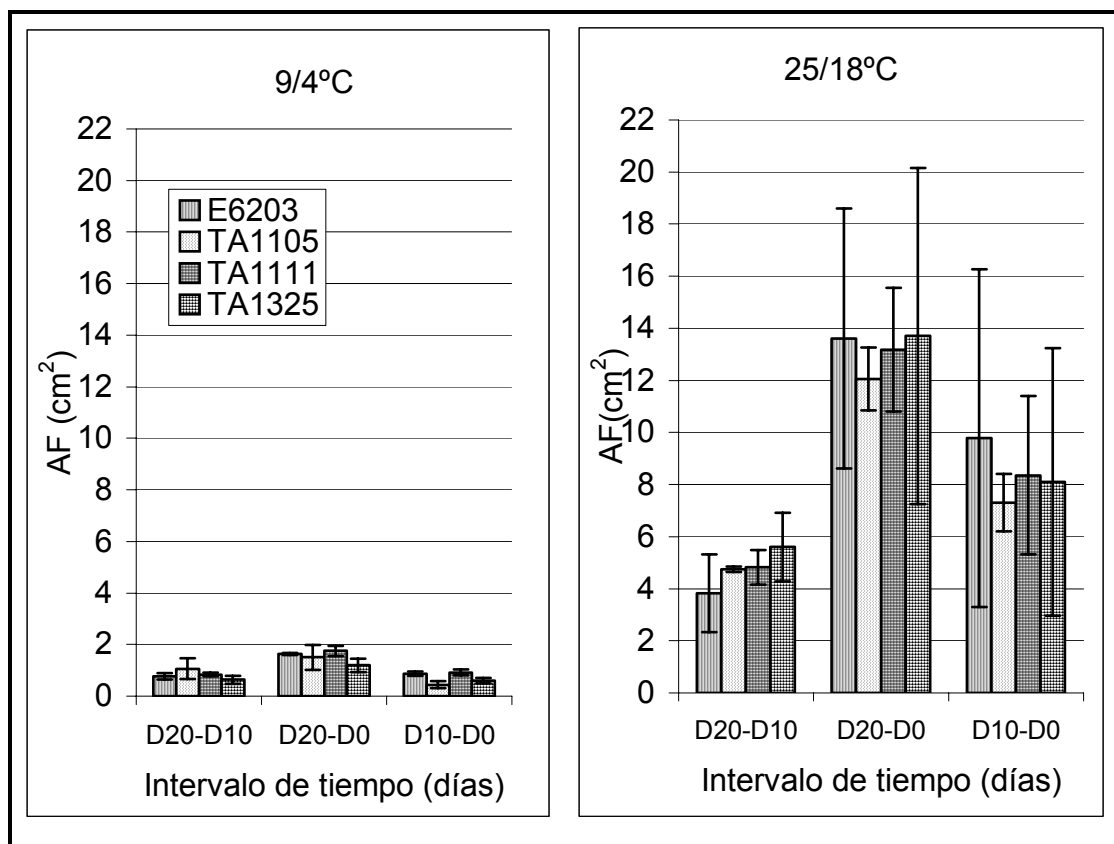


FIGURA 7. Diferencias de AF en tres NILs de tomate (TA1105, TA1111 y TA1325) y un control isogénico (E6203), en dos regímenes de temperatura (9/4° y 25/18°C, día/noche) y tres tiempos de medición (día 0, 10 y 20).

