

DEVELOPMENT OF A REGENERATION AND GENETIC TRANSFORMATION PROTOCOL FOR TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rutgers

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE REGENERACIÓN Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA PARA TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rutgers

Verónica A. Ochoa-Jiménez¹, Guillermo Berumen-Varela³, Marisela Rivera-Domínguez², Reginaldo Báez-Sañudo¹, Rosalba Troncoso-Rojas¹, Martín E. Tiznado-Hernández^{1*}

¹Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria Km 0.6 83304, Hermosillo, Sonora, México. (tiznado@ciad.mx). ²Coordinación de Ciencia de los Alimentos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria Km 0.6 83304, Hermosillo, Sonora, México. ³Unidad de Tecnología de Alimentos-Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura S/N. 63155. Tepic, Nayarit, México.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is important in genetic engineering because it is a model for fruit postharvest studies. A requirement for genetic transformation is a protocol to carry out the organogenesis of transformed explants. However, current protocols of tomato organogenesis are slow, expensive and time demanding. The objective of this study was to develop an easy organogenesis protocol for tomato cv. Rutgers. The hypothesis was that the organogenesis of tomato using hypocotyl in combination with an appropriate media and transformation method, reduces the regeneration time to obtain full developed transgenic plants. The experimental design included the evaluation of the efficiency of five different regeneration media and tested in two types of explant. Organogenesis response of callus, root and shoot tissues were measured in all treatments. Tomato explants were genetically transformed by *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 infection and biolistic gun at helium pressure of 1200 psi (8.27 MPa), with 900 psi (6.20 MPa) shoot pressure as well as 6 and 9 cm of shooting distance using the vector pBI₁₂₁. The optimal treatment was the utilization of 9 cm distance along with the other parameters. Integration of the binary vector was confirmed by PCR amplification of the *npt-II* gene and histochemical GUS staining. The highest percentage (41.6%) of tomato plants regeneration was found in the AGK-1 medium: MS 4.3 g L⁻¹ salt, 30 g L⁻¹ sucrose, 0.5 mg mL⁻¹ IAA, 0.5 mg mL⁻¹ kinetin, 0.1 mg mL⁻¹ thiamine and 8 g L⁻¹ gelrite, tested in hypocotyl explant. In this medium, shoots and roots were developed at the same time. We obtained a large percentage of complete tomato transgenic plants by direct organogenesis from hypocotyls in 10 weeks, which is a

RESUMEN

En ingeniería genética, el tomate (jitomate) (*Solanum lycopersicum*) es un modelo importante para estudios poscosecha de frutos. Las transformaciones genéticas requieren protocolos para la organogénesis de los explantes transformados. Sin embargo, los protocolos actuales para la organogénesis del tomate son lentos, costosos y toman mucho tiempo. El objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo sencillo para la organogénesis del tomate cv. Rutgers. La hipótesis fue que la organogénesis del tomate a partir del hipocótilo, junto con un medio y método de transformación adecuados, disminuye el tiempo de regeneración necesario para obtener plantas transgénicas desarrolladas por completo. El diseño experimental incluyó la evaluación de la eficiencia de cinco medios de regeneración diferentes probados con dos tipos de explantes. La respuesta de la organogénesis del tejido calloso, de raíz y tallo se evaluó en todos los tratamientos. La transformación genética de los explantes de tomate se realizó mediante la infección con la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Además, se utilizó un equipo para introducir nanopartículas con vectores genéticos (pBI₁₂₁ en este caso) en la célula vegetal (biobalística), por medio de helio a presión de 8.27 MPa (1200 psi), una presión de eyección de 6.20 MPa (900 libras) y una distancia de disparo de 6 y 9 cm. El tratamiento óptimo se obtuvo con la distancia de 9 cm junto con otros parámetros. La integración del vector binario se confirmó mediante la amplificación por PCR del gen *npt-II* y la tinción histoquímica GUS. El porcentaje más alto (41.6%) de regeneración de plantas de tomate se encontró en el medio AGK-1: 4.3 g L⁻¹ de sales MS, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.5 mg mL⁻¹ de AIA, 0.5 mg mL⁻¹ de kinetina, 0.1 mg mL⁻¹ de tiamina y 8 g L⁻¹ de gelrita, evaluado en explantes de hipocótilo. En este medio, tallos y raíces se desarrollaron al mismo tiempo. Con la organogénesis directa a partir del hipocótilo obtuvimos un alto porcentaje de plantas de tomate transgénicas completas en 10 semanas, un tiempo

* Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: January, 2018. Approved: March, 2019.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 53: 725-740. 2019.

rather short time as compared with previous tomato organogenesis protocols. These results will be useful for genetic transformations experiments to obtain stable transgenic tomato lines.

Key words: *Solanum lycopersicum*, hypocotyl, organogenesis, biolistic, *Agrobacterium tumefaciens*, transgenic tomato plants.

INTRODUCTION

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most important worldwide crop species due to its commercial value and it consumed both fresh and in many processed products. Tomato is a good model to carry out experiments with DNA recombinant technology (Wing *et al.*, 1994) in particular for research evaluating the genetic alteration effects on the fruit postharvest development and physiology. Although there are several protocols to develop tomato plants by organogenesis available, an efficient protocol for cv. Rutgers is still lacking.

The most important parameters for tomato plant organogenesis protocol are the cultivar as well as the concentration and type of growth regulators used (Gubis *et al.*, 2003; Praveen and Rama, 2011). Moreover, there are other factors, such as explant and environmental conditions (Bhatia *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012). Protocols for *in vitro* regeneration of tomato plants were developed from different explants through organogenesis (Gerszberg *et al.*, 2015), including leaf (Oktem *et al.*, 1999) and cotyledon (Van Roekel *et al.*, 1993) 1993 explants. Besides, Pozueta-Romero *et al.* (2001) regenerated shoots of three tomato cultivars from hypocotyls after eliminating the primary and axillary meristems. Jabeen *et al.* (2005) reported different regeneration capacity depending on the type of cultivar and explant, and up to 80% of shoot formation by using shoot tips; furthermore, the shoot developed into a plant required a long time and utilization of several media. Gubiš *et al.* (2004) developed a tomato regeneration protocol by modifying the concentrations of zeatin and indole-3-acetic acid, in which shoot formation required at least 45 days. Besides, most of the protocols available for tomato regeneration are specific for tomato cv. Micro-Tom (Sun *et al.*, 2006; Cruz-Mendivil *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2012; Chetty *et al.*, 2013). To our knowledge, there is only one published report in which the *in vitro* regeneration of cv. Rutgers was carried out (Lech *et al.*, 1996).

relativamente corto en comparación con protocolos anteriores para la organogénesis en tomate. Estos resultados serán útiles en los experimentos de transformación genética para obtener líneas estables de tomates transgénicos.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, hipocótilo, organogénesis, biobalística, *Agrobacterium tumefaciens*, plantas transgénicas de tomate.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial debido a su valor comercial; se consume fresco y en diversos productos procesados. El tomate es un buen modelo para realizar experimentos con tecnología de ADN recombinante (Wing *et al.*, 1994), en particular para evaluar los efectos de la alteración genética en el desarrollo y fisiología poscosecha del fruto. Aunque existen diversos protocolos para desarrollar plantas de tomate mediante organogénesis, aún no se ha desarrollado un protocolo eficiente para el cv. Rutgers. Los parámetros más importantes para un protocolo de organogénesis en plantas de tomate son el cultivar, la concentración y el tipo de reguladores de crecimiento empleados (Gubis *et al.*, 2003; Praveen y Rama, 2011). Además, existen otros factores, como el tipo de explante y las condiciones ambientales (Bhatia *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012). Existen protocolos para la regeneración *in vitro* de tomate a través de organogénesis a partir de diferentes explantes (Gerszberg *et al.*, 2015), foliares (Oktem *et al.*, 1999) y cotiledonales (Van Roekel *et al.*, 1993). Aunado a esto, Pozueta-Romero *et al.* (2001) regeneraron tallos de tres cultivares de tomate a partir de hipocótilos después de eliminar los meristemos primarios y axilares. Jabeen *et al.* (2005) reportaron capacidad de regeneración diferente dependiendo del tipo de cultivar y explante, y una formación de tallos de hasta un 80% al utilizar yemas apicales; asimismo, el desarrollo de una planta a partir del tallo requirió de un periodo largo de tiempo y del uso de medios diversos. Gubiš *et al.* (2004) desarrollaron un protocolo de regeneración de tomate al modificar las concentraciones de zeatina y ácido 3-indolacético, en este protocolo la formación del tallo tardó al menos 45 días. Además, la mayoría de los protocolos disponibles para la regeneración del tomate son específicos para el tomate cv. Micro-Tom

Tomato is one of the most studied vegetables, but the lack of an efficient organogenesis protocol for tomato plants is a major problem to create stable transgenic tomato lines using T-DNA insertional mutagenesis, such as that for *Arabidopsis thaliana* (Herrera-Estrella *et al.*, 2004). Creation of transgenic plants is the only scientifically accepted methodology to prove the function of a protein encoded by a gene found by *in silico* analysis.

