

Comportamiento *in vitro* de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) I. Análisis del potencial organogenético.

Amelia Capote Rodríguez, Maribel González-Chávez Díaz y Odalys Pérez Díaz

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", INIFAT

RESUMEN

Se estudió la capacidad de regeneración *in vitro* de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. a partir de diferentes explantes cultivados en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con AIA 0,175 mg/L y BAP 1,5 mg/L. Se evaluaron como variables las formaciones de callos, callos morfogenéticos y callos con desarrollo de primordios, así como el número de vástagos por explante. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas para la interacción genotipo- explante para todas las variables analizadas. La mayor frecuencia de regeneración *in vitro* se obtiene al utilizar como explantes las hojas cotiledonales del cultivar Cubanacán- 1243 con un promedio de 12,9 vástagos/ explante. Estos resultados sugieren la posibilidad de aplicar las técnicas de cultivo *in vitro* en el mejoramiento genético de esta especie.

Palabras clave: *in vitro*, organogénesis, reguladores del crecimiento, tomate

ABSTRACT

Optimum conditions for *in vitro* plant regeneration from different cultured explants of *Lycopersicon esculentum* Mill. cultivated on MS (Murashige y Skoog, 1962) medium supplemented with AIA 0,175 mg/L and BAP 1,5 mg/L. Morphogenetic capacity was evaluated by percentage of callus induction, morphogenetic callus, bud formation and shoots/ explant. Results show different significantly for interaction genotype-explant. The best results was obtained in Cubanacán- 1243 with maximum frequency observed (12,9 shoots/ explant) in cotyledonary leaves. These results suggest the possibility to apply *in vitro* techniques in genetic improvement in this species.

Key words: *in vitro*, growth regulators, organogenesis, tomato

INTRODUCCIÓN

Las especies silvestres constituyen una importante fuente de genes de interés, principalmente para la resistencia o tolerancia a enfermedades, plagas y factores abióticos no encontrados en las especies cultivadas (Monti, 1992). En el caso específico de *L. esculentum* var. *cerasiforme*, ha sido reportada por Esquinas-Alcázar (1981) como fuente de resistencia a *Alternaria solani*, hongo causante de la enfermedad conocida como tizón temprano, endémica en todas las plantaciones de papa y tomate en Cuba, la cual provoca pérdidas considerables en los rendimientos.

Esta variedad, también denominada "tipo cereza", se considera el antepasado silvestre de las formas cultivadas y los estudios de variabilidad genética muestran la afinidad genética entre el tomate cultivado y la variedad *cerasiforme* (Nuez *et al.*, 1996). En investigaciones anteriores realizadas para evaluar el germoplasma cubano teniendo en cuenta caracteres de rendimiento e infección por el patógeno, se confirmó que variedades cultivadas de esta especie propician una fuente valiosa de resistencia a *Alternaria solani* en las condiciones naturales de Cuba (González-Chávez *et al.*, 1997).

Los híbridos sexuales entre *L. esculentum* y las especies

más estrechamente relacionadas son fáciles de obtener; sin embargo, en el caso de *L. esculentum* var. *cerasiforme*, el pequeño tamaño de sus frutos es un carácter desfavorable que debe ser mejorado a través de cruzamientos con variedades de fruto grande, cuidando conservar en las nuevas formas los caracteres de productividad y resistencia, asociaciones negativas entre caracteres de interés que dificultan el trabajo de los mejoradores (Alvárez y Torres, 1983).

Diversos estudios han demostrado que las técnicas *in vitro* pueden solucionar muchos de los problemas asociados con el mejoramiento clásico convencional (Jones, 1990), por lo que los métodos de Biotecnología Vegetal han sido propuestos para facilitar la transferencia de genes en tomate, pero ellos requieren como premisa fundamental de una eficiente regeneración a partir de las células cultivadas (Hille *et al.*, 1989).

El conocimiento y control del proceso de regeneración en las células y tejidos cultivados son requisitos previos indispensables para el uso eficiente de los métodos y técnicas *in vitro* y consecuentemente, para una utilización óptima de la genética de las células somáticas en investigaciones relacionadas con el mejoramiento y la obtención de nuevos cultivares.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad organogenética de diferentes explantes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) para determinar las potencialidades de su aplicación en posteriores programas de mejoramiento genético encaminados a la búsqueda de individuos resistentes o tolerantes a *Alternaria solani* Sor.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Material vegetal.

