

Proceso de unión del injerto de empalme en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.)*

Join process of splice graft in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

Mario de J. Velasco-Alvarado², Rogelio Castro-Brindis^{1§}, Edilberto Avitia-García¹, Ana María Castillo-González¹, Jaime Sahagún-Castellanos¹ y Ricardo Lobato-Ortiz²

¹Departamento de Fitotecnia-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5. Chapingo, Estado de México. CP. 56230. ²Recursos Genéticos y Productividad-Genética-Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. [§]Autor para correspondencia: rbrindis@gmail.com.

Resumen

La técnica de injerto en jitomate representa una alternativa sustentable para el control de enfermedades, para incrementar el vigor de planta, mejorar la calidad de fruto y rendimiento. Los primeros factores importantes en el proceso de injerto son la compatibilidad anatómica y el tiempo de establecimiento de la continuidad vascular entre los dos tejidos vegetales, este último determina el momento del trasplante. El objetivo del presente estudio fue evaluar el proceso de unión del injerto con el método de empalme en jitomate, mediante cortes anatómicos del punto de unión; así como, determinar el tiempo de desfasamiento en la siembra entre los genotipos 'Multifort' y 'El Cid' (portainjerto e injerto, respectivamente) para sincronizar el diámetro de tallo. Se sembraron 100 semillas de ambos genotipos, de esas plántulas se midieron los diámetros de tallo diariamente. Se tomaron muestras de tejido del punto de unión del injerto a los 5, 10 y 15 días después de la injertación (DDI), los cortes anatómicos fueron de 10 µm de espesor obtenidos con un microtomo rotatorio. Los resultados indicaron, que se requiere sembrar el injerto o púa, dos días antes que el portainjerto para homogenizar el diámetro de tallo a 2 mm (ideal para injertar). En las imágenes de los cortes anatómicos se encontró que a los 5 DDI la línea

Abstract

The tomato grafting technique represents a sustainable alternative for disease control, increasing plant vigor, improving fruit quality and yield. The first important factors in the grafting process are the anatomical compatibility and the time of establishment of vascular continuity between the two plant tissues, the latter determining the moment of transplantation. The objective of this paper was to evaluate the process of graft joining with the splicing method in tomato, by means of anatomical cuts in the attachment point; as well as to determine the time of planting time between the 'Multifort' and 'El Cid' genotypes (rootstock and graft, respectively) to synchronize the stem diameter. 100 seeds of both genotypes were sown, from these seedlings the stem diameters were measured daily. Tissue samples were taken from the graft attachment site at 5, 10 and 15 days after grafting (DDI), anatomical sections were 10 µm thick obtained with a rotary microtome. The results indicated that it is necessary to plant the graft or spike two days before the rootstock to in order to homogenize the stem diameter to 2 mm (ideal for grafting). In the images of the anatomical sections it was found that at 5 DDI the demarcation line began to be reabsorbed and at the same

* Recibido: febrero de 2017
Aceptado: mayo de 2017

de demarcación comenzó a reabsorberse y al mismo tiempo dio inicio la formación de nuevo tejido de conducción (xilema y floema), la completa conexión vascular se llevó a cabo a los 10 DDI.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum* L., continuidad vascular, portainjerto/injerto.

Introducción

El uso de plántulas injertadas en la producción de hortalizas es una técnica nueva, comparada con su uso en especies frutales. En los últimos años ha tomado importancia en el control de factores estresante en la producción de jitomate (*S. lycopersicum* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), sandía (*Citrullus lanatus* Thunb) y melón (*Cucumis melo* L.) (Fernández *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2013). Para promover el crecimiento, mejorar características agronómicas e incrementar la tolerancia y resistencia a factores bióticos y abióticos (Colla *et al.*, 2006; Colla *et al.*, 2010; Vitale *et al.*, 2014; Edelstein y Ben-Hur, 2015; Velasco *et al.*, 2016). Sin embargo, para obtener al máximo los beneficios del uso de plántulas injertadas es necesario el estudio de la interacción portainjerto/injerto; tales como la compatibilidad anatómica para determinar el tiempo de prendimiento y nivel del establecimiento vascular, además de conocer el efecto sobre el vigor de la planta que es expresado a través de las variaciones en el crecimiento, rendimiento y calidad de fruto (Teruo y Hiromichi, 1994).