The most common methods used for efficient transformation in tomato are *Agrobacterium tumefaciens* and biolistic gene gun. In this regard, the development of a fast and easy protocol for tomato organogenesis and genetic transformation will help to boost scientific research using tomato transgenic plants. Based on the above, the objective of this investigation was to test five different media on hypocotyl and cotyledons explants to develop an efficient, novel, fast and inexpensive tomato organogenesis protocol to create transgenic tomato plants cv. 'Rutgers'. The hypothesis states that it is possible to carry out the organogenesis of isogenic and transgenic tomato plants from hypocotyl tissue by using media including plant hormones.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Cotyledons and hypocotyls of tomato cv. Rutgers (*S. lycopersicum* L.) were used as a source of explants in this research. The seeds were disinfected by three methods: 1) Commercial bleach solution (NaClO) at 2% for 10 min followed by three washes with sterile distilled water for 2 min each and drying with sterile filter paper; 2) ethanol solution at 70% for 2 min followed by NaClO at 2% for 8 min and two washes with sterile distilled water for 2 min each, and 3) ethanol solution at 70% for 2 min followed by NaClO at 2% for 10 min and three washes with sterile water for 2 min each and drying with sterile filter paper. For each method, a total of 10 magenta boxes with 12 seeds per magenta were used.

Germination media

The seeds were sown in magenta boxes containing three germination media: 1) ½MS medium, which contains the basal mixture of Murashige and Skoog 2.15 g L⁻¹ salts, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 2 mg L⁻¹ thiamine, 0.5 mg L⁻¹ pyridoxine, 0.5 mg L⁻¹ nicotinic acid, 10 g L⁻¹ sucrose and 8 g L⁻¹ gelrite (Frery and Van-Eck, 2004); 2) KCMS medium, which contains basal

(Sun *et al.*, 2006; Cruz- Mendivil *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2012; Chetty *et al.*, 2013). Hasta donde sabemos, solo existe un reporte publicado de la regeneración *in vitro* del cv. Rutgers (Lech *et al.*, 1996).

El tomate es uno de los vegetales más estudiados, pero la falta de un protocolo de organogénesis eficiente para las plantas de tomate es un problema importante en la creación de líneas estables de tomates transgénicos mediante mutagénesis por inserción de ADN-T, como es el caso de *Arabidopsis thaliana* (Herrera-Estrella *et al.*, 2004). La creación de plantas transgénicas es la única metodología científicamente aceptada para demostrar la función de una proteína codificada por un gen encontrado mediante análisis *in silico*.

Los métodos más comúnmente utilizados para la transformación eficiente del tomate son infección por *Agrobacterium tumefaciens* y biobalística. Por eso, el desarrollo de un protocolo rápido y sencillo para la organogénesis y transformación genética del tomate impulsará la investigación científica con plantas de tomate transgénicas. Con base en los anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar cinco medios diferentes en explantes de hipocótilo y cotiledón para desarrollar un protocolo eficiente, novedoso, rápido y económico para la organogénesis del tomate y así crear plantas de tomate transgénicas cv. 'Rutgers'. La hipótesis establece que es posible realizar la organogénesis de plantas de tomate isogénicas y transgénicas a partir del tejido del hipocótilo con el uso de medios con hormonas vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Cotiledones e hipocótilos de tomate cv. Rutgers (*S. lycopersicum* L.) se usaron en esta investigación para obtener explantes. Las semillas se desinfectaron con tres métodos: 1) Solución de cloro comercial (NaClO) al 2% durante 10 min seguido de tres lavados con agua destilada estéril durante 2 min cada uno y secado con papel filtro estéril; 2) solución de etanol al 70% durante 2 min seguida de cloro comercial al 2% durante 8 min y dos lavados con agua destilada estéril durante 2 min cada uno, y 3) solución de etanol al 70% durante 2 min seguida de cloro comercial al 2% durante 10 min y tres lavados con agua estéril durante 2 min cada uno y secado con un papel filtro estéril. Para cada método, se utilizó un total de 10 cajas magenta con 12 semillas por caja.

mixture of MS 4.3 g L⁻¹ salts, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 200 mg L⁻¹ potassium phosphate monobasic, 1 mg L⁻¹ thiamine, 1 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1 mg L⁻¹ kinetin, 30 g L⁻¹ sucrose and 5.2 g L⁻¹ gelrite (Frery and Van-Eck, 2004); and 3) MS1X-NT1 medium, which contains basal mixture of MS 4.3 g L⁻¹ salts, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 2 mg L⁻¹ thiamine, 0.2 mg L⁻¹ 2,4-D, 180 mg L⁻¹ potassium phosphate monobasic, 30 g L⁻¹ sucrose and 8 g L⁻¹ gelrite.

The last media is a modification of the NT1 media reported by (Frery and Van-Eck, 2004), with the addition of the 2,4 D in this work.

The pH of all media was adjusted to 5.8 with KOH 0.1 N and autoclaved. The seeds were grown in a chamber at 25 °C with a photoperiod of 16:8 light:dark. Hypocotyls with the size of 10 cm and cotyledons explants of all media from 7-8 d old tomato seedlings growing *in vitro* were aseptically removed.

Organogenesis culture media

We developed media AGK-1 to evaluate the morphogenic response and compare it with four media, as shown below:

BIK Medium: Basal mixture of MS 4.3 g L⁻¹ salts, 30 g L⁻¹ sucrose, 8 g L⁻¹ gelrite, 1 mg L⁻¹ indol-3-acetic acid (IAA), 4 mg L⁻¹ kinetin and 5 mg L⁻¹ benzyl aminopurine, as reported by Cortina and Culiáñez-Macià (2004) with the modification of kinetin addition.

2Z Medium: Basal mixture of MS 4.3 g L⁻¹ salts, 20 g L⁻¹ sucrose, 5.2 g L⁻¹ gelrite, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 2 mg L⁻¹ zeatin and mixture of Nitsch vitamins (0.5 mg mL⁻¹ thiamine HCl, 2 mg mL⁻¹ glycine, 5 mg mL⁻¹ nicotinic acid, 0.5 mg mL⁻¹ pyridoxine HCl, 0.5 mg mL⁻¹ folic acid, 0.05 mg mL⁻¹ biotin and 10 mg mL⁻¹ myo-inositol) (Frery and Van-Eck, 2004).

RM1-Z Medium: Basal mixture of MS 4.3 g L⁻¹ salts, 30 g L⁻¹ sucrose, 8 g L⁻¹ gelrite, 0.5 mg L⁻¹ IAA, 0.5 mg L⁻¹ zeatin and 0.1 mg L⁻¹ thiamine (Cortina and Culiáñez-Macià, 2004).

RM1-Dr Medium: Basal mixture of MS 4.3 g L⁻¹ salts, 30 g L⁻¹ sucrose, 8 g L⁻¹ gelrite, 0.5 mg L⁻¹ IAA, 0.5 mg L⁻¹ zeatin and mixture of Nitsch vitamins (0.5 mg mL⁻¹ thiamine HCl, 2 mg mL⁻¹ glycine, 5 mg mL⁻¹ nicotinic acid, 0.5 mg mL⁻¹ pyridoxine HCl, 0.5 mg mL⁻¹ folic acid, 0.05 mg mL⁻¹ biotin and 10 mg mL⁻¹ myo-inositol), as reported by Cortina and Culiáñez-Macià (2004) with the modification of Nitsch vitamins addition.

AGK-1 Medium: Basal mixture of MS 4.3 g L⁻¹ salts, 30 g L⁻¹ sucrose, 8 g L⁻¹ gelrite, 0.5 mg L⁻¹ IAA, 0.5 mg L⁻¹ kinetin and 0.1 mg L⁻¹ thiamine HCl.

The pH of all media was adjusted to 5.8 with 0.1 N KOH prior to autoclaving.

Medios para germinación

Las semillas se sembraron en cajas magenta con tres medios de germinación: 1) Medio ½MS, que contiene la mezcla basal de 2.15 g L⁻¹ de sales de Murashige y Skoog, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 2 mg L⁻¹ de tiamina, 0.5 mg L⁻¹ de piridoxina, 0.5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 10 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de gelrita (Frery y Van-Eck, 2004); 2) medio KCMS, que contiene la mezcla basal de 4.3 g L⁻¹ de sales de Murashige y Skoog, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 200 mg L⁻¹ de fosfato de potasio monobásico, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 1 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), 1 mg L⁻¹ de kinetina, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 5.2 g L⁻¹ de gelrita (Frery y Van-Eck, 2004); y 3) medio MS1X-NT1, que contiene la mezcla basal de 4.3 g L⁻¹ de sales de Murashige y Skoog, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 2 mg L⁻¹ de tiamina, 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 180 mg L⁻¹ de fosfato de potasio monobásico, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de gelrita.

El último medio es la modificación para esta investigación, del medio NT1 reportado por (Frery y Van-Eck, 2004), con la adición de 2,4 D.

El pH de todos los medios se ajustó a 5.8 con KOH 0.1 N y se esterilizaron en autoclave. Las semillas crecieron en una cámara a 25 °C con un fotoperiodo de 16:8 horas luz: oscuridad. Hipocótilos de 10 cm y los explantes cotiledonales de plántulas de tomate de 7-8 d de edad cultivadas *in vitro* se retiraron de manera aseptica de todos los medios.

Medios para organogénesis

Desarrollamos el medio AGK-1 para evaluar la respuesta morfogénica y compararla con los cuatro medios descritos a continuación:

Medio BIK: Mezcla basal de 4.3 g L⁻¹ de sales de Murashige-Skoog, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de gelrita, 1 mg L⁻¹ de ácido 3-indolacético (AIA), 4 mg L⁻¹ de kinetina y 5 mg L⁻¹ de bencilaminopurina, de acuerdo a lo reportado por Cortina y Culiáñez-Macià (2004) modificado con la adición de kinetina.