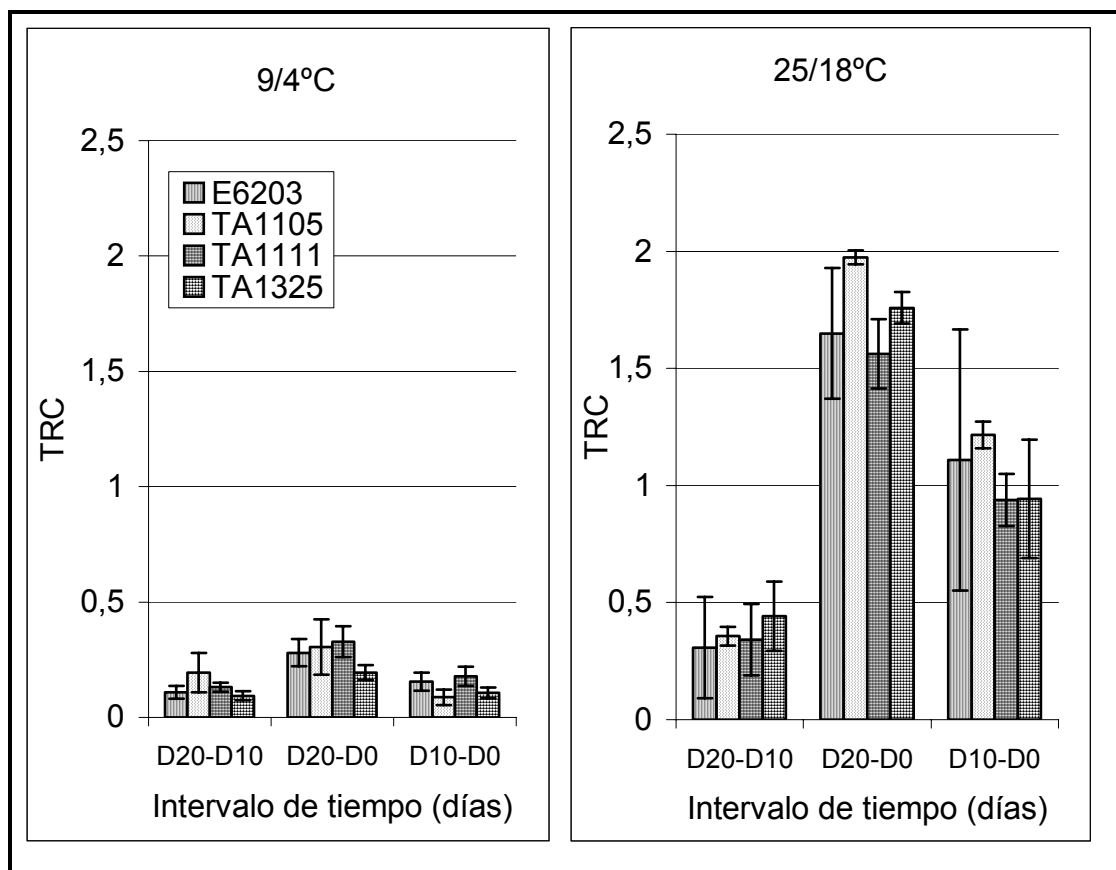


FIGURA 8. Tasa relativa de crecimiento (TRC) calculada en base al área foliar en tres NILs de tomate (TA1105, TA1111 y TA1325) y un control isogénico (E6203), en dos regímenes de temperatura (9/4° y 25/18°C) y tres tiempos de medición (día 0, 10 y 20).

#### 4.2.3 Peso seco

Los resultados de peso seco (PS) de la parte aérea de la planta se presentan en la Figura 9. Los valores fueron determinados al final de 20 días de exposición a dos regímenes térmicos.

No se detectó diferencias significativas a nivel de línea en ambos niveles de temperatura. El peso seco varió entre 1.14 y 1.26 g a 9/4°C, y 7.8 - 8.5 g a 25/18°C. Esto no se ajusta a lo descrito por FOOLAD y LIN (2001), WOLFE (1991) y MILTAU, ZAMIR y RUDICH (1985), quienes indican que especies con mayor tolerancia al enfriamiento incrementan su peso bajo condiciones de enfriamiento, proceso que no ocurre en especies o accesiones sensibles al frío. Al analizar el factor temperatura por medio de un análisis de varianza sí se encuentran diferencias significativas; las plantas sometidas a 25/18°C presentaron un peso 6.61 veces mayor que las que estuvieron a 9/4°C. Estos resultados no concuerdan con lo descrito por ESCALONA (2002) en estudios realizados en los mismos materiales genéticos utilizados en el presente estudio. La autora determinó que no había diferencias en la acumulación de peso seco entre temperaturas cálidas y frías en siete días.

La ausencia de características de resistencia al frío se puede deber a varios motivos. Uno de ellos puede ser una posible contaminación de las semillas utilizadas, que pudo haber originado un doble crossing over en la región de 12.62 cM entre los marcadores adyacentes que actúa sobre los rasgos cuantitativos de interés (MONFORTE y TANSKLEY, 2000; BERNACCI y TANSKLEY, 1997).