La evaluación sobre el prendimiento del injerto en hortalizas permite conocer el tiempo necesario para el restablecimiento vascular y realizar el trasplante, lo ideal es que este evento sea rápido, pues una vez dada la continuidad vascular se inicia la conducción de agua, nutrimentos y sustancias orgánicas entre materiales, así la nueva planta puede reanudar su crecimiento y desarrollo (Turquois y Malone, 1996). Este proceso es complejo y consiste primero en la formación de tejido de callo seguido del restablecimiento de un sistema vascular funcional (Fernández *et al.*, 2004). Se ha mejorado el porcentaje de prendimiento de plántulas injertadas en hortalizas, mediante el conocimiento de las condiciones ambientales ideales en la fase postinjerto como son la temperatura, humedad relativa y luminosidad; factores que favorecen la división celular y la rápida formación de callo. También el uso de clips especiales para la sujeción del punto de unión mejora el éxito del prendimiento y facilita el trabajo (Lee y Oda, 2003).

time the formation of new conduction tissue (xylem and phloem) began, the complete vascular connection was carried out at the 10 DDI.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., rootstock/graft, vascular continuity.

Introduction

The use of grafted seedlings in the production of vegetables is a new technique, compared to its use in fruit species. In recent years it has become important for the control of stressful factors in the production of tomato (*S. lycopersicum* L.), pepper (*Capsicum annuum* L.), watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb) and melon (*Cucumis melo* L.) (Fernández *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2013). To promote growth, improve agronomic traits and increase tolerance and resistance to biotic and abiotic factors (Colla *et al.*, 2006; Colla *et al.*, 2010; Vitale *et al.*, 2014; Edelstein and Ben-Hur, 2015; Velasco *et al.*, 2016). However, in order to maximize the benefits of using grafted seedlings, it is necessary to study the rootstock/graft interaction; such as anatomical compatibility to determine the time and vascular establishment level, as well as to know the effect on plant vigor that is expressed through variations in growth, yield and fruit quality (Teruo and Hiromichi, 1994).

The evaluation of the grafting fixation in vegetables allows to know the time necessary for vascular reestablishment and transplantation, ideally, this event should be rapid, since once the vascular continuity is established, the conduction of water, nutrients and organic substances begins between materials, thus the new plant can resume its growth and development (Turquois and Malone, 1996). This process is complex and involves first the formation of callus tissue followed by the restoration of a functional vascular system (Fernández *et al.*, 2004). The percentage of stackage of plantlets grafted on vegetables has been improved, by knowing the ideal environmental conditions in the post-graft phase such as temperature, relative humidity and luminosity; factors that favor cell division and the rapid formation of callus. Also the use of special clips for the attachment of the join point improves the stackage success and facilitates the work (Lee and Oda, 2003).

Commercial tomato rootstocks, in most cases, have a faster seedling growth than those of the graft or spike; product of heterotic effect of the cross between a wild relative of tomato

Los portainjertos comerciales de jitomate, en la mayoría de los casos, tienen un crecimiento de las plántulas más rápido que las del injerto o púa; producto del efecto heterótico de la cruce entre un pariente silvestre del jitomate con una línea del cultivado; por lo que es necesario homogenizar el diámetro de tallo, mediante la siembra anticipada del genotipo que funciona como injerto; ya que al tener tallos con diámetros parecidos es más fácil hacer coincidir las partes cortadas, de tal manera que, una porción considerable de las regiones cambiales queden en contacto y se dé la cohesión entre portainjerto/injerto (Andrews y Márquez, 1993; Hartmann *et al.*, 2002), consecuentemente mayor éxito en el prendimiento. Obtener diámetro de tallo similares al momento de injertar es indispensable cuando el proceso de injerto se realiza de manera mecanizada con el uso de robots (Kubota *et al.*, 2008). Con el propósito de investigar y generar información sobre las nuevas técnicas de producción del jitomate, como lo es el injerto, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el tiempo de desfasamiento de la siembra entre el portainjerto e injerto y describir el proceso de unión con el método de empalme en jitomate, mediante cortes anatómicos, para determinar el tiempo del restablecimiento vascular, que indica el momento ideal del trasplante.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en un invernadero con cubierta de polietileno (calibre 600; 80% de transmisión de luz), tipo túnel con ventila cenital ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste a 2 240 msnm), en el ciclo primavera-verano de 2013. Dentro del cual se construyó una cámara de prendimiento con polietileno (calibre 600, 4 m de largo x 3 m de ancho x 2 m de altura), en el interior se colocaron ocho microaspersores (gasto de 0.00833 L s⁻¹). Se tuvieron las siguientes condiciones durante el día: temperatura promedio de 25 °C, HR de 80 a 100% y densidad de flujo fotónico de 111 μmol m⁻² s⁻¹. La frecuencia de aspersión se disminuyó gradualmente, los primeros tres días después de la injertación (DDI) los microaspersores se accionaron 1 s/min; los siguientes 3 días, 1 s/3 min y finalmente 1 s/8 min.