Medio 2Z: Mezcla basal de 4.3 g L⁻¹ sales de Murashige-Skoog, 20 g L⁻¹ de sacarosa, 5.2 g L⁻¹ de gelrita, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 2 mg L⁻¹ de zeatina y mezcla de vitaminas de Nitsch (0.5 mg mL⁻¹ de clorhidrato de tiamina, 2 mg mL⁻¹ de glicina, 5 mg mL⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg mL⁻¹ de clorhidrato de piridoxina, 0.5 mg mL⁻¹ de ácido fólico, 0.05 mg mL⁻¹ de biotina y 10 mg mL⁻¹ de myo-inositol) (Frery y Van-Eck, 2004).

Medio RM1-Z: Mezcla basal de 4.3 g L⁻¹ sales de Murashige-Skoog, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de gelrita, 0.5 mg L⁻¹ de AIA, 0.5 mg L⁻¹ de zeatina y 0.1 mg L⁻¹ de tiamina (Cortina y Culiáñez-Macià, 2004).

The efficiency of each media was tested with five petri dishes containing 12 explants per plate of both types, which were incubated in a growth chamber at 25 °C with a photoperiod of 16:8 light:dark. Every two weeks, explants were placed in a fresh medium. After observing a clear morphogenic response in each culture media (shoot and root induction), the *callus* tissue was aseptically removed in cases in which tissue was present. Thereafter, hypocotyls showing the development of shoots and roots were transferred without media to magenta boxes until the development of shoot, leaves and roots.

Once the best disinfection, germination and organogenesis media was found, the genetic transformation by biolistic and *Agrobacterium* infection started.

Biolistic transformation

Hypocotyls from 7-8 days old tomato plantlets cv. 'Rutgers' were dissected, placed on an osmotic medium with sterile filter papers (18 mg L⁻¹ mannitol and 18 g L⁻¹ sorbitol) and incubated at 25 °C for 16 h. Gold particles were prepared and coated with plasmid pBI₁₂₁ following the recommendations of the manufacturer (BioRad Laboratories, CA, USA). The particle bombardment containing plasmid pBI₁₂₁ binary vector in which the β -glucuronidase (GUS) gene reporter is transcriptionally controlled by CaMV35S promoter was performed on a Helium-driven particle gun PDS-1000/He Du Pont Biolistics Microparticle Acceleration System (BioRad Laboratories). All bombardments were carried out using the following conditions: helium pressure of 1200 pounds per square inch (8.27 MPa), shoot pressure of 900 psi (6.20 MPa), six and nine cm of distance and a vacuum of 25 Hg in. Each shot contained a DNA concentration of 1.66 μ g and 125 μ g of gold nanoparticles (0.73 μ m). Following bombardment, explants were incubated for 48 h at 25 °C and subsequently placed on AGK-1, which was found to be the best organogenesis media, supplemented with kanamycin. Explants were grown under a photoperiod of 16:8 light:dark conditions.

Agrobacterium tumefaciens transformation

Agrobacterium tumefaciens infection was carried out with the strain GV3101 harboring the pBI₁₂₁ binary vector. Hypocotyls from tomato plants cv. Rutgers were excised from 8-10 d old tomato seedlings, following by immersion of *A. tumefaciens* suspension during 20 min. Subsequently, the hypocotyls explants were placed in a co-cultivation medium (AGK-1 Medium: Basal mixture of MS 4.3 g L⁻¹ salts, 30 g L⁻¹ sucrose, 8 g L⁻¹ gelrite, 0.5 mg L⁻¹ IAA, 0.5 mg L⁻¹ kinetin and 0.1 mg L⁻¹ thiamine HCl) during 3 d. After that time, the explants were transferred on AGK-1 fresh medium including 100 mg mL⁻¹ kanamycin as

Medio RM1-Dr: Mezcla basal de 4.3 g L⁻¹ sales de Murashige-Skoog, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de gelrita, 0.5 mg L⁻¹ de AIA, 0.5 mg L⁻¹ de zeatina y una mezcla de vitamina de Nitsch (0.5 mg mL⁻¹ de clorhidrato de tiamina, 2 mg mL⁻¹ de glicina, 5 mg mL⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg mL⁻¹ de clorhidrato de piridoxina, 0.5 mg mL⁻¹ de ácido fólico, 0.05 mg mL⁻¹ de biotina y 10 mg mL⁻¹ de myo-inositol), conforme a lo reportado por Cortina y Culiáñez-Macià (2004) con la adición de las vitaminas de Nitsch.

Medio AGK-1: Mezcla basal de 4.3 g L⁻¹ sales de MS, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de gelrita, 0.5 mg L⁻¹ de AIA, 0.5 mg L⁻¹ de kinetina y 0.1 mg L⁻¹ de clorhidrato de tiamina.

Antes de esterilizar el medio en autoclave, el pH de todos los medios se ajustó a 5.8 con KOH 0.1 N.

La eficiencia de los medios de cultivo se evaluó con cinco cajas de Petri que contenían 12 explantes de ambos tipos por caja, los cuales se incubaron en una cámara de crecimiento a 25 °C con un fotoperiodo de 16:8 horas luz: oscuridad. Cada dos semanas, los explantes se cambiaron a un medio nuevo. Después de observar una respuesta morfogénica evidente en cada medio de cultivo (brotes de tallo y raíz), retiramos asépticamente el tejido calloso (no diferenciado) cuando estuvo presente. Después, los hipocótilos con desarrollo de tallos y raíces se transfirieron sin el medio a cajas magenta hasta observar el desarrollo del tallo, hojas y raíces.

Una vez que determinamos el mejor método de desinfección y los mejores medios para la germinación y organogénesis, procedimos a iniciar la transformación mediante biobalística e infección por *Agrobacterium*.

Transformación mediante biobalística

Los hipocótilos de plántulas de tomate cv. 'Rutgers' de 7-8 d de edad se disectaron, colocaron en un medio osmótico con papel filtro estéril (18 mg L⁻¹ de manitol y 18 g L⁻¹ de sorbitol), e incubaron a 25 °C durante 16 h. Preparamos las partículas de oro y las recubrimos con el plásmido pBI₁₂₁ siguiendo las recomendaciones del fabricante (BioRad Laboratories, CA, EE. UU.). El bombardeo de partículas con el vector binario pBI₁₂₁, en el cual el promotor CaMV35S controla la transcripción del gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS), se realizó con una pistola de genes a base de helio PDS-1000/He registrada como "Sistema biobalístico de Aceleración de Micropartículas" de Du Pont (BioRad Laboratories). Los bombardeos se realizaron bajo las siguientes condiciones: presión de helio de 1200 libras por pulgada cuadrada, una presión de disparo de 900 libras por pulgada cuadrada, seis y nueve cm de distancia y un vacío de 25 pulgadas de mercurio. Cada disparo contenía una concentración de ADN de 1.66 μ g y 125 μ g de nanopartículas de oro

a selectable marker and 250 mg mL⁻¹ ticarcillin-cefotaxime to eliminate the *A. tumefaciens*.

For both transformation methods, kanamycin resistant plants were selected. Also, the integration of the vector in the genome of tomato plants generation T₀ was demonstrated by β -glucuronidase histochemical assay and amplification of the *npt-II* gene by PCR.

PCR analysis

Tomato genomic DNA was isolated from young leaves of transformed tomato plants using the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method (Sivankalyani *et al.*, 2014). The amount and quality of the DNA were evaluated with a nanodrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer and by agarose gel electrophoresis. The right integration of the pBI₁₂₁ vector was tested by amplifying a 407 bp size fragment of the selectable marker neomycin phosphotransferase gene (*npt-II*) using forward primer 5'-AAGATGGATTGCACGCAGGTT-3' and reverse primer 5'-GATGTTTCGCTTGGTGGTTCGAAT-3'.

The amplification of the gene was carried out by PCR using GoTaq[®] Core System I kit (PROMEGA, WI, USA), containing 2 mL MgCl₂ solution (25 mM), 5 mL 5X colorless GoTaq[®] flexi buffer, 0.5 mL PCR nucleotide Mix (10 mM each), 1 mL Primer forward (10 mM), 1 mL Primer reverse (10 mM), 1 mL DNA (100 ng mL⁻¹), 0.125 mL GoTaq[®] DNA Polymerase (5U mL⁻¹), and 14.375 mL free DNase water per reaction. The PCR reaction was performed in a Labnet Multigene Optimax thermocycler with the following conditions: 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94 °C for 45 s, 60 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and final extension of 72 °C for 10 min. The amplified product was separated by electrophoresis on 1 % (w/v) agarose gel, stained with GelRed[®] and visualized on a Vilber Lourmat UV transilluminator equipped with an Olympus sp-310/350 digital camera.

Histochemical GUS assay

Histochemical assay to detect β -glucuronidase enzymatic activity (GUS staining) was performed according to the method of Jefferson *et al.* (1987). Callus and leaves samples from transgenic tomato plants harboring the pBI₁₂₁ vector were placed in GUS staining solution containing 0.5 mM of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid (X-gluc), 0.1 M NaHPO₄ pH 8.0, 0.5 mM K₃Fe(CN)₆, 0.5 mM K₄Fe(CN)₆, 0.01 M EDTA pH 8.0 and 0.1% Triton X-100 and incubated overnight at 37 °C. After staining, the tissues were washed with a mixture of methanol:acetone (3:1) for 2-3 times to remove the chlorophyll. Finally, the different tissues were visualized in a stereoscope. The presence of blue color in the tissue was taken as a positive result for plant genetic transformation.