Se utilizaron semillas de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) que muestran diferentes grados de susceptibilidad frente al ataque del hongo *Alternaria solani*. Como cultivar altamente resistente se utilizó la var. *cerasiforme* cultivar 'Cubanacán-1243' recomendado para su utilización en programas de mejoramiento genético del INIFAT, y los cultivares 'Cuba C-2781' (altamente susceptible) y 'Campbell- 28' (comportamiento intermedio).

Las semillas se colocaron a germinar en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin suministro hormonal posterior a su desinfección en una solución de lejía comercial (5% de cloro activo) al 2% durante 15 minutos y lavado con agua destilada estéril (tres veces).

Como explantes se utilizaron segmentos de folíolos (5 x 5 mm), hojas cotiledonales (5 x 5 mm) y de hipocótilos (5 mm de longitud) obtenidos de las plántulas germinadas *in vitro* de 4 semanas de edad.

Se colocaron 5 explantes por frasco de cultivo y se realizaron tres réplicas por tratamiento. En el caso de los folíolos y las hojas cotiledonales se cultivó la parte proximal del envés en contacto con el medio de cultivo.

Los cultivos fueron mantenidos en un fotoperíodo de 14 horas luz y a una temperatura de 25 ± 2 °C.

2) Medios de cultivo.

El medio basal utilizado fue el MS suplementado con sacarosa 30 g/L y ácido indol acético (AIA) 0,175 mg/L y 6- bencil amino purina (BAP) 1,5 mg/L de, medio seleccionado con anterioridad para la regeneración de plantas a partir de folíolos de diferentes genotipos de tomate (Capote *et al.*, 2000).

3) Evaluaciones realizadas.

A los sesenta días de cultivo se evaluó la frecuencia de formación de callos, callos morfogenéticos, y callos con desarrollo de primordios expresados en porcentaje del total de explantes cultivados, y el número de vástagos por explante.

Todos los resultados fueron evaluados por un análisis de varianza de clasificación doble y las diferencias significativas determinadas mediante la prueba de Newman-Keuls al 5%, utilizando el paquete estadístico STATITCF versión 4.0, asumiendo que las diferentes respuestas obtenidas sean consecuencias de las diferencias entre los genotipos y explantes utilizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla I se observan los resultados obtenidos en el análisis de varianza para todos los índices evaluados. En todos los casos se obtuvieron diferencias significativas entre los genotipos y explantes utilizados, así como en la interacción de ambos factores, excepto para la variable formación de callos donde no se obtuvieron diferencias significativas entre los explantes seleccionados.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos para la variable formación de callos al analizar la interacción genotipo- explante. En ella se observa que la mayor capacidad de desdiferenciación de los tejidos se obtiene al emplear el genotipo 'Cuba C-2781', independiente del explante utilizado, no existiendo diferencias significativas con el cultivar 'Cubanacán-1243' cuando se cultivan los segmentos de hipocótilos y hojas cotiledonales. Las respuestas más bajas se observan en los explantes provenientes del cultivar 'Campbell-28'.

La importancia de obtener callos eficientemente es que pueden ser utilizados como una herramienta efectiva para estudiar los mecanismos de susceptibilidad y resistencia a enfermedades (Kut *et al.*, 1983) y en los esquemas de selección *in vitro* para obtener resistencia a patógenos (Illg, 1991).

Cuando analizamos los resultados obtenidos para la variable porcentaje de callos morfogenéticos (Fig. 2) se observa que los valores más altos corresponden a los cultivares 'Cuba C-2781' (hojas y hojas cotiledonales) y 'Cubanacán-1243' (hojas cotiledonales), los cuales no difieren significativamente entre sí. De nuevo se observa la baja respuesta del cultivar 'Campbell-28' al ser cultivado en condiciones *in vitro*, independientemente del explante que se utilice.

La figura 3 muestra los resultados obtenidos para la variable porcentaje de callos con desarrollo morfogenético. Al cultivar las hojas del cv. 'Cuba C-2781' se obtienen los mayores valores en los porcentajes de callos con desarrollo de brotes (90%), valor que difiere significativamente del resto de las combinaciones estudiadas, excepto para el explante hojas cotiledonales del cv. 'Cubanacán-1243' (60%).

En el resto de los tratamientos los valores son inferiores. Es notable destacar que entre estos se encuentran los

TABLA I

Análisis de varianza de los índices evaluados (** difieren significativamente al 5%).