El portainjerto fue el híbrido interespecífico 'Multifort' (*Solanum lycopersicum* x *S. habrochaites*) recomendado para cultivo sin suelo y ciclo corto, el cual tiene alta productividad y equilibrio entre crecimiento vegetativo

with a cultivated line; so it is necessary to homogenize the stem diameter, by the early sowing of the genotype that functions as a graft; since when having stems with similar diameters it is easier to match the cut parts, so that a considerable portion of the cambial regions are in contact and cohesion between rootstock/graft is given (Andrews and Márquez, 1993; Hartmann *et al.*, 2002), and consequently a more successful engraftment. Getting a similar diameter stem when grafting is necessary if the grafting process is performed with the use mechanized robot (Kubota *et al.*, 2008). In order to investigate and generate information on the new production techniques of tomato, such as grafting, this paper had as objective to determine the gap time of sowing between the rootstock and graft and to describe the join process with the splicing method in tomato, by means of anatomical cuts, to determine the time of the vascular restoration, which indicates the ideal moment for the transplant.

Materials and methods

The research was carried out in a greenhouse with polyethylene roof (600 gauge, 80% light transmission), tunnel type with overhead ventilation located at Chapingo Autonomous University (19° 29' north latitude, 98° 53' west longitude at 2 240 masl), in the spring-summer cycle of 2013. A polyethylene fishing chamber (600 gauge, 4 m long x 3 m wide x 2 m high) was built inside, eight microaspersores were placed inside (using 0.00833 L s⁻¹). Having the following conditions during the day: average temperature of 25 °C, HR of 80 to 100% and photon flux density of 111 μmol m⁻² s⁻¹. The spray frequency was gradually decreased, the first three days after grafting (DDI) the micro sprinklers were operated 1 s/min; the next 3 days, 1 s/3 min and finally 1 s/8 min.

The rootstock was the interspecific hybrid 'Multifort' (*Solanum lycopersicum* x *S. habrochaites*) recommended for soilless cultivation and short cycle, which has high yield and balance between vegetative and reproductive growth (De Ruiter SeedTM), which is also one of the rootstocks most currently used in the production of grafted tomatoes As graft the commercial hybrid 'El Cid' was used, with saladette type fruits and indeterminate growth habit (Harris MoranTM), a popular material in the production of tomato in greenhouse.

For the synchronization of stem diameter in seedlings of rootstock and graft, 100 seeds of each genotype were seeded the same day in polystyrene trays with 200 cavities with peat

y reproductivo (De Ruitter Seed™), además es uno de los portainjertos más utilizados en la actualidad en la producción de tomate injertado. Como injerto se utilizó el híbrido comercial ‘El Cid’, de frutos tipo saladette y hábito de crecimiento indeterminado (Harris Moran™), un material popular en la producción de tomate bajo invernadero.

Para la sincronización del diámetro de tallo en plántulas del portainjerto e injerto, se sembró el mismo día 100 semillas de cada genotipo, en charolas de poliestireno de 200 cavidades con peat moss (®Kekkila, Finlandia) como sustrato. Una vez emergidas las plántulas se midió diariamente el diámetro de tallo durante 23 días con un vernier digital (Mitutoyo®, In/mm profesional), conjuntamente se registró la temperatura mínima y máxima, dando un total de 427 unidades calor. Para la fertilización se utilizó la solución nutritiva universal de Steiner al 20% (Steiner, 1984), comenzó la aplicación 8 días después de la emergencia. Con los datos se realizó un análisis de regresión lineal simple con el objeto de hacer inferencia acerca del comportamiento de los datos de diámetro de tallo, con este análisis se obtuvieron los modelo matemático para el conjunto de datos de cada genotipo, la variable independiente fue número de días y la dependiente el diámetro de tallo (mm). Los términos de los modelos fueron $Y_i = \beta_1 X_i + e_i$, donde Y_i es el i -ésimo valor de la variable dependiente, X_i el i -ésimo valor de la variable independiente, β_1 la pendiente de la recta y e_i el i -ésimo valor aleatorio.

Una vez realizada la sincronización del diámetro de tallo, se sembraron 80 semillas de cada genotipo (‘Multifort’/‘El Cid’), el portainjerto fue sembrado dos días después que el injerto para obtener diámetros iguales en los genotipos. Los injertos se realizaron a los 26 días después de la siembra con el método de empalme (Lee, 1994), momento en el que las plántulas alcanzaron 9 cm de altura y 2 mm de diámetro de tallo, para la sujeción del punto de unión del injerto se emplearon pinzas especiales de silicón de 2 mm de ancho.