(0.73 μ m). Después del bombardeo, los explantes se incubaron durante 48 h a 25 °C y posteriormente se colocaron en el medio AGK-1, el cual se determinó que era el mejor medio para la organogénesis, con suplemento de kanamicina. Los explantes crecieron bajo un fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad.

Transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, con el vector binario pBI₁₂₁ se utilizó para realizar la infección. Dissectamos los hipocótilos de plántulas de tomate cv. Rutgers de 8-10 d de edad, después los sumergimos en una suspensión de *A. tumefaciens* durante 20 min. Colocamos los explantes de hipocótilos en un medio de co-cultivo (Medio AGK-1: Mezcla basal de 4.3 g L⁻¹ de sales de MS, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de gelrita, 0.5 mg L⁻¹ de AIA, 0.5 mg L⁻¹ de kinetina y 0.1 mg L⁻¹ de clorhidrato de tiamina) durante 3 d. Después de este periodo, transferimos los explantes a un medio fresco de AGK-1 adicionado con 100 mg mL⁻¹ kanamicina como marcador de selección y 250 mg mL⁻¹ ticarcilina-cefotaxima para eliminar a *A. tumefaciens*.

Para ambos métodos de transformación, seleccionamos las plantas resistentes a la kanamicina. También, demostramos la integración del vector al genoma de la generación T₀ de plantas de tomate por medio del ensayo histoquímico de la β -glucuronidasa y la amplificación del gen *npt-II* mediante PCR.

Análisis mediante PCR

El ADN genómico del tomate se aisló a partir de las hojas jóvenes de plantas de tomate transformadas utilizando el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) (Sivankalyani *et al.*, 2014). La cantidad y calidad del ADN se determinó mediante un espectrofotómetro de ultra bajo volumen UV-Vis nanodrop ND-1000 y electroforesis en gel de agarosa. La correcta integración del vector pBI₁₂₁ se evaluó mediante la amplificación de un fragmento de 407 pb del gen de selección neomicina fosfotransferasa (*npt-II*), con el cebador directo 5'-AAGATGGATTGCACGCAGGTT-3' y el iniciador inverso 5'-GATGTTTCGCTTGGTGGTTCGAAT-3'.

Amplificamos el gen mediante una PCR con el uso del kit GoTaq[®] Core System I (PROMEGA, WI, EE. UU.), con una solución de 2 mL de MgCl₂ (25 mM), 5 mL del amortiguador incoloro 5X GoTaq[®] flexi, 0.5 mL de mezcla de nucleótidos para PCR (10 mM de cada uno), 1 mL de iniciador directo (10 mM), 1 mL de iniciador inverso (10 mM), 1 mL de ADN (100 ng mL⁻¹), 0.125 mL de la ADN Polimerasa GoTaq[®] (5U mL⁻¹) y 14.375 mL de agua libre de ADNasa por reacción. La amplificación por PCR se realizó en un termociclador Labnet Multigene

Plantlet establishment

In vitro rooted transgenic plants derived from hypocotyls explants were washed with distilled water and placed in plastic pots containing peat moss. Each plant in the plastic pot was covered with a magenta box and transferred to the greenhouse. After three days, the magenta box was removed, and the regenerated plants were maintained in the greenhouse to allow normal development.

Experimental design

The experiment was carried out to determine the efficiency of five different regeneration media, each of these media was tested in two types of explant (hypocotyl and cotyledon) from tomato cv 'Rutgers', evaluating the time and percentage of regeneration. For each germination media, four magentas with 12 seeds each were used, with a total of 48 seeds per media. The regeneration experiment was performed with five petri dishes containing 12 explants, for a total of 60 explants for each tissue and regeneration media. For the transformation stage, the best regeneration media was used. Transformation was performed by *A. tumefaciens* infection and biolistic gene gun.

Statistical analysis

The organogenesis analysis was performed based on a completely randomized design with a 2×5 factorial design arrangement of treatments (two explants and five regeneration media). The response variable was the number of calli, root and stem tissue developed. The germination experiment results were not statistically analyzed because the response variable was the percentage.

The results were analyzed by a two-way ANOVA and means were compared using Tukey test ($p \leq 0.05$). An interaction effect analysis was also evaluated. All statistical analyses were carried out using STATA 12 program (<https://www.stata.com/>).

RESULTS AND DISCUSSION

Seed germination

The contamination percentage recorded for the seed disinfection methods was 50, 80 and 10 for methods 1, 2 and 3, respectively. We found that it is important to dry the seeds with sterile filter paper to decrease contamination.

The most efficient medium was ½MS showing 93.75% of germinated seeds in 5 d. And, 79.1%

Optimax bajo las siguientes condiciones: 94 °C durante 5 min, 35 ciclos de 94 °C durante 45 s, 60 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min y extensión final de 72 °C durante 10 min. Separamos el producto amplificado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), el cual teñimos con GelRed® y visualizamos en un transiluminador Vilber Lourmat UV equipado con una cámara digital Olympus sp-310/350.

Prueba histoquímica de la enzima GUS

La prueba histoquímica para detectar la actividad enzimática de la β -glucuronidasa (tinción de GUS) se realizó de acuerdo al método de Jefferson *et al.* (1987). Las muestras de tejido no diferenciado y hojas de plantas de tomates transgénicas que alojaban el vector pBI₁₂₁ se colocaron en una solución 0.5 mM de tinción de GUS (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucorónico (X-gluc) NaHPO₄ 0.1 M a pH 8.0, K₃Fe(CN)₆ 0.5 mM, K₄Fe(CN)₆ 0.5 mM, EDTA 0.01 M a pH 8.0 y Tritón X-100 al 0.1%) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Después de la tinción, lavamos los tejidos con una mezcla de metanol: acetona (3:1) 2-3 veces para retirar la clorofila. Finalmente, visualizamos los diferentes tejidos en un estereoscopio. La presencia de un color azul en el tejido es un indicador positivo de la transformación genética de la planta.

Establecimiento de la plántula

Lavamos con agua destilada las plantas transgénicas enraizadas *in vitro* obtenidas de los explantes de hipocótilos y las colocamos en macetas de plástico con sustrado de peat moss. Cubrimos cada planta en maceta de plástico con una caja magenta y las transferimos al invernadero. Después de tres días, retiramos las cajas magenta y mantuvimos en el invernadero las plantas regeneradas para permitir un desarrollo normal.

Diseño experimental

La finalidad de este experimento fue determinar la eficiencia de cinco medios de regeneración diferentes. En cada uno de estos medios evaluamos el tiempo y porcentaje de regeneración de dos tipos de tejidos (hipocótilo y cotiledón) obtenidos de plantas de tomate cv 'Rutgers'. Para cada medio de germinación, utilizamos cuatro cajas magenta con 12 semillas cada una, para un total de 48 semillas por medio. El experimento de regeneración se realizó con cinco cajas de Petri, cada una con 12 explantes, 60 para cada tipo de tejido y medio de regeneración. Para la etapa de transformación utilizamos el mejor medio de regeneración. La transformación se realizó mediante la infección con *A. tumefaciens* y biobalística.

germination in 8 d and 50% germination in 12 d were recorded for KCMS and MS1X-NT1 media (Table 1). In the case of the germination time, our results are different as compared with Fuentes *et al.* (1998) who reported a seed germination time in tomato seed cv. 'Campbell' in the range of 12-16 d, which is a little higher than the present study. These results can be ascribed to the genetic differences between the two tomato cultivars (Jabeen *et al.*, 2005). Indeed, an experiment with tomato cultivars from USSR, Canada, Turkey and USA recorded differences in the germination time using experimental conditions similar to the ones utilized in the present experiment (Scott and Jones, 1982).

Tomato plant organogenesis

After four weeks, the induction of both shoots and roots tissues was scored (Table 2). All media tested were able to induce callus tissue from hypocotyl and cotyledon tissues. In the case of BIK media, no shoot development was recorded from either explant tested, whereas, in the case of RM1-Z and AGK1 media, shoots were observed in the case of hypocotyl tissue. Further, root development occurred in all media tested except for RM1-Dr in which no root development was recorded in both cotyledons and hypocotyls tissues. The maximum number of callus and root induction was observed on AGK-1 medium ($p \leq 0.05$). Moreover, AGK-1 medium induced the highest number of shoot development using hypocotyl explants among all treatments ($p \leq 0.05$). Furthermore, the statistical analysis indicated that an interaction effect exists between the medium and the type of explant on callus and shoot response, while no

Análisis estadístico

El análisis de la organogénesis se basó en un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial 2×5 de los tratamientos (dos explantes y cinco medios de regeneración). La variable de respuesta fue el número de callos (tejido no diferenciado), raíces y tallos desarrollados. Los resultados del experimento de germinación no se analizaron estadísticamente debido a que la variable de respuesta fue el porcentaje.

Analizamos los resultados con un ANDEVA de dos vías y las medias se compararon con una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). También se realizó el análisis del efecto de interacción. Realizamos todos los análisis estadísticos con el programa STATA 12 (<https://www.stata.com/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación de semillas

Registramos un porcentaje de contaminación de 50, 80 y 10 para los métodos de desinfección de semillas 1, 2 y 3, respectivamente. Observamos que es importante secar las semillas con un papel filtro estéril para disminuir la contaminación.