FUENTES	GL	FORMACIÓN DE CALLOS	CUADRADOS MEDIOS		
			CALLOS MORFOGENÉTICOS	CALLOS CON PRIMORDIOS	NÚMERO VÁSTAGOS
Genotipos	2	3,90 **	2,50 **	1,91 **	147,54 **
Explantos	2	0,03 ns	1,23 **	0,68 **	179,24 **
G x E	4	0,48 **	1,03 **	0,59 **	183,28 **
Error	72	0,11	0,12	0,14	7,33

tres explantes del cultivar 'Campbell- 28', lo que evidencia una vez más el pobre comportamiento de este cultivar ante las condiciones de cultivo **in vitro**.

Al analizar los resultados obtenidos en la variable número de vástagos obtenidos (Fig. 4) se observa que la mejor respuesta se obtiene cuando se utilizan como explantes las hojas cotiledonales del cultivar 'Cubanacán-1243' (12,9 vástagos/ explante) y que los explantes provenientes del cultivar 'Campbell-28' mantienen la menor capacidad de regeneración de plantas (0,10 vástagos/ explante).

Este comportamiento del cv. 'Campbell-28' pudiera deberse a su genotipo, caracterizado por presentar un crecimiento determinado típico dado por la presencia del gen 'sp' (Villareal, 1982), el cual limita el crecimiento de la planta al presentarse estas características en las partes terminales de las ramas flores, lo que no sucede con el cv. 'Cubanacán- 1243' (crecimiento indeterminado típico) y el cv. 'Cuba C-2781' (crecimiento indeterminado intermedio).

Esta podría ser la causa de la mejor respuesta en cuanto a la regeneración de plantas **in vitro** del cultivar 'Cubanacán- 1243' con respecto a los otros cultivares estudiados.

Se ha descrito por numerosos autores la utilización de los segmentos foliares de *Lycopersicon esculentum* Mill. para la regeneración de plantas **in vitro** con diferentes fines (Evans *et al.*, 1984; Zorzoli *et al.*, 1993); sin embargo, estos resultados indican la necesidad de realizar un estudio previo para lograr la mejor respuesta **in vitro**, ya que esta depende de la interacción del genotipo con el explante que se utilice.

El hecho de que las plantas puedan regenerar fácilmente a partir de explantes foliares sugiere la factibilidad de utilizar estas técnicas para la regeneración de protoplastos obtenidos a partir del mesófilo de las hojas, lo cual es particularmente promisorio por la posibilidad que brinda la

hibridación somática (Kut y Evans, 1982) y la introducción de genes de interés (Horsch *et al.*, 1985; Mc Cormick *et al.*, 1985).

El potencial de formación de brotes de diferentes explantes de tomate ha sido estudiado con anterioridad; sin embargo, la respuesta es diferente en todos los casos, así por ejemplo se ha reportado que los explantes más apropiados han sido los hipocótilos (Gunay y Rao, 1980), las hojas (Kartha *et al.*, 1976) y las hojas cotiledonales (Schütze y Wiczorrek, 1987; Ichimura y Oda, 1995), lo cual pudiera deberse a la diferencia en los genotipos utilizados.

No obstante, en un estudio realizado para determinar los factores óptimos relacionados con la transformación de tomate, se obtuvo que los explantes hojas cotiledonales produjeron más brotes y respondieron mejor que otros explantes (hipocótilos y hojas) en el medio de regeneración MS suplementado con AIA 0,1 mg/L y BAP 1 mg/L, por lo que ha sido utilizado recientemente para la obtención de plantas transgénicas de tomate resistentes al virus del mosaico del pepino (CMV) y al hongo *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici* (AVRDC, 1998).

La regeneración de plantas de manera eficiente a partir de los cotiledones cultivados **in vitro** ha sido reportada también para la especie *L. hirsutum* (Stommel y Sinden, 1991), cuyos autores encontraron que la capacidad de formación de brotes de diferentes explantes es también evidente en callos derivados de protoplastos que regeneren brotes.

Los estudios realizados en este trabajo pueden ser utilizados en diferentes programas de mejoramiento para obtener materiales resistentes o tolerantes al ataque de patógenos, ya que debido a la decreciente variabilidad genética presente en las variedades liberadas en forma secuencial, las especies afines constituyen la fuente primordial de genes de importancia agronómica (Tanksley *et al.*, 1989).