La fase postinjertación tuvo una duración de 15 días, durante el cual se realizaron muestreos a los 5, 10 y 15 DDI. Cada uno de estos consistió en muestrear el punto de unión de 10 plántulas injertadas, cortando 2 mm por arriba y por abajo del punto de unión. Los cuales se fijaron en FAA (50% de etanol al 96% + 5% de ácido acético glacial + 10% de formaldehído + 35% agua destilada). La deshidratación se realizó con etanol (50, 70, 96 y 100%) y la transparentación con xileno al 100%, utilizando un procesador automático

moss (®Kekkila, Finland) as substrate. Once the seedlings emerged, the stem diameter was measured daily for 23 days with a digital vernier (Mitutoyo®, In/mm professional) also the minimum and maximum temperatures were recorded, giving a total of 427 units heat. For fertilization the Steiner universal nutrient solution was used at 20% (Steiner, 1984), the application started 8 days after the emergency. With the data, a simple linear regression analysis was performed aiming of making inferences about the behavior of the stem diameter data, with this analysis the mathematical model for the dataset of each genotype was obtained, the independent variable was number of days and the dependent was stem diameter (mm). The terms of the models were, where, $Y_i = \beta_1 X_i + e_i$ where Y_i is the i -th value of the dependent variable, X_i the i -th value of the independent variable, β_1 the slope of the line and e_i the i -th random value.

Once the stem diameter was synchronized, 80 seeds of each genotype (‘Multifort’/‘El Cid’) were planted, the rootstock was planted two days after the grafting to obtain equal diameters in the genotypes. The grafts were made at 26 days after sowing with the splicing method (Lee, 1994), when the seedlings reached 9 cm in height and 2 mm in stem diameter, for the attachment of the join point, special 2 mm wide silicone clips were used.

The post-grafting phase lasted 15 days, during which samples were performed at 5, 10 and 15 DDI. Each one of them consisted of sampling the join point of 10 grafted seedlings, cutting 2 mm above and below the join point. These were fixed in FAA (50% of 96% ethanol + 5% glacial acetic acid + 10% formaldehyde + 35% distilled water). Dehydration was carried out with ethanol (50, 70, 96 and 100%) and transparency with 100% xylene using an automatic processor (Histokinette, 2000). The inclusion was made in paraffin and the tissue was cut on a rotary microtome Leica® brand (Jung Histocut 820), making 10 μ m thick cuts. The staining was performed with safranin and fast green. Photographs were taken in a Carl Zeiss® optical microscope with Canon® digital camera adapted to the microscope.

Results and discussion

According to linear regression models (Figure 1), the ‘Multifort’ rootstock stem diameter grew $0.0655 \text{ mm}^{-1} \text{ day}$ and ‘El Cid’ engraftment or spike grew $0.0593 \text{ mm}^{-1} \text{ day}$. The stem diameter ideal for the grafting process in tomato is

(Histokinette 2000). La inclusión se hizo en parafina y se cortó el tejido en un microtomo rotatorio marca Leica® (Jung Histocut 820), haciendo cortes de 10 µm de espesor. La tinción se hizo con safranina y fast green. Las fotografías se tomaron en un microscopio óptico Carl Zeiss con cámara digital Canon® adaptada al microscopio.

Resultados y discusión

De acuerdo con los modelos de la regresión lineal (Figura 1), el diámetro de tallo del portainjerto ‘Multifort’ creció 0.0655 mm día⁻¹ y el injerto o púa ‘El Cid’ creció 0.0593 mm día⁻¹. El diámetro de tallo ideal para el proceso de injerto en jitomate es de 2 mm, generalmente se obtiene a los 30 días después de la siembra (Lee *et al.*, 2010). Considerando esta recomendación y sustituyendo el valor de 2 mm en los modelos, queda de la siguiente manera:

Portainjerto ‘Multifort’

Injerto ‘El Cid’

$$Y = 0.0655x + 0.4593$$

$$Y = 0.0593x + 0.497$$

$$x = \frac{2 - 0.4593}{0.0655} = 23.5 \text{ días} \quad x = \frac{2 - 0.497}{0.0593} = 25.5 \text{ días}$$

Por lo tanto, la diferencia de días en la siembra es de 25.3-23.5= 1.8 días. Es decir, para obtener 2 mm de diámetro en ambos componentes para el injerto, se requiere sembrar aproximadamente dos días antes el genotipo como injerto ‘El Cid’ del portainjerto ‘Multifort’. Esto permitió mayor superficie de contacto entre portainjerto/injerto, mayor coincidencia de las partes cambiales, rápida cohesión entre ambos tejidos y formación de tejido de callo, estas son las consideraciones iniciales en el proceso de injerto (Hartmann *et al.*, 2002; Pina y Errea, 2005).

En jitomate la cohesión entre el portainjerto e injerto, como primer evento del prendimiento, está relacionado con la secreción de sustancias pécticas, que proporciona soporte mecánico inicial en el punto de unión (Jeffrey y Yoeman, 1983; Parkinson *et al.*, 1987). En la Figura 2a se observa la acumulación de estas sustancias y los restos de las células muertas ocasionadas por el corte, formando una línea de demarcación en la zona de unión, la tinción con fast green muestra una región más intensa.