El medio $\frac{1}{2}$ MS fue el más eficiente, debido a que en 5 d germinó el 93.75% de las semillas. En los medios KCMS y MS1X-NT1 germinó el 79.1% de las semillas a los 8 d y el 50% a los 12 d, respectivamente (Cuadro 1). Nuestros tiempos de germinación difieren de los resultados de Fuentes *et al.* (1998), quienes documentaron un tiempo de germinación de semilla de tomate cv. 'Campbell' de 12- 16 d, ligeramente mayor al del presente estudio. Estos resultados se pueden atribuir a las diferencias genéticas entre los dos cultivares de tomate (Jabeen *et al.*, 2005). En efecto,

Table 1. Effect of the different media tested on the percentage of germinated seeds and germination time.

Cuadro 1. Efecto de los diferentes medios evaluados en el porcentaje de semillas germinadas y el tiempo de germinación.

Media	Total number of seeds	Germination (%)	Germination time (days)
$\frac{1}{2}$ MS	48	93.75	5
KCMS	48	79.1	8
MS1X-NT1	48	50	12

For each germination media, four magentas with 12 seeds per magenta were used. The germination was considered complete when the emergence of the radicle was observed. ❖ Para cada medio de germinación utilizamos cuatro cajas magenta con 12 semillas por caja. La germinación se consideró completa cuando se observó el desarrollo inicial de la radícula.

Table 2. Effect of the different media tested on callus, root and shoot development from cotyledon and hypocotyl explants.**Cuadro 2.** Efecto de los diferentes medios evaluados en el desarrollo de tejido no diferenciado, raíces y tallos a partir de explantes de cotiledón e hipocótilo.

Media	Explant	Morphogenic response		
		Callus per explant \pm SD	Root per explant \pm SD	Shoot per explant \pm SD
BIK	Cotyledon	12 \pm 2.2360 bc	6 \pm 1.118 a	0 \pm 0 a
	Hypocotyl	9 \pm 1.089 bc	12 \pm 2.5495 a	0 \pm 0 a
RM1-Z	Cotyledon	7 \pm 2.1479 abc	1 \pm 0.433 a	0 \pm 0 a
	Hypocotyl	5 \pm 0.433 abc	8 \pm 2.4494 a	2 \pm 0.5 a
RM1-Dr	Cotyledon	4 \pm 0.7071 ab	0 \pm 0 a	4 \pm 1 a
	Hypocotyl	22 \pm 1.6583 c	0 \pm 0 a	6 \pm 1.1180 a
2Z	Cotyledon	0\pm0 a	0\pm0 a	0\pm0 a
	Hypocotyl	0\pm0 a	0\pm0 a	0\pm0 a
AGK-1	Cotyledon	60 \pm 0.433 d	60 \pm 0.433 b	0 \pm 0 a
	Hypocotyl	60 \pm 0.8291 d	60 \pm 0.8291 b	25 \pm 3.03 b

Numbers in table indicates means of explant obtained and the standard deviation (counts/plates). Means with different letters are statistically significant (Tukey, $p \leq 0.05$). Different letters in a column are indicating statistical differences ($p \leq 0.05$). [†] The experiment was performed with 60 explants for each tissue. [¶] To evaluate the effect of type of explant and the culture media, an interaction analysis was carried out showing these results. Callus: B=0.00, A=0.047 y AB=0.0020; Root: B=0.00, A=0.065 y AB=0.6; Shoot: B=0.0001, A=0.0009 y AB=0.0001. Superior values of 0.05 show significant effect. Meaning of letters: B=Media, A=Explant, AB=Interacción. [§]SD=Standard deviation. [❖] Los números en el cuadro indican las medias de los explantes obtenidos y la desviación estándar (número/placa). Las medias con letras diferentes son estadísticamente significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). Las diferentes letras en una columna indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$). [†] El experimento se realizó con 60 repeticiones para cada tejido. [¶] Para evaluar el efecto del tipo de explante y el medio de cultivo, realizamos un análisis de interacción, el cual mostró los siguientes resultados. Tejido no diferenciado: B=0.00, A=0.047 y AB=0.0020; Raíz: B=0.00, A=0.065 y AB=0.6; Tallo: B=0.0001, A=0.0009 y AB=0.0001. Los valores superiores a 0.05 muestran un efecto significativo. Significado de las letras: B=Medio, A=Explante, AB=Interacción. [§]SD=Desviación estándar.

interaction was observed in case of root regeneration (Table 2). Due to the interaction effect, an interaction analysis was carried out, besides the Tukey means test. These results strongly suggest that both factors (media and type of explant) are required to improve the regeneration process. According to the statistical analysis, the best regeneration medium was AGK-1 in all tested tissues (callus, root and shoot).

Previous studies have shown callus and shoot development after two and five weeks of cotyledon incubation of tomato cv 'Zuiken', respectively (Ichimura and Oda, 1995). Furthermore, in the case of cotyledon from the tomato cultivars 'Ibadan', 'Ife' and 'JM94/46', shoots were observed after 28 d and roots after 38 d (Ajenifujah-Solebo *et al.*, 2012). Also, shooting and rooting from cotyledons and hypocotyl of tomato cv. 'Arka Ahuti' were observed after 20 and 50 d, respectively (Namitha and Negi, 2013), In contrast, in our study, the beginning of shoot and root development in the AGK-1 was recorded after 14 and 28 d of explant incubation,

un experimento con cultivares de tomate provenientes de la URSS, Canadá, Turquía y EE. UU. registró diferencias en el tiempo de germinación bajo condiciones experimentales similares a las que utilizamos en este experimento (Scott y Jones, 1982).

Organogénesis de la planta de tomate

Después de cuatro semanas, registramos la inducción de la raíz y del tallo (Cuadro 2). Todos los medios evaluados indujeron tejido no diferenciado a partir del hipocótilo y del cotiledón. En el medio BIK, no se encontró desarrollo del tallo a partir de ninguno de los tejidos evaluados, mientras que en los medios RM1- Z y AGK1 sí observamos el desarrollo de tallos a partir del hipocótilo. Mas aún, el desarrollo de raíces ocurrió en todos los medios evaluados excepto en el RM1-Dr, en el cual no hubo desarrollo radical a partir de ninguno de los explantes evaluados. El máximo número de inducción radical y de tejido no diferenciado (callo) se registró en el medio AGK-1

respectively. Similar results were obtained with the organogenesis of cotyledons and hypocotyls of tomato cv. 'Solan Vajr', in which shoots, and roots were observed after 14 and 21 d, respectively (Sharma and Srivastava, 2014). On Rutgers cultivar, Pozueta-Romero *et al.* (2001) used plantlets showing the beginning of the true leaf development and recorded 2.8 shoots per explant using a solid medium with no exogenous hormones after 14 d. In this experiment, the plantlets most likely were at least one week older than the ones utilized in the present work. Besides, it was shown that media supplemented with kinetin plus IAA induced a faster growth and improved regeneration efficiency, at a lower cost and with less manipulation. Moreover, by using the AGK-1 medium, it was possible to induce shoots and roots at the same time in the same media without a media change. In contrast, Kut and Evans (1982) described the utilization of different media for the induction of shoots and roots, something which is clearly more inefficient since the protocol demands more tissue manipulation and it is more expensive. Furthermore, a study carried out by Ramírez-Malagon and Ochoa-Alejo (1991) reported different media for shoot and root induction in several varieties of tomato.

The *in vitro* plant development response was different depending upon the components present in the media, including kinetin and IAA as well as the type of explant. However, in most of the literature reports, it is recommended the utilization of zeatin instead of kinetin as the best auxin, which brings an increase in the cost of the medium due to the higher price of the zeatin. Dang *et al.* (2010) showed that 1 μM IAA in combination with zeatin, is the most efficient auxin and cytokinin combination, for shoot induction from leaf explant of different tomato varieties. In our research, 0.5 mg L^{-1} kinetin and 0.5 mg L^{-1} IAA was the best combination for shoot and root induction from hypocotyl explant based on the amount of tissue obtained and the time length.

Hypocotyls showed higher shoot regeneration during the *in vitro* organogenesis of tomato, as compared with cotyledons (Gubis *et al.*, 2003; Yasmeen, 2009; Manamohan *et al.*, 2011). Furthermore, Mathews *et al.* (2003) showed that hypocotyls allowed easier manipulation in the tomato cv. Micro-Tom. Additionally, from hypocotyls, it is possible to get a higher number of explants tissue from tomato seedlings as compared with

($p \leq 0.05$). Además, el medio AGK-1 indujo el número más alto, entre todos los tratamientos, de tallos a partir de tejido de hipocótilos ($p \leq 0.05$). Aunado a esto, el análisis estadístico indicó que existe un efecto de interacción entre el medio y el tipo de tejido en la respuesta del tejido no diferenciado y de tallos, mientras que no se observó alguna interacción en el caso de la regeneración del tejido radical (Cuadro 2). Debido a que la interacción resultó estadísticamente significativa, se realizó un análisis de interacción además de la prueba de medias de Tukey. Estos resultados sugieren claramente que se requiere de ambos factores (medio y tipo de explante) para mejorar el proceso de regeneración. De acuerdo con el análisis estadístico, el mejor medio de regeneración es el AGK-1 para todos los tejidos evaluados (tejido no diferenciado, raíz y tallo).