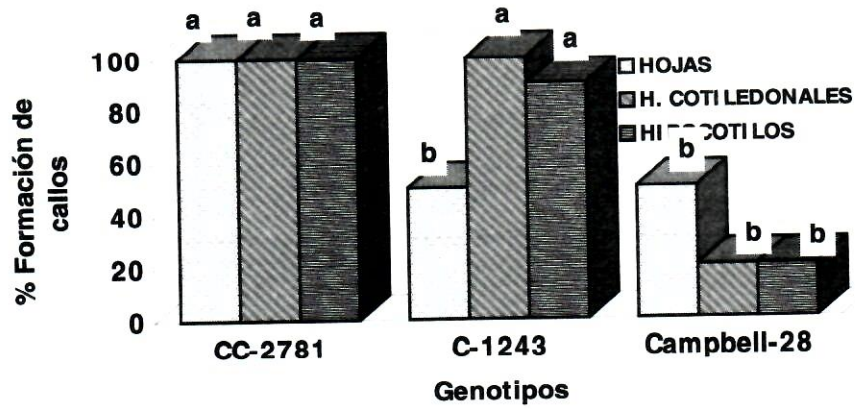


Fig. 1. Porcentajes de formación de callos según la interacción genotipo-explante. (Letras iguales no difieren significativamente al 5%).

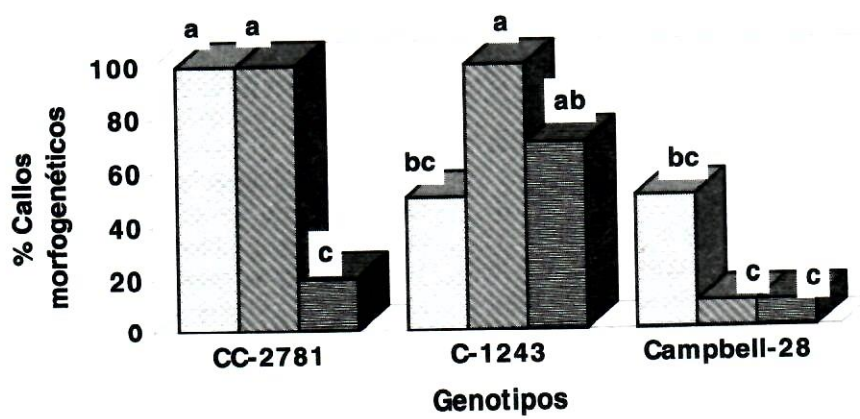


Fig. 2. Porcentajes de callos morfológicos según la interacción genotipo-explante. (Letras iguales no difieren significativamente al 5%).

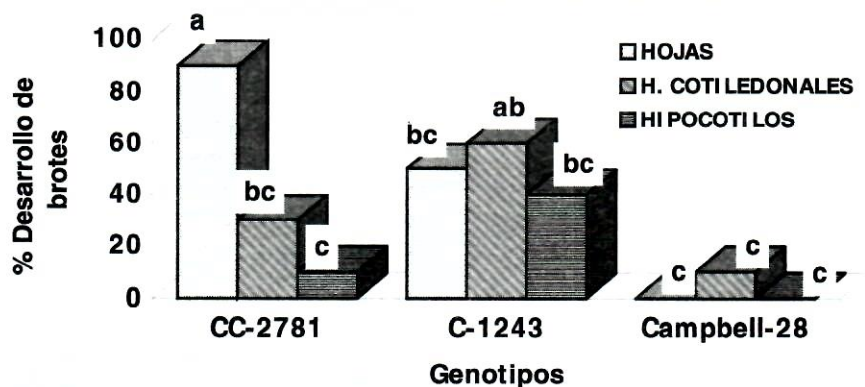


Fig. 3. Porcentaje de callos con desarrollo morfogénico obtenidos en dependencia de la interacción genotipo-explante. (Letras iguales no difieren significativamente al 5%).

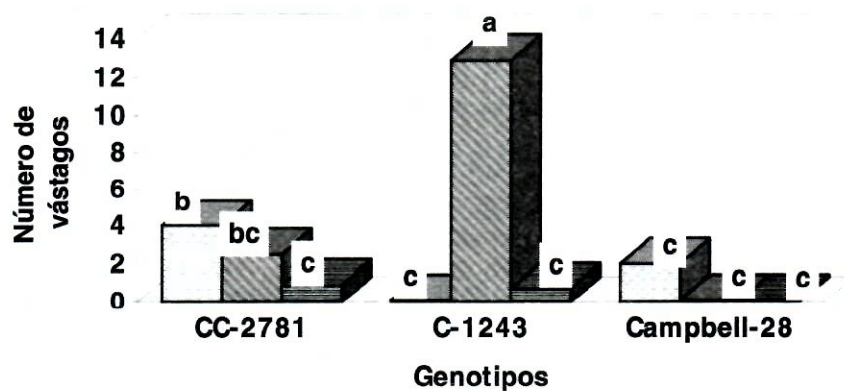


Fig. 4. Número de vástagos por explantes obtenidos en dependencia de la interacción genotipo-explante. (Letras iguales no difieren significativamente al 5%).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran el efecto de los diferentes explantes y genotipos utilizados sobre la respuesta organogénica obtenida *in vitro*, lo que evidencia la necesidad de seleccionar las mejores combinaciones para disponer de un sistema eficiente de regeneración de plantas para aplicar en futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Alvárez M y Torres V. 1983. Análisis de correlaciones de variedades y líneas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Cultivos Tropicales, 5 (1): 49-59.