2 mm, usually obtained at 30 days after sowing (Lee *et al.*, 2010). Considering this recommendation and replacing the value of 2 mm in the models, it stays as follows:

Portainjerto ‘Multifort’

Injerto ‘El Cid’

$$Y = 0.0655x + 0.4593$$

$$Y = 0.0593x + 0.497$$

$$x = \frac{2 - 0.4593}{0.0655} = 23.5 \text{ days} \quad x = \frac{2 - 0.497}{0.0593} = 25.5 \text{ days}$$

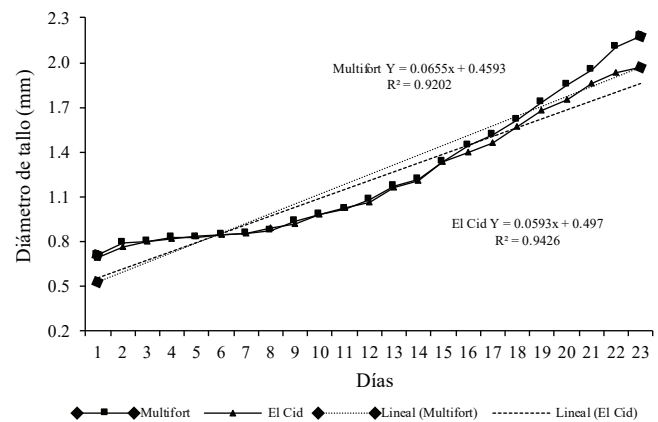


Figura 1. Diámetro de tallo del portainjerto e injerto en 23 días después de emergencia.

Figure 1. Stem diameter of the rootstock and graft at 23 days after emergence.

Therefore, the difference of days in the sowing is of 25.3-23.5= 1.8 days. That is, in order to obtain 2 mm diameter in both components for grafting, it is required to plant ‘El Cid’ graft genotype about two days before the ‘Multifort’ rootstock. This allowed greater contact surface between rootstock/graft, greater overlap of cambial parts, rapid cohesion between tissue and callus tissue forming, these are the initial consideration in the grafting process (Hartmann *et al.*, 2002; Pina and Errea, 2005).

In tomato, the cohesion between the rootstock and grafting, as the first event of the join is related to the secretion of pectic substances, that provide initial mechanical support at the join point (Jeffrey and Yoeman, 1983; Parkinson *et al.*, 1987). Figure 2a shows the accumulation of these substances and the remains of dead cells caused by the cut, forming a demarcation line in the junction area, Fast Green staining shows a more intense region.

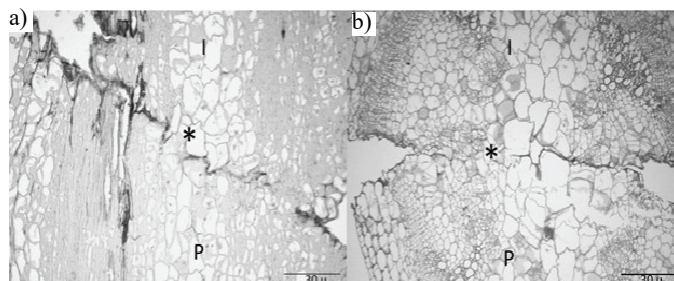


Figura 2. Diámetro de tallo del portainjerto e injerto en 23 días después de emergencia.

Figure 2. Stem diameter of the rootstock and graft at 23 days after emergence.

Conforme se va desarrollando el callo, la capa necrótica se reabsorbe gradualmente. En los cortes obtenidos se observa la reabsorción de la línea de demarcación en la inter fase a los 5 DDI, incluso en el corte longitudinal (Figura 2b) se observa que la línea de demarcación se ha reabsorbido en 50%, se aprecia al mismo tiempo el entrelazamiento de las células del porta injerto/injerto, debido al aumento en tamaño de las nuevas células del callo, esto confiere mayor resistencia mecánica en el punto de unión. En injertos de especies frutícolas la reabsorción de la línea de demarcación comienza entre dos y tres semanas después de la injertación (Parkinson *et al.*, 1987). Oda (2002) reportó en injertos de chícharo (*Pisum sativum*) la reabsorción de la línea de demarcación a los cuatro DDI.

En el presente trabajo, se observó que a los 5 DDI el punto de unión aún no se encuentra totalmente lleno, iniciando del centro hacia las periferias (Figura 2a y 2b). Sin embargo, se observó el inicio de la formación del nuevo tejido vascular. Lo cual coincide con lo reportado por Lee *et al.*, (2016), quienes encontraron una funcionalidad de 50% del tejido vascular a los 5 DDI. Por su parte, Hartmann *et al.*, 2002, indicaron que la formación del tejido de callo se da en ambos materiales (porta injerto/injerto), llenando el espacio de la inter fase y a partir de estas células parenquimáticas comienza la formación del nuevo tejido vascular.