Estudios previos han demostrado el desarrollo del tejido no diferenciado y del tallo después de dos y cinco semanas de incubación del cotiledón del tomate cv 'Zuiken', respectivamente (Ichimura y Oda, 1995). Además, en el caso de los cotiledones de los cultivares de tomate 'Ibadan', 'Ife' y 'JM94/46', se observaron tallos después de 28 d y raíces después de 38 d (Ajenifujah-Solebo *et al.*, 2012). También, el desarrollo del tallo y la raíz a partir de cotiledones e hipocótilos del tomate cv. 'Arka Ahuti' se observó después de 20 y 50 d, respectivamente (Namitha y Negi, 2013). En cambio, en nuestro estudio, el inicio del desarrollo del tallo y la raíz en el medio AGK-1 se registró después de 14 y 28 d de incubación, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron con la organogénesis de cotiledones e hipocótilos del tomate cv. 'Solan Vajr', en la que se observaron tallos y raíces después de 14 y 21 d, respectivamente (Sharma y Srivastava, 2014). En el cultivar de Rutgers, Pozueta-Romero *et al.* (2001) utilizaron plántulas que presentaban el desarrollo inicial de hojas verdaderas y registraron 2.8 tallos por tejido empleando un medio sólido sin hormonas exógenas después de 14 d. En dicho experimento lo más probable es que, las plántulas tuvieran al menos una semana más de edad que las que utilizamos en ese estudio. Además, se demostró que los medios suplementados con kinetina más AIA indujeron un crecimiento más rápido y mejoraron la eficiencia de la regeneración, a un menor costo y con menos manipulación. También, con el medio AGK-1 fue posible inducir tallos y raíces al mismo tiempo en el mismo medio sin cambiarlo. En contraste, Kut y Evans (1982) describieron el uso de

cotyledons. Mohamed *et al.* (2010) evaluated tomato organogenesis from hypocotyls and cotyledons using different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP), and they observed a better efficiency using cotyledons as an explant, with a BAP concentration of 2 mg mL⁻¹. In contrast, Gubiš *et al.* (2004) and Sheeja *et al.* (2004) did not find statistically significant differences among the number of shoots developed from hypocotyls and cotyledons at different concentrations of BAP.

The results of our research strongly suggest that IAA and kinetin are a better combination of phytohormones for *in vitro* organogenesis from hypocotyl of tomato cv. 'Rutger', and they agree with those reported by Sun *et al.* (2015), who tested hypocotyl and cotyledons as explants, changing the media to induce roots in tomato, which were produced after 20 to 30 d of culture. In contrast, the medium developed in our study induced both shoots and roots at the same time from the same tissue and in shorter time. On Rutgers cultivar, our results were similar to the findings of Lech *et al.* (1996) regarding the induction of shoots and roots that were induced using only one media supplemented with IAA and BA. However, they used leaves as explant and no transformation protocol was tested.

Tomato organogenesis from hypocotyl as explant on AGK-1 medium is shown in Figure 1. After two weeks, most of the hypocotyls developed shoots, callus and/or leaves, in the same media (Figure 1A). The development of shoots and leaves was observed at one end of the hypocotyl, whereas root development was observed on the opposite end (Figure 1B). These results are important because we developed a system in which the generation of two types of organs can be achieved simultaneously, from hypocotyls as explants in combination with a single media (AGK-1 media), leading to a reduction in cost, manipulation and time. Plantlets were obtained approximately after nine weeks (Figure 1C). Plants with roots, regenerated from hypocotyl, roots were rinsed with distilled water in order to remove agar medium. Afterward, they were planted in plastic pots containing soil and were covered with a magenta box in order to maintain relative humidity (RH) at 80-90%. Plants remained in the greenhouse for adaptation and development. The total organogenesis time to get a complete tomato plant was around 10 weeks, reaching a size greater than 10 cm (Figure 1D).

diferentes medios para inducir tallos y raíces, lo cual es evidentemente ineficiente, ya que el protocolo exige la manipulación excesiva de los tejidos y es más costoso. Aunado a esto, un estudio realizado por Ochoa-Alejo (1991) reportó diferentes medios para la inducción de tallos y las raíces en diferentes variedades de tomate.

La respuesta *in vitro* del desarrollo de la planta fue diferente dependiendo de los componentes presentes en el medio, incluyendo kinetina y AIA, al igual que el tipo de explante. Sin embargo, la mayoría de los estudios reportados recomienda el uso de zeatina en lugar de la kinetina como la mejor auxina, lo cual aumenta el costo del medio debido al precio más alto de la zeatina. Dang *et al.* (2010) demostraron que el AIA 1 mM combinado con zeatina, es la combinación de auxina y citoquinina más eficiente para la inducción del tallo a partir del explante de hoja de diferentes variedades de tomate. En nuestra investigación, la combinación de 0.5 mg L⁻¹ de kinetina y 0.5 mg L⁻¹ de AIA fue la mejor para la inducción del tallo y la raíz a partir del tejido de hipocótilo, considerando la cantidad de tejido obtenido y el tiempo necesario para su desarrollo.

En los hipocótilos se observó una mayor generación del tallo durante la organogénesis *in vitro* del tomate, en comparación con los cotiledones (Gubis *et al.*, 2003; Yasmeen, 2009; Manamohan *et al.*, 2011). Además, Mathews *et al.* (2003) demostraron que los hipocótilos son más fáciles de manipular en el tomate cv. Micro-Tom. También, es posible obtener un mayor número de explantes de hipocótilos que de cotiledones a partir de plántulas de tomate. Mohamed *et al.* (2010) evaluaron la organogénesis del tomate a partir de hipocótilos y cotiledones con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), y encontraron que los tejidos de los cotiledones son más eficientes, con una concentración de BAP de 2 mg mL⁻¹. En cambio, Gubiš *et al.* (2004) y Sheeja *et al.* (2004) no observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de tallos desarrollados a partir de hipocótilos y cotiledones a diferentes concentraciones de BAP.

Los resultados de nuestra investigación sugieren claramente que el AIA y la kinetina son una mejor combinación de fitohormonas para la organogénesis *in vitro* a partir del hipocótilo del tomate cv. 'Rutger', y coinciden con los reportados por Sun *et al.* (2015), quienes evaluaron explantes de hipocótilo y el cotiledón, con cambio de medios para inducir

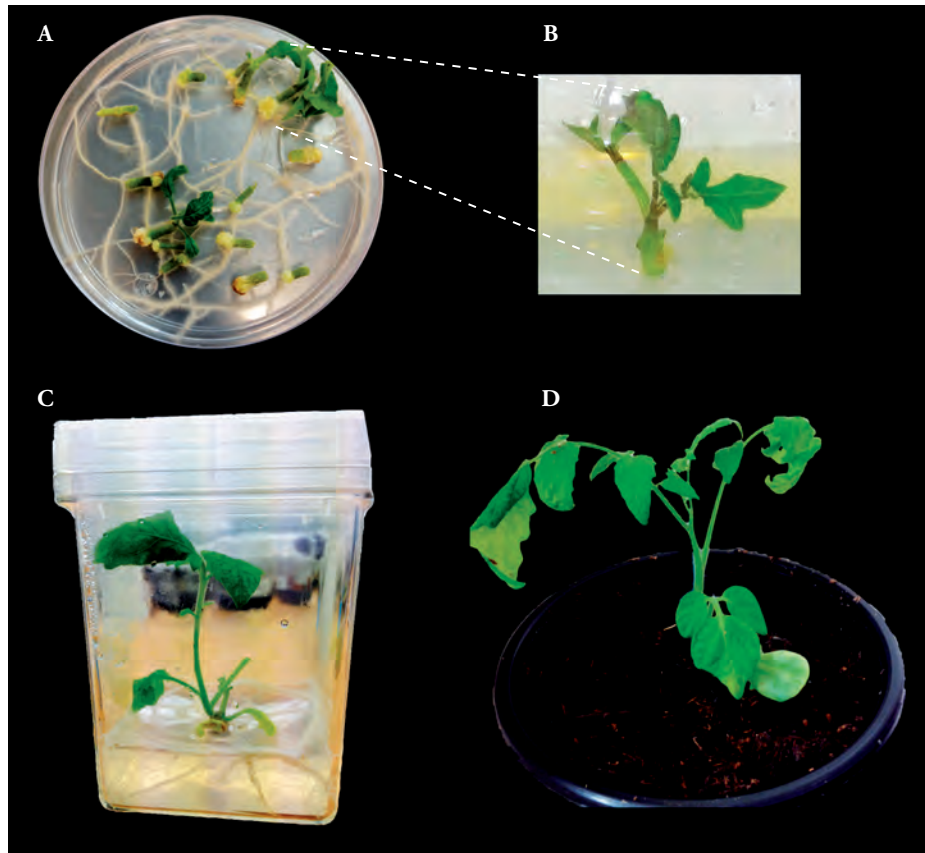


Figure 1. Different stages of tomato organogenesis in medium AGK-1. A) Hypocotyl with shoot developed after two weeks. B) Hypocotyl with leaves and roots developed after four weeks. C) Plantlet growing *in vitro* plant after 9 weeks. D) Regenerated plant after 10 weeks.

Figura 1. Diferentes estadios de la organogénesis del tomate en el medio AGK-1. (A) Hipocótilo con desarrollo de tallo después de dos semanas. (B) Hipocótilo con hojas y raíces después de cuatro semanas. (C) Plántula creciendo *in vitro* después de 9 semanas. (D) Planta regenerada después de 10 semanas.

The utilization of different complex culture media, needs a higher manipulation of tissues, leading potentially to higher rates. Fuentes *et al.* (1998) reported the development of buds in the leaf cut zone after four weeks. Most of the methods used until now require several types of media in order to develop different tissues. Ghada *et al.* (2008) used different induction media under *in vitro* conditions and found differentiated tissues after 10-12 d of incubation, and shoot generation was observed after three weeks. Based on the above mentioned, AGK-1 medium is an improved medium to obtain a complete tomato plant cv. Rutgers at lower cost and in a shorter period of time.