AVRDC. 1998. Tomato Improvement. In: AVRDC Report 1997. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taainan, Taiwan, 61-83.

Capote A, Fundora Z y Pérez O. 2000: Efecto de diferentes factores sobre la regeneración de plantas *in vitro* a partir de folíolos de cinco genotipos de tomate. Rev. Jardín Botánico Nac., Vol. XXI, No. 1, 71- 76.

Esquinas-Alcázar, R. 1981. Genetic resources of tomatoes and wild relatives a global report. IBPGR Secretariat, Roma, Italia, 65 p.

Evans DA, Sharp WR and Medina Filho HP. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. Amer. J. Bot., 71 (6): 759- 774.

González-Chávez M, Díaz N, Fundora Z, de Armas D y Soto JA. 1997. Caracterización de la resistencia a *Alternaria solani* de cultivares nativos de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*). (En prensa).

Gunay AL and Rao PS. 1980. *In vitro* propagation of hybrid tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L.) using hypocotyl and cotyledon explants. Ann. Bot., 45 (2): 2205-207.

Hille J, Koornneef M, Ramanna MS and Zabel P. 1989. Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. Euphytica, 42: 1- 23.

Horsch RB, Fry FE, Hoffmann NL, Wallroth M, Eichholtz D, Rogers SG and Fraley RT. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science, 227: 1229- 1232.

Ichimura K and Oda M. 1995. Stimulation of shoot regeneration from cotyledon segments of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) by agar and its extract. National Research Inst. of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Ano, Mie (Japan). J. Japanese Society for Horticultural Science, 64 (1): 135-141.

Illg RD. Cultura de tecidos de alho e tomate: variação somaclonal e seleção *in vitro*. En: Crocomo OJ, Sharp WR, Melo M. Biotecnologia para produção vegetal. Piracicaba: CEBTEC/ FEALQ, 1991: 259-278.

Jones PW. *In vitro* selection for disease resistance. En: PJ Dix. Plant cell line selection. VCH, 113- 143.

Kartha KK, Gamborg OL, Shyluk JP and Constabel F. 1976. Morphogenetic investigations on *in vitro* leaf culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. Z. Pflanzenphysiol., 77 (4): 292-301.

Kut SA and Evans DA. 1982. Plant regeneration from cultured leaf explants on eight wild tomato species and two related *Solanum* species. *In vitro*, 18 (7): 593- 598.

Kut SA, Bravo JE and Evans DA. Tomato. In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Yamada Y. Handbook of plant cell culture. Vol. 3. Crop Species. McMillan Publishing Co., New York, 1983: 247-289.

Mc Cormick S, Niedermeyer J, Fry J, Barnason A, Horsch R and Fraley R. 1985. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep., 5: 81.

Monti LM. The use of wild species in crop improvement. In: Thottappilly G, Monti LM, Mohan DR, Moore AW. Biotechnology: Enhancing research on tropical crops in Africa. 1992. 55- 62.

Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473- 497.

Nuez F, Diez MJ, Pico B y Fernández de Córdova P. 1996. Germoplasma de la Universidad Politécnica de Valencia. Catálogo de Semillas de Tomate. Instituto Nacional. de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, 177 pp.

Schütze R and Wieczorrek G. 1987. Investigations into tomato tissue cultures. I. Shoot regeneration in primary explants of tomato. Archiv Züchtungsforsch., 17 (1): 3-15.

Stommel JR and Sinden SL. 1991. Genotypic differences in shoot-forming capacity of cultured leaf of *Lycopersicon hirsutum*. HortScience, 26 (10): 1317-1320.

Tanksley S, Young N, Paterson A and Boierbale P. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for old science. Bio/ Technology, 7: 145- 152.

Villareal R. 1982. Tomates. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica, 184 pp.

Zorzoli R, Bueno MS and Picardi LA. 1993. Regeneración *in vitro* a partir de anteras y folíolos en genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Hort. Arg., 8-12 (18-32): 1-7.

Recibido: 5 de septiembre del 2000.

Direcc. de los autores: *Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Calle 1 esq. 2, Santiago de las Vegas, Boyeros. CP.17200, Ciudad de La Habana, Cuba.