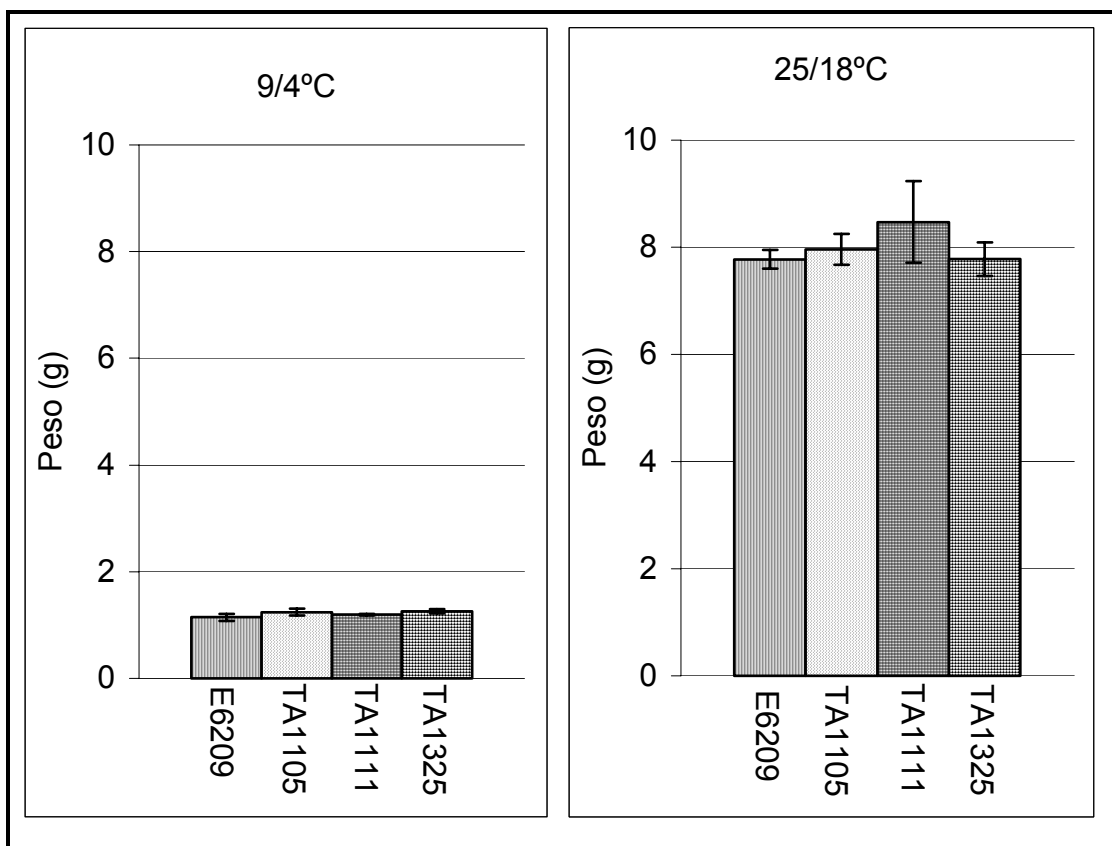


FIGURA 9. Peso seco en tres NILs de tomate (TA1105, TA1111 y TA1325) y un control isogénico (E6203), en dos regímenes de temperatura (9/4° y 25/18°C, día/noche) y tres tiempos de medición (día 0, 10 y 20).

Otro motivo puede ser la relativamente baja varianza fenotípica que explican los QTL (valores de  $R^2$  menores a 10%) en ensayos realizados por OYANEDEL (2000) y OYANEDEL *et al.* (2000). Alternativamente los QTL analizados podrían no incidir directamente sobre las características estudiadas o bien que la resistencia se expresa en etapas fenológicas anteriores o posteriores a las estudiadas. Por ejemplo BLOOM *et al.* (1998), al analizar los efectos de las bajas temperaturas sobre la accesión *L. hirsutum* LA1778 en función de la absorción de amonio y nitrato, encontraron que las líneas con una introgresión derivada de *L. hirsutum* tenían mayores tasas de acumulación de estos nutrientes ante temperaturas de enfriamiento durante el estado juvenil de las plantas.