Khaliluev *et al.* (2014) tested *in vitro* organogenesis on different tomato lines, concluding that there is an

raíces en tomate, las cuales se produjeron después de 20 a 30 d de cultivo. En cambio, el medio que desarrollamos para este estudio indujo el desarrollo simultáneo de tallos y raíces a partir del mismo tejido y en un menor tiempo. En el cultivar de Rutgers, nuestros resultados fueron similares a los informados por Lech *et al.* (1996) en cuanto a la inducción de tallos y raíces con el uso de un medio único adicionado con AIA y BA. Sin embargo, ellos utilizaron hojas como explantes y no evaluaron ningún protocolo de transformación.

En la Figura 1 se presenta la organogénesis del tomate utilizando al hipocótilo como explante en el medio AGK-1. Después de dos semanas, la mayoría de los hipocótilos desarrolló tallos, tejido no diferenciado (callo), u hojas, en el mismo medio (Figura 1A).

important influence of genotype, explant source and component of culture medium on shoot induction. So far, there are thousands of tomato cultivars, and for that reason it is difficult to establish one universal protocol for tomato organogenesis. In this regard, it is important to have a tissue culture protocol easy, novel and short for tomato regeneration, which is a key step for genetic transformation. Additionally, before *Agrobacterium* infection, we tested this protocol on tomato cv. Ohio 8245 obtaining similar results (data not shown).

Creation of transgenic tomato tissues

On *Agrobacterium*-mediated genetic transformation with the binary vector pBI₁₂₁, we could not regenerate any type of transgenic tissue. We believe this is due to the long time utilized during the *Agrobacterium* infection step. However, on biolistic gene gun transformation, after particle bombardment using 9 cm of shooting distance, it was possible to achieve tissue regeneration with the AGK-1 medium and hypocotyl as an explant. Histochemical GUS assay was performed on callus and hypocotyl bombarded with pBI₁₂₁ plasmid after maintenance on the AGK-1 medium with kanamycin as a selectable marker.

The presence of blue color on callus, hypocotyl and leaves confirmed the presence of an active transgene (Figure 2A, 2B), showing the efficiency of the biolistic gene gun method for tomato genetic transformation. Besides, a PCR analysis to test the stable integration of the construct into tomato genome and using specific primers to amplify *npt-II* gene was used, a 407 bp fragment was found in transformed plants tested (Figure 2C). Therefore, GUS and PCR results confirmed the integration of the T-DNA into the plant genome.

Based on our results, it seems that particle bombardment favors the recovery of transgenic plants and demonstrates transgene expression, which was previously reported by Altpeter *et al.* (2005). One of the major advantages of biolistic gene gun method is the insertion of single copy events on plants in comparison with *Agrobacterium*-mediated transformation, which could insert the construct at multiple *loci* (Altpeter *et al.*, 2005). This behavior is not desirable to obtain stable homozygous transgenic plants.

El desarrollo del tallo y las hojas se observó en uno de los extremos del hipocótilo, y el desarrollo radical se observó en el extremo opuesto (Figura 1B). Estos resultados son importantes ya que desarrollamos un sistema en el cual se generan dos tipos de órganos de forma simultánea utilizando hipocótilos como explantes y en combinación con un único medio (medio AGK-1), lo cual reduce costos de manipulación y tiempo. Obtuvimos plántulas después de aproximadamente nueve semanas (Figura 1C). Lavamos con agua destilada las raíces, regeneradas del hipocótilo, de las plantas para retirar el agar del medio. Después, las plantamos en macetas de plástico con suelo y las cubrimos con una caja magenta para mantener la humedad relativa (HR) a 80-90%. Las plantas permanecieron en el invernadero para su adaptación y desarrollo. El tiempo total de organogénesis para obtener una planta de tomate completa fue de aproximadamente 10 semanas, hasta alcanzar un tamaño mayor a 10 cm (Figura 1D).

El uso de diferentes medios de cultivo complejos requiere de una mayor manipulación de los tejidos, lo que puede generar mayores porcentajes de contaminación. Fuentes *et al.* (1998) reportaron el desarrollo de yemas en el área de corte de la hoja después de cuatro semanas. La mayoría de los métodos utilizados hasta ahora requieren diversos tipos de medios para desarrollar diferentes tejidos. Ghada *et al.* (2008) usaron diferentes medios de inducción bajo condiciones *in vitro* y encontraron tejidos diferenciados después de 10-12 d de incubación, y observaron la generación del tallo después de tres semanas. Con base en lo ya mencionado, el medio AGK-1 es un medio mejorado para obtener una planta completa de tomate cv. Rutgers a un menor precio y en menor tiempo.

Khaliluev *et al.* (2014) evaluaron la organogénesis *in vitro* en diferentes líneas de tomate, y concluyeron que hay una importante influencia del genotipo, tipo de tejido y los componentes del medio de cultivo, en la inducción del tallo. Hasta ahora, existen miles de cultivares de tomate y por lo tanto es difícil establecer un protocolo universal para la organogénesis de esta planta. Al respecto, es importante tener un protocolo de cultivo de tejido que sea fácil, novedoso y corto para la regeneración del tomate, lo cual es un paso clave para la transformación genética. Además, antes de la infección con *Agrobacterium*, evaluamos este protocolo en el tomate cv. Ohio 8245 y obtuvimos resultados similares (datos no presentados).

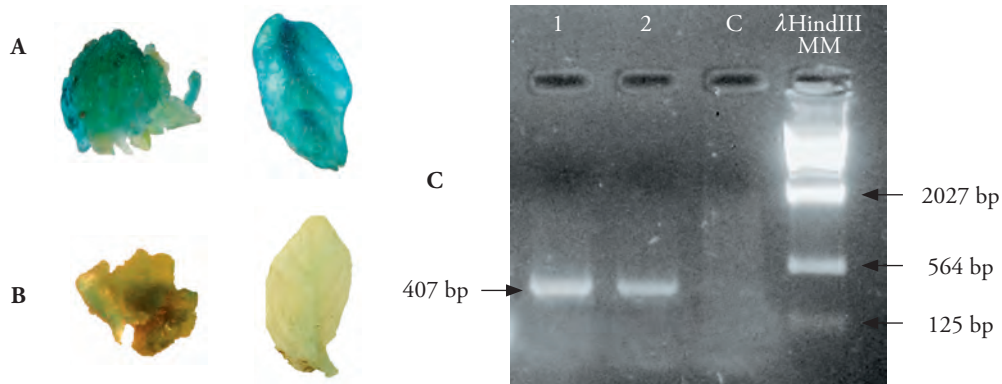


Figure 2. Genetic transformation of tomato. GUS staining of (A) callus and leaves of transformed tomato plants by biolistic gun method. (B) Wild type callus and leaves of the negative control. (C) PCR amplification of 407 bp *npt-II* gene fragment of the transgenic tomato plants. Lane 1 and 2 represents transgenic plants harboring the pBI₁₂₁ vector. Lane C corresponds with the wild-type tomato plants as the negative control. Lane λHindIII MM is indicating the Lambda DNA/Hind III molecular weight markers.

Figura 2. Transformación genética del tomate. Tinción de GUS en el (A) tejido no diferenciado y de las hojas de las plantas de tomate transformadas mediante el método de biobalística. (B) Tejido no diferenciado y hojas silvestres del control negativo. (C) Amplificación por PCR del fragmento de 407 pb del gen *npt-II* de las plantas de tomate transgénicas. Los carriles 1 y 2 corresponden a las plantas transgénicas que alojan el vector pBI₁₂₁. El carril C corresponde a las plantas de tomate silvestres como control negativo. El carril λHindIII MM corresponde al marcador de pesos moleculares de ADN λHind III.

Based on the results, AGK-1 medium in combination with hypocotyl explants and biolistic gun method, provide an easier, cheaper, faster, more efficient and novel method for regeneration and genetic transformation of tomato cv. Rutgers in a relatively short period of time. It is possible that the same media can be utilized for other tomato cultivars.

CONCLUSIONS

AGK-1 medium and the utilization of hypocotyl as a source of explant was used to develop a complete tomato plant cv. Rutgers being one of the first complete reported protocol for this variety. It was possible to design a novel, quicker, efficient and easier organogenesis and genetic transformation protocol for tomato which can be utilized during the protocols of tomato genetic transformation and also for micropropagation of numerous plantlets in shorter periods of time.

Perhaps the protocol designed in our research can be utilized to create a T-DNA insertion collection of tomato plant to be able to carry out reverse genetics in a similar way as it has been carried out with *Arabidopsis thaliana*.

Creación de tejidos de tomate transgénicos

En la transformación genética mediada por *Agrobacterium* con el vector binario pBI₁₂₁, no pudimos regenerar ningún tipo de tejido transgénico. Pensamos que esto podría ser el resultado del largo periodo de tiempo utilizado durante la infección con *Agrobacterium*. Sin embargo, en la transformación mediante biolística, después del bombardeo con partículas con una distancia de disparo de 9 cm, pudimos regenerar tejidos en el medio AGK-1 al usar el hipocótilo como explante. La prueba histoquímica GUS se realizó en el tejido no diferenciado y en el hipocótilo bombardeado con el plásmido pBI₁₂₁ después del mantenimiento en el medio AGK-1 con kanamicina como marcador de selección.