A 10 DDI, aun cuando la línea de unión estaba presente, fue notoria la rediferenciación vascular, estableciéndose la continuidad de los elementos del xilema entre portainjerto/injerto (Figura 3a y 3b). Turquois y Malone (1996) encontraron aumento en la conexión hidráulica a 5 DDI, en otros injertos herbáceos, como el que reportó Oda (2002) en chícharo, la conexión del xilema ocurrió a 7 DDI y del floema 8 DDI.

As the callus develops, the necrotic layer is gradually reabsorbed. In the obtained sections the reabsorption of the demarcation line is observed in the inter phase at 5 DDI, even in the longitudinal section (Figure 2b), it is observed that the demarcation line has been reabsorbed in 50%, it is seen at the same time the entanglement of rootstock/graft cells, due to the increase in size of the new callus cells, this confers greater mechanical strength at the join point. In grafts of fruit species, the reabsorption demarcation line begins two to three weeks after grafting (Parkinson *et al.*, 1987). Oda (2002) reported in pea (*Pisum sativum*) grafts, the reabsorption of the demarcation line at four DDI.

In this paper, it was observed that at 5 DDI the join point is not yet fully filled, starting from the center towards the peripheries (Figure 2a and 2b). However, the initiation of the formation of new vascular tissue was observed. Which coincides with that reported by Lee *et al.* (2016), who found a 50% functionality of vascular tissue at 5 DDI. Meanwhile, Hartmann *et al.*, 2002, indicated that the formation of callus tissue occurs in both materials (rootstock/graft), filling the space of the inter phase and from these parenchymal cells it begins the formation of new vascular tissue.

At 10 DDI, even when the binding line was present, vascular redifferentiation was notorious, establishing the continuity of xylem elements between rootstock/graft (Figure 3a and 3b). Turquois and Malone (1996) found an increase in the hydraulic connection at 5 DDI, in other herbaceous grafts, such as that reported by Oda (2002) in peas, the xylem connection occurred at 7 DDI and phloem occurred at 8 DDI.

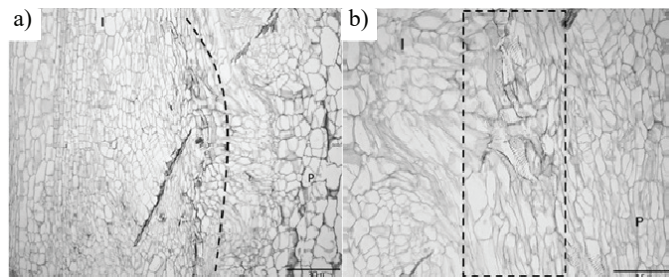


Figura 3. a) corte transversal 30 μ (10 DDI); b) corte transversal 15 μ (10 DDI); P= portainjerto; I= injerto; --- zona de rediferenciación vascular.

Figure 3. a) 30 μ cross section (10 DDI); b) 15 μ cross-section (10 DDI); P= rootstock; I= graft; --- vascular redifferentiation zone.

En la Figura 3a se puede observar la continuidad vascular, haciéndose notar que en la inter fase porta injerto/injerto los elementos del xilema se orientaron de manera oblicua. A partir de este momento el injerto estaba totalmente cicatrizado y por lo tanto, la planta era funcional. Lo cual difiere con lo reportado por Fernández-García *et al.* (2004), quienes reportaron que una plántula de jitomate injertada es totalmente funcional a los 15 DDI. En injertos de sandía (*Citrullus lanatus*), Yang *et al.*, (2016) reportaron la completa conexión a los 11 DDI.

A 10 DDI se observó una conexión más avanzada del tejido vascular, con plántulas capaces de sobrevivir sin las condiciones de la cámara de prendimiento; momento en que fue retirada la pinza de sujeción. En la Figura 3b se presenta la continuidad vascular en la región de unión, también se aprecian a los lados, restos de la línea de demarcación. Lindsay *et al.* (1974) dividió el desarrollo de la continuidad vascular en injertos de jitomate en dos fases: primera (4 DDI), intensa actividad celular y aumento del número de traqueidas en el xilema y segunda (7 DDI), la diferenciación de las traqueidas formadas en la primera fase. En injertos de otras solanácea como el pimiento (*Capsicum annuum* L.), Chang *et al.* (2012) reportaron el establecimiento vascular a los 14 DDI, tiempo requerido para realizar el trasplante. En el presente trabajo a 15 DDI la conexión vascular se observó totalmente desarrollada (Figura 4). Esto significa que el trasplante puede realizarse a partir de los 10 ó 15 DDI, sin riesgo de deshidratación o desprendimiento de los tejidos. Este proceso del restablecimiento vascular es influenciado en gran medida por la luminosidad en el periodo postinjerto (Lee *et al.*, 2016) y la temperatura nocturna en esta misma fase (Yang *et al.*, 2016)

Conclusiones

Para la combinación Multifort/El Cid se requiere sembrar dos días antes el injerto, para homogenizar el diámetro de tallo, se requiere realizar la sincronización del grosor del tallo entre portainjertos/injerto para cada combinación asar y mejorar el éxito en el prendimiento.