También pudo existir una posible expresión epistática, provocada por los QTL en estudio y que afectaron los parámetros fenotípicos evaluados, no permitiendo que se expresaran ante las condiciones de frío, fenómeno que ha sido reportado con anterioridad en tomate en función de factores genéticos de crecimiento por VALLEJOS y TANKSLEY (1983) y FOOLAD *et al.* (1998). Por último, el tamaño muestral fue muy pequeño para encontrar diferencias asociadas a las líneas. En la presente investigación repetición fue el conjunto de plantas dispuestas a las mismas temperaturas y el mismo tiempo. Por lo tanto, para futuros estudios se propone verificar la pureza de la semilla, controlando efectivamente los cruzamientos durante el período de propagación y evaluando las semillas con técnicas moleculares; realizar estudios en los QTL en varias etapas fenológicas como germinación y floración, entre otras, y otros parámetros de crecimiento; estudiar posibles interacciones epistáticas entre los QTL, y finalmente aumentar el número de repeticiones.

## 5. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de este taller no se pudo determinar con claridad el grado de resistencia al frío en las tres poblaciones de NILs evaluadas.

La exposición a bajas temperaturas tiene un gran efecto sobre la acumulación de ácido abscísico en el tejido foliar, lo que se intensifica considerablemente a medida que se prolonga el período de exposición a estas condiciones. Sin embargo, en ausencia de frío la concentración se mantiene casi constante en el tiempo. Este comportamiento se repitió en todas las líneas evaluadas.

Los parámetros vegetativos de área foliar, índice del plastocrón y peso seco evidencian un mayor crecimiento de la parte aérea de las planta ante condiciones cálidas. Ante un ambiente frío, las plantas continúan creciendo, pero a niveles muy inferiores que el tratamiento a temperaturas óptimas. El efecto de los QTL presentes en las NILs no pudo establecerse, ya que el comportamiento entre líneas fue similar.

## 6. RESUMEN

El tomate es una hortaliza que debido a su origen cálido ve afectada su producción en ambientes fríos. El estrés por enfriamiento provoca una disminución de la biosíntesis y asimilación de compuestos, lo que puede detener su crecimiento. Nuevas líneas con introgresiones de una especie con hábitos altitudianles como *L. hirsutum*, han demostrado ser menos susceptibles al frío, oportunidad para obtener una material genético tolerante a este ambiente.

Se evaluó la tolerancia a bajas temperaturas en tres líneas casi isogénicas (NILs) derivadas de introgresiones del tomate silvestre *L. hirsutum*. Se utilizaron las líneas TA1105, con una introgresión en el cromosoma 2; TA1111, con una introgresión en el cromosoma 3, y TA1325, con una introgresión en el cromosoma 9, y un control correspondiente al tomate cultivado (E6203). Las plantas estuvieron en aclimatación durante una semana a 25/18°C (día/noche). Luego fueron sometidas a dos regímenes de temperatura de 25/18 y 9/4°C (día/noche) por 20 días. A los días 0, 10 y 20 de comenzada la exposición se midió el contenido endógeno de ABA en las hojas, el índice del plastocrón (IP) y área foliar (AF). Al final del ensayo se midió el peso seco de la parte aérea (PS).

Los resultados no permitieron comprobar la tolerancia al frío en las líneas con introgresiones. Las plantas expuestas a 9/4°C, aumentaron casi tres veces su concentración de ABA en el transcurso del tiempo y fueron dos veces mayores que en condiciones óptimas, donde los valores se mantuvieron casi constantes. Los valores de AF, IP y PS fueron mayores en las líneas bajo condiciones cálidas en relación a las de estrés por frío.

VEGETATIVE GROWTH AND ABA ASSESSMENT IN TOMATO PLANTS UNDER  
CHILLING STRESS

7. ABSTRACT

Tomato plants are sensitive to cold temperatures because of their warm-habitat origin. Chilling stress causes a reduction of biosynthesis and compound assimilation which can delay growth. New lines, with introgressions from (*L. hirsutum*) from high-altitude habitats, have been demonstrated to be less susceptible to cold, thus giving an opportunity for the creation of chilling tolerant genetic material.

Three nearly isogenic lines (NILs) obtained from the wild tomato (*L. hirsutum*) were evaluated for cold tolerance. The lines used in this experiment were: TA1105, with an introgression on chromosome 2; TA1111 with an introgression on chromosome 3; and TA1325 with an introgression on chromosome 9, and also a control using the recurrent parent, the cultivated tomato (E6203). The plants were acclimated for one week at 25/18°C (day/night). They were then submitted to two temperature regimes, 25/18°C or 9/4°C (day/night) for twenty days. At 0, 10 and 20 days, measurements were taken for the endogenous ABA concentration in the leaves, the plastochron index, and leaf area. At the end of the experiment, the dry weight of the above-ground parts was also measured.