La presencia de color azul en el tejido no diferenciado (callo), el hipocótilo y las hojas confirmó la presencia del transgén activo (Figura 2A, 2B), y demostró la eficiencia del método de biobalística para la transformación genética del tomate. Además, utilizamos un análisis de PCR para determinar la integración estable del constructo en el genoma del tomate con el uso de iniciadores específicos para amplificar el gen *npt-II*, y encontramos un fragmento de 407 pb en las

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank National Council for Science and Technology CONACYT of México for the financial support for this research with the grant number 177248.

LITERATURE CITED

- Ajenifujah-Solebo, S. O. A., N. A. Isu., O. Olorode., I. Ingelbrecht and O.O. Abiade. 2012. Tissue culture regeneration of three Nigerian cultivars of tomato. *Afr. J. Plant Sci.* 6:370-375.
- Altpeter, F., N. Baisakh, R. Beachy, R. Bock, T. Capell, P. Christou, H. Daniell, K. Datta, S. Datta, and P. J. Dix. 2005. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Mol. Breed.* 15: 305-327.
- Bhatia, P., N. Ashwath, T. Senaratna, and D. Midmore. 2004. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 78: 1-21.
- Chetty, V., N. Ceballos, D. Garcia, J. Narváez-Vásquez, W. Lopez, and M. Orozco-Cárdenas. 2013. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Rep.* 32: 239-247.
- Cortina, C., and F. A. Culiáñez-Macià. 2004. Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 76: 269-275.
- Cruz-Mendivil, A., J. Rivera-López, L. J. Germán-Báez, M. López-Meyer, S. Hernández-Verdugo, J. A. López-Valenzuela, C. Reyes-Moreno, and A. Valdez-Ortiz. 2011. A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv. Micro-Tom from leaf explants. *HortScience* 46: 1655-1660.
- Dang, T. V., F. Noel, and J. Hans-Jörg. 2010. Development of a simple and effective protocol for *Agrobacterium tumefaciens* mediated leaf disc transformation of commercial tomato cultivars. *GM Crops* 1:5: 312-321.
- Frary, A. and J. Van-Eck. 2004. Organogenesis from Transformed Tomato Explants. Leandro Peña. Springer, Valencia, Spain. pp: 141-150.
- Fuentes, A. D., N. Soto, D. Alfonso, and P. Oramas. 1998. Estudio de las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill), a partir de cotiledones y hojas de la variedad Campbell 28. *Biotechnol. Apl.* 15: 242-245.
- Gerszberg, A., K. Hnatuszko-Konka, T. Kowalczyk, and A. K. Kononowicz. 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 120: 881-902.
- Ghada, A.-E.-H., G. M. Hussein, and N. A. Abdalla. 2008. A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system. *vTI Agric. For. Res.* 58: 103-110.
- Gubis, J., Z. Lajchova, J. Farago, and Z. Jurekova. 2003. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) *in vitro*. *Czech J. Genet. Plant. Breed.* 39: 9-14.
- Gubiš, J., Z. Lajchová, J. Faragó, and Z. Jureková. 2004. Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.). *Biologia* 59: 405-408.
- plantas transformadas evaluadas (Figura 2C). Por lo tanto, los resultados de los ensayos de la GUS y de la PCR confirmaron la integración del ADN-T en el genoma de la planta.
- Con base en nuestros resultados, el bombardeo de partículas favorece la recuperación de las plantas transgénicas y demuestra la expresión transgénica, de acuerdo con lo reportado por Altpeter *et al.* (2005). Una de las principales ventajas del método de biobalística es la inserción de una sola copia en las plantas, a diferencia de la transformación mediada por *Agrobacterium*, que podría insertar el constructo en múltiples *loci* (Altpeter *et al.*, 2005). Este comportamiento no es deseable para la obtención de plantas transgénicas homocigotas estables.
- De acuerdo a nuestros resultados, el medio AGK-1 junto con los explantes de hipocótilo y el método de biolística, proporciona un método sencillo, económico, rápido, eficiente y novedoso para la regeneración y transformación genética del tomate cv. Rutgers en un tiempo relativamente corto. Es posible que se pueda utilizar este medio para otros cultivares de tomate.

CONCLUSIONES

Desarrollamos una planta completa de tomate cv. Rutgers con el medio AGK-1 y tejido hipocótilo. Este es uno de los primeros protocolos completos reportados para esta variedad. Fue posible diseñar un protocolo novedoso, más rápido, eficiente y sencillo de organogénesis y transformación genética para el tomate, el cual se puede utilizar en protocolos de transformación genética para la micropropagación de numerosas plántulas en menor tiempo.

Es probable que el protocolo que diseñamos en esta investigación se pueda utilizar para crear una colección de inserciones de ADN-T de la planta de tomate para realizar genética inversa, de la misma forma en la que se ha realizado con *Arabidopsis thaliana*.

—Fin de la versión en Español—



- Guo, M., Y. Zhang, Z. Meng, and J. Jiang. 2012. Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of Micro-Tom tomatoes. *Genet. Mol. Res.* 11: 661-671.
- Herrera-Estrella, L., J. Simpson, and M. Martínez-Trujillo. 2004. Transgenic Plants: An Historical Perspective. Leandro Peña. Springer, Valencia, Spain. pp: 3-31.

- Ichimura, K., and M. Oda. 1995. Stimulation of shoot regeneration from cotyledon segments of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by Agar and Its Extract. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 64: 135-141.
- Jabeen, N., Z. Chaudhry, H. Rashid, and B. Mirza. 2005. Effect of genotype and explant type on in vitro shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Pak. J. Bot.* 37: 899-903.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901.
- Khaliluev, M., L. Bogoutdinova, G. Baranova, E. Baranova, P. Kharchenko, and S. Dolgov. 2014. Influence of genotype, explant type, and component of culture medium on in vitro callus induction and shoot organogenesis of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Biol. Bul.* 41: 512-521.
- Kut, S. and D. Evans. 1982. Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* 18: 593-598.
- Lech, M., K. Miczyński, and A. Pindel. 1996. Comparison of regeneration potentials in tissue cultures of primitive and cultivated tomato species (*Lycopersicon* sp.). *Acta Soc. Bot. Pol.* 65: 53-56.
- Manamohan, M., M. Prakash, G. S. Chandra, R. Asokan, and S. Nagesha. 2011. An improved protocol for rapid and efficient *Agrobacterium* mediated transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Appl. Hort.* 13: 3-7.
- Mathews, H., S. K. Clendennen, C. G. Caldwell, X. L. Liu, K. Connors, N. Matheis, D. K. Schuster, D. Menasco, W. Wagoner, and J. Lightner. 2003. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* 15: 1689-1703.
- Mohamed, A.-a. N., M. R. Ismail, and M. H. Rahman. 2010. *In vitro* response from cotyledon and hypocotyls explants in tomato by inducing 6-benzylaminopurine. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 4802-4807.
- Namitha, K. K., and P. S. Negi. 2013. Morphogenetic potential of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. Arka Ahuti to plant growth Regulators. *Not. Sci. Biol.* 5:220-225.
- Oktem, H., M. Mahmoudian, and M. Yucel. 1999. GUS gene delivery and expression in lentil cotyledonary nodes using particle bombardment. *Lens Newsl.* 26: 3-6.
- Pozueta-Romero, J., G. Houlne, L. Canas, R. Schantz, and J. Chamorro. 2001. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 67: 173-180.
- Praveen, M., and N. Rama S. 2011. Effect of genotype, explant source and medium on *in vitro* regeneration of tomato. *Int. J. Genet. Mol. Biol.* 3: 45-50.
- Ramírez-Malagon, R. and N. Ochoa-Alejo. 1991. Adventitious shoot formation and plant regeneration from tissues of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 25: 185-188.
- Scott, S. J., and R. A. Jones. 1982. Low temperature seed germination of *Lycopersicon* species evaluated by survival analysis. *Euphytica.* 31:869-883.
- Sharma, P. and D.K. Srivastava. 2014. *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyls tissues of tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Solan Vajr). *Vegetos.* 27:151-160.
- Sheeja, T., A. Mondal, and R. Rathore. 2004. Efficient plantlet regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Tissue Cult.* 14: 45-53.
- Sivankalyani, V., S. Takumi, S. Thangasamy, K. Ashakiran, and S. Girija. 2014. Punctured-hypocotyl method for high-efficient transformation and adventitious shoot regeneration of tomato. *Sci. Hort.* 165: 357-364.
- Sun, H.-J., S. Uchii, S. Watanabe, and H. Ezura. 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol.* 47: 426-431.
- Sun, S., X.-P. Kang, X.-J. Xing, X.-Y. Xu, J. Cheng, S.-W. Zheng, and G.-M. Xing. 2015. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo 908) with improved efficiency. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29: 861-868.
- Van, Roekel J. S., B. Damm, L. S. Melchers, and A. Hoekema. 1993. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Rep.* 12: 644-647.
- Wing, R. A., H.-B. Zhang, and S. D. Tanksley. 1994. Map-based cloning in crop plants. Tomato as a model system: I. Genetic and physical mapping of jointless. *Mol. Gen. Genet.* 242: 681-688.
- Yasmeen, A. 2009. An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv Rio Grande). *Acta Physiol. Plant.* 31: 1271-1277.
- Zhang, W., L. Hou, H. Zhao, and M. Li. 2012. Factors affecting regeneration of tomato cotyledons. *Biosci. Methods.* 4: 27-33.