Después de 5 días de realizado el injerto se observó el entrelazamiento de las nuevas células del callo entre porta injerto/injerto, al mismo tiempo también se vislumbró el inicio de la reabsorción de la línea de demarcación en el punto de unión, junto con ello se identificó el inicio de la continuidad vascular, aún con funcionalidad limitada. La

Figure 3a shows the vascular continuity, noting that in the rootstock/graft interphase phase the xylem elements were oriented obliquely. From this point the graft was completely healed and therefore, the plant was functional. Which differs from that reported by Fernández García *et al.* (2004), who reported that a grafted tomato seedling is fully functional at 15 DDI. In watermelon (*Citrullus lanatus*) grafts, Yang *et al.* (2016) reported the complete connection at 11 DDI.

At 10 DDI, a more advanced connection of vascular tissue was observed, with seedlings able to survive without the conditions of the stall chamber; at that point the clamping clip was also withdrawn. Figure 3b shows the vascular continuity in the join region, on the sides the remains of the demarcation line can be observed. Lindsay *et al.* (1974) divided the development of vascular continuity in tomato grafts into two phases: first (4 DDI), intense cellular activity and increased number of tracheids in xylem and second (7 DDI), differentiation of tracheids formed in the first phase. In other solanaceous grafts such as peppers (*Capsicum annuum* L.), Chang *et al.* (2012) reported the vascular establishment at 14 DDI, time required to perform the transplant. In this paper at 15 DDI the vascular connection was observed fully developed (Figure 4). This means that the transplant can be performed from the 10 or 15 DDI, without dehydration or tissue detachment risk. The process of vascular restoration is influenced largely by the brightness in the post-grafting period (Lee *et al.*, 2016) and the night temperature in the same stage (Yang *et al.*, 2016).

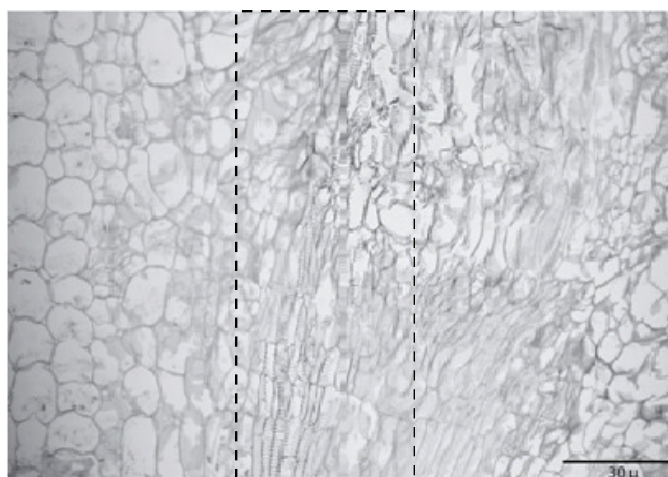


Figura 4. Corte transversal (15 DDI); --- zona de rediferenciación vascular.

Figure 4. Cross section (15 DDI); --- vascular redifferentiation zone.

completa conexión del tejido vascular se obtuvo 10 DDI, siendo también éste el momento en el que las plantas fueron capaces de sobrevivir sin las condiciones de la cámara de prendimiento, lo cual indica también, el momento en el que se puede realizar el trasplante. Los resultados de este trabajo proveen información sobre la técnica de injerto en jitomate, así como instrucciones elementales para el éxito en la obtención de plántulas injertadas de jitomate.