No significant differences were found among the genetic lines for the parameters studied. The plants exposed to 9/4°C regime almost tripled their ABA concentrations over time and were twice as high as those under optimal temperature conditions, which remained almost constant. The values for leaf area, plastochron index, and dry weight were greater for plants under warm conditions than under chilling-stress.

## 7. LITERATURA CITADA

- ALVES, A. y SETTER T. 2000. Response of cassava to water deficit: leaf growth and abscisic acid. *Crop Science* 40: 131-137.
- BERNACCI, D y TANKSLEY, S. D. 1997. An interespecific backcross of *Lycopersicon esculentum* X *L. hirsutum*: linkage analysis and QTL study of sexual compatibility factors and floral traits. *Genetics* 147: 861-877.
- BLOOM, A. J.; RANDALL, L. B.; MEYERHOF, P. A, and ST CLAIR, D. A. 1998. The chilling sensitivity of root ammonium influx in a cultivated and wild tomato. *Plant, Cell and Environment* 21: 191-199.
- BLUM, A. y SULLIVAN, C. Y. 1997. The effect of plant size on wheat response to agents of drought stress. I. Root drying. *Aust. J. Plant Physiol.*, 24: 35-41
- CHANDLER, P. and ROBERTSON, M. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 113-141.
- CIARDI, J. DEIKMAN, J. and ORZOLEK, D. 1997. Increase ethylene synthesis enhances chilling tolerance in tomato. *Physiologia Plantarum* 101: 333-340.
- CORPORACIÓN DE FOMENTO DE LA PRODUCCIÓN. 1986. Monografías hortícolas: tomate, arveja, brócoli y zanahoria. Santiago, CORFO 99 p.
- DAIE, J. and CAMPBELL, W. F. 1981. Response of tomato plants to stressful temperatures. *Plant Physiology* 67: 26-29.
- ESCALONA, C. 2003. Evaluación del contenido endógeno de ABA (ácido abscísico) y parámetros vegetativos en líneas de tomate con resistencia al frío. Taller de Licenciatura. Ing. Agr. Quillota, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 49 p.

- ESQUINAS-ALCAZAR, J. y NUEZ VIÑALS, F. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. In: Nuez Viñals, F. ed. El cultivo del tomate. Madrid, Mundi-Prensa. pp 15-43.
- FEHR, W. 1991. Principles of cultivar development. New York, Macmillan Publishing. 536 p.
- FERNANDEZ-MUÑOZ, J; GONZALEZ-FERNANDEZ, J. and CUARTERO, J. 1995. Variability of pollen tolerance to low temperatures in tomato and related wild species. *Journal of Horticultural Science* 70: 41-49.
- FOOLAD, M. R.; CHEN, F. Q and LIN, G. Y. 1998. RFLP mapping of QTLs conferring cold tolerance during seed germination in an interespecific cross of tomato. *Molecular Breeding* 4: 519-529.
- FOOLAD, M. R. and LIN, G. Y. 2001. Genetic analysis of cold tolerance during vegetative growth in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Euphytica* 122: 105-11.
- GOODSTAL, F.J; KOHLER, G.R; RANDALL, L.B; BLOOM, A.J and ST.CLAIR, D.A. 2005. A major QTL introgressed from wild *Lycopersicon hirsutum* confers chilling tolerance to cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Theoretical and Applied Genetics* 111: 898-905.
- KINET, J.M and PEET 1997. Tomato. In: Wien H.C. ed. The physiology of vegetable crops. CABI International. pp 207-259.
- KRATSCH, H. A. and WISE, R. R. 2000. The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell and Environment* 23: 337-350.
- LAMOREAUX, R; CHANEY, W and BROWN, K. 1978. The plastochron index: a review after two decades of use. *American Journal of Botany* 65: 586-593.
- LARCHER, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Berlin, Springer-Verlag. 506 p.
- MAROTO, J.V. 1994. *Horticultura herbácea especial*. Cuarta edición. Madrid, Mundi-Prensa. 611 p.

- MILTAU, O.; ZAMIR, D. and RUDICH, J. 1985. Growth rates of *Lycopersicon* species at low temperature. *Z. Pflanzzüchtg* 96: 193-199.
- MONFORTE, A. J. and TANKSLEY, S. D. 2000. Fine mapping of a quantitative trait locus (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome 1 affecting characteristics and agronomic traits: breaking linkage among QTLs affecting different traits and dissection of heterosis for yield. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 471-479.
- ÖSQUIST, G. 1983. Effects of low temperature on photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 6: 281-300.
- OYANEDEL, E.; WOLFE, D.W.; OWENS, T.G.; MONFORTE, A.J. and TANKSLEY, S.D. 2000. Quantitative trait loci analysis of photoinhibition under chilling stress in tomato. *Acta Horticulturae* 521: 227-232.
- OYANEDEL, E. 2000. Quantitative trait loci analysis of chilling tolerance in tomato. PhD thesis. New York, Cornell University, Faculty of graduate School. 140 p.
- PATTERSON, D and PAYNE, L. 1983. Screening for chilling resistance in tomato seedlings. *HortScience* 18: 340-341.
- PEÑA-CORTES, H.; SANCHEZ-SERRANO, J. J.; MERTENS, R. and WILLMITZER, L. 1989. Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II genes in potato and tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 9851-9855.
- RAISON, J.K. and BROWN, M.A. 1989. Sensitivity of altitudinal ecotypes of the wild tomato *Lycopersicon esculentum* to chilling injury. *Plant Physiology* 91: 1471-1475.
- RODRIGUEZ, R. RODRIGUEZ, J. y MEDINA, J. 1984. Cultivo moderno del tomate. Segunda edición. Madrid, Mundi Prensa. 255 p.
- SWARTZ, D. and KLARING, H. 2001. Allometry to estimate leaf area of tomato. *Journal of Plant Nutrition* 24:1291-1309.

- TADEO, F. 2000. Fisiología de las plantas y el estrés. In: Azcón-Bieto y Talón, F. ed. Fundamentos de fisiología vegetal. Barcelona, Mc Graw-Hill. pp. 481-490.
- VALLEJOS, C.E and TANKSLEY, S. D. 1983. Segregation of isozyme markers and cold tolerance in interspecific backcross of tomato. Theoretical and Applied Genetics 66: 241-247.
- VALLEJOS, C.E; LYONS, J.M , BREIDENBACH R.W. and MILLER, M.F. 1983. Characterization of a differential low-temperature growth response in two species of *Lycopersicon*: the plastochron as a tool. Planta 159: 487-496.
- VERNIERI, P.; PARDOSSI, A. and TOGNONI, F. 1989. Chilling-induced water stress in tomato: effect on the abscisic acid accumulation. Advanced Horticultural Science 3: 78-80.
- VENEMA, J. H., POSTHUMUS, F.; de VRIES, M. and van HASSELT, P. 1999. Differential response of domestic and wild *Lycopersicon* species to chilling under low light: growth, carbohydrate content, photosynthesis and the xanthophyll cycle. Physiologia Plantarum 105: 81-88.
- WALKER-SIMMONS, M. F; ROSE, P. A.; HOGGE, L.. R and ABRAMS, S. R. 2000. ABA inmunoassay and gas chromatography/mass spectrometry verification. In: Tucker G.A. and Roberts J.A. ed. Plant Hormones Protocols. Nottingham, Humana Press . pp 33-49.
- WALKER, M. A.; MCKERSIE, B. D. and PAULS, K. P. 1991. Effects of chilling on the biochemical and functional properties of thylacoid membranes. Plant Physiology 97: 663-669.
- WOLF, S.; YAKIR, D.; STEVENS, M. A. and RUDICH, J. 1986. Cold temperature tolerance of wild tomato species. Journal American Society Horticultural Science 11: 960-964.
- WOLFE, D. 1991. Low temperature effects on early vegetative growth, leaf gas exchange and chilling tolerant crops species. Annals of Botany 67: 205-209.

- ZACARÍAS, L y LAFUENTE, M.. 2000. Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. In: Azcón-Bieto y Talón, F. ed. Fundamentos de fisiología vegetal. Barcelona, Mc Graw-Hill. pp 481-490.
- ZAMSKI, E y SHAFFER, A. 1996. Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships. New York, Marcel Dekker. 261 p.