Literatura citada

- Andrews, K. P. and Marquez, C. S. 1993. Graft incompatibility. Horticultural reviews. John Wiley and Sons Inc. 15:467.
- Chang, Y. C.; Chen, S.; Chiu, Y. C.; Lin, L. H. and Chang, Y. S. 2012. Growth and union acclimation process of sweet pepper grafted by a tubing-grafting robotic system. Hort. Environ. Biotechnol. 53(2):93-101.
- Colla, G.; Roupael, Y. and Cardarelli, M. 2006. Effect of salinity on yield, fruit quality, leaf gas exchange, and mineral composition of grafted watermelon plants. Hortsci. 41:622-627.
- Colla, G.; Roupael, Y.; Leonardi, C. and Bie, Z. 2010. Role of grafting in vegetable crops grown under saline conditions. Sci. Hortic. 127:147-155.
- Edelstein, M. and Ben, H. M. 2015. Grafting: a useful tool to increase tolerance to toxic elements in vegetables under arid and semiarid conditions. Acta Hort. 1086:133-140.
- Fernández, G. N.; Carvajal, M. and Olmos, E. 2004. Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. Ann. Bot. 93:50-60.
- Goto, R.; de Miguel, A.; Marsal, J. I.; Gorbe, E. and Calatayud, A. 2013. Effect of different rootstocks on growth, chlorophyll a fluorescence and mineral composition of two grafted scions of tomato. J. Plant Nutr. 36:825-835.
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies, F. T. and Geneve, R. L. 2002. Plant propagation. Principles and practices, seventh ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 849 p.
- Jeffrey, C. E. and Yoeman, M. M. 1983. Development of intercellular connections between apposing cells in a graft union. New Phytol. 93:491-509.
- Kubota, C. M.; McClure, N.; Kokalis, B. M. G. and Roskopf, E. N. 2008. Vegetable grafting: history, use, and current technology status in North America. HortScience. 43(6):1664-1669.
- Lee, J. 1994. Cultivation of grafted vegetables I. Current status, grafting methods, and benefits. HortScience. 29(4):235-239.
- Lee, J. M. and Oda, M. 2003. Grafting of herbaceous vegetable and ornamental crops. In: horticultural reviews. John Wiley & Sons. USA, New York. 28:478 p.
- Lee, K. M.; Lim, C. S.; Muneer, S. and Jeong, B. R. 2016. Functional vascular connections and light quality effects on tomato grafted unions. Scientia Hort. 201:306-317.
- Lindsay, D. W.; Yeoman, M. M. and Brown, R. 1974. An analysis of the development of the graft union in *Lycopersicon esculentum*. Ann. Bot. 38:639-646.
- Oda, M. 2002. Grafting of vegetable crops. Sci. Rep. Agr. Biol. Sci. Osaka Pref. Univ. 54:49-72.
- Parkinson, M.; Jeffrey, C. E. and Yoeman, M. M. 1987. Incompatibility in cultured explant-grafts between members of the solanaceae. New Phytol. 107:489-498.
- Pina, A. and Errea, P. 2005. A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. Scientia Hort. 106:1-11.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. In: Proc. Sixth International Congress on Soilless Culture. International Soc. Soilless Culture. The Netherlands. 633-647 pp.
- Teruo, M. and Hiromichi, H. 1994. Mineral contents in melon plants (*Cucumis melo* L. cv. 'Prince') and fruit quality influenced by grafting on squash root stocks and calcium applications in soil. Environ. Contr. Biol. 32:119-123.
- Turquois, N. and Malone, M. 1996. Non-destructive assessment of developing hydraulic connections in the graft union of tomato. J. Exper. Bot. 47:701-707.
- Velasco, A. M. J.; Castro, B. R.; Castillo, G. A. M.; Avitia, G. E.; Sahagún, C. J. y Lobato, O. R. 2016. Composición mineral, biomasa y rendimiento en tomate injertado. Interciencia. 41:703-708.
- Yang, X.; Hu, X.; Zhang, M.; Jinhu, X.; Ren, R.; Liu, G.; Yao, X. and Chen, X. 2016. Effect of low night temperature on graft union formation in watermelon grafted onto bottle gourd rootstock. Scientia Hort. 212:29-34.
- Vitale, A.; Rocco, M.; Arena, S.; Giuffrida, F.; Cassaniti, C.; Scaloni A.; Lomaglio, T.; Guarnaccia, V.; Polizzi, G.; Marra M. and Leonardi, C. 2014. Tomato susceptibility to Fusarium crown and root rot: effect of grafting combination and proteomic analysis of tolerance expression in the rootstock. Plant Physiol. Biochem. 83:207-216.

Conclusions

For the Multifort/El Cid combination it is necessary to plant the grafting two days before, to homogenize the stem diameter, it is necessary to perform the synchronization of the stem thickness between rootstocks/grrafts for each combination in order to improve the success of the attachment.

After 5 days of grafting, the entanglement of the new cells of the callus was observed between the rootstock/grraft, at the same time it was observed the beginning of the reabsorption of the demarcation line at the attachment point, along with the identification of the beginning of vascular continuity, even with limited functionality. The complete connection of the vascular tissue was obtained at 10 DDI, which was also when the plants were able to survive without the conditions of the camera, indicating the moment when the transplant can be performed. The results of this paper provide information on the grafting technique in tomato, as well as basic instructions for the success in obtaining grafted tomato seedlings.

End of the English version

