

# Comportamiento *in vitro* de cultivares seleccionados de tomate *Lycopersicon esculentum*. II. Estudio de la callogénesis y rizogénesis espontánea

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

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

## RESUMEN

Se estudió el efecto de diferentes genotipos, medios de cultivo y explantes sobre la inducción y crecimiento de los callos de tomate, así como la rizogénesis espontánea que se observó en cada caso. Estos parámetros se evaluaron mediante una escala de rangos para no destruir los cultivos. Los resultados obtenidos demuestran que existen diferencias significativas entre los factores estudiados para todas las variables evaluadas. En general se observaron los mejores resultados cuando se utilizan los segmentos de hipocótilos como explantes. El cultivar "Cubanacán-1243" mostró las mejores respuestas en la inducción y crecimiento de los callos. No se detectan diferencias entre los diferentes medios de cultivo, excepto para la rizogénesis espontánea. Se obtuvo una correlación negativa entre el crecimiento del callo y la rizogénesis obtenida en cada medio de cultivo.

**Palabras clave:** callogénesis, tomate, genotipos, reguladores del crecimiento, rizogénesis

## ABSTRACT

Effects of different genotypes, culture media and explants on induction and growth of tomato callus and spontaneous rhizogenesis were studied. These factors were evaluated by ranges scale for avoid destroy the cultures. The results shown significative differences among the aspects studied. The best results were observed in genotype "Cubanacán- 1243" and the segments of hypocotyls as explants. Differences didn't observed among the culture media used except to spontaneous rhizogenesis where was obtained a negative correlation with growth callus.

**Key words:** callogenesis, tomato, genotypes, growth regulators, rhizogenesis

## INTRODUCCIÓN

El potencial de aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos para la inducción de una nueva variabilidad genética y su utilización en los programas de mejoramiento vegetal ha sido ampliamente discutido (Illg, 1991; Karp, 1995; Mohan, 1998).

La inducción de tolerancia o resistencia mediante los métodos *in vitro* en las variedades comerciales, es una alternativa promisoría, debido a las dificultades para transferir caracteres de otras variedades, por los métodos convencionales de mejoramiento genético.

Muchos sistemas de cultivo de diferentes niveles de complejidad pueden ser usados como la base de una selección *in vitro* y la elección dependerá de la estrategia de selección que será aplicada y la capacidad de los cultivos para ser manipulados (Löffer & Florack, 1997).

Desde que Binding y colaboradores en 1970, demostraron que es posible seleccionar a partir de cultivos de callos, éstos han sido utilizados dentro de los programas de selección *in vitro* para búsqueda de resistencia a factores bióticos (Wenzel & Foroughi-Wehr, 1990; Toyoda & al., 1991; Ueno & al., 1994) y/o abióticos (Zamora & al., 1991; Srivastava & al., 1995).

Muchos autores estudian la resistencia de los callos propiamente, mientras que otros también toman en consideración la resistencia de las plantas regeneradas a partir de la formación de brotes adventicios directamente de un explante o en los callos seleccionados previamente (Cassells, 1998).

Sin embargo, el esquema general de las etapas a seguir en un sistema de selección *in vitro* contempla la utilización de los cultivos de callos para imponer las condiciones selectivas en el medio de cultivo, ya que éstos son más apropiados para realizar la selección (Collins & Dix, 1990), por lo que se hace imprescindible caracterizar el crecimiento de los mismos antes de iniciar cualquier trabajo en este sentido.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes factores como genotipo, explante y medio de cultivo sobre la inducción, crecimiento y rizogénesis de los callos de tomate para su posterior utilización en sistemas de selección *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1) Material vegetal:

Se utilizaron semillas de tomate *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* cv. 'Cubanacán 1243' y de *Lycopersicon esculentum* cvs. 'Cuba C 2781' y 'Campbell- 28', seleccionados por mostrar diferentes grados de

susceptibilidad frente al ataque del hongo *Alternaria solani*, según criterios de varios años de evaluación en la colección del banco de germoplasma del INIFAT (González-Chávez & al., 1997). Las mismas fueron lavadas con agua corriente y detergente comercial con la adición de 2 gotas de Tween-80 y para su desinfección fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos y lavadas con agua estéril tres veces. Posteriormente fueron sembradas en condiciones asépticas en medio Murashige & Skoog, (1962), sin suministro hormonal y 3% de sacarosa.

Los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de 14 horas luz, a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta que las plántulas desarrollaron su primer par de folíolos.

## 2) Medios de cultivo:

En condiciones asépticas se seccionaron los folíolos e hipocótilos en fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud y se sembraron en el medio MS con 3% de sacarosa, suplementado con ácido naftalén acético (ANA)  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y diferentes citoquininas: Medio M1 - 6 bencil amino purina (BAP), Medio M2 - 6 furfuril amino purina (KIN) y Medio M3 - 6 g, g, dimetil alil amino purina (2iP), todas adicionadas en una concentración de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

El pH de los medios fue ajustado a 5,8 antes de añadir el agar  $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , realizándose la esterilización en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos a 1,5 atm de presión.

Cada tratamiento (Tabla I) estuvo representado por 10 réplicas y se mantuvieron en un régimen de 14 horas luz y  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 30 días. Finalizado este período se transplantaron a los mismos medios de cultivo por igual período de tiempo. Se estableció una escala de rangos, la que se utilizó para evaluar la inducción y crecimiento de los callos, su color, su consistencia y la rizogénesis espontánea a los 30 días de cultivo (Tabla II).

## 3) Análisis estadísticos:

Los datos obtenidos se evaluaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis sobre una base factorial y los tratamientos fueron comparados por medio de la prueba de Student- Newman- Keuls. Se aplicó la correlación de Spearman para evaluar la correlación entre el crecimiento de los callos y la rizogénesis espontánea. En todos los casos se empleó el paquete de programas estadísticos TONYSTAT (Sigarroa, 1985).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla III se muestra el resultado del análisis estadístico, en el cual se observan diferencias altamente significativas en la interacción de todos los factores (Genotipo x Explante x Medio) tanto para la inducción (H: 121,784 \*\*\*) y crecimiento de los callos (H: 92,585 \*\*\*), así como para la rizogénesis espontánea obtenida (H: 48,823 \*\*\*) .

Los resultados muestran que en todos los tratamientos evaluados se obtuvo la inducción de los callos y el posterior crecimiento de los mismos obteniéndose en la mayoría de los casos diferencias significativas entre los factores en estudio.

### Inducción de callos:

En la figura 1 se observan los resultados obtenidos en la inducción de callos. Las mejores respuestas se observaron al utilizar ambos explantes del cv 'Cubanacán - 1243' independientemente del medio utilizado (tratamientos 1 al 6), existiendo solamente diferencias significativas entre el tratamiento 2 (hojas en el medio M2 suplementado con KIN).

En cuanto al cv. 'Cuba C-2781' (tratamientos 7 al 12), las mejores respuestas se obtuvieron con el explante hipocótilo, observándose diferencias entre los medios de cultivo empleados. La inducción de callos en el medio M1 (tratamiento 10) no mostró diferencias significativas con relación a las respuestas obtenidas en el cv. 'Cubanacán-1243'.

Por otra parte, el cv. 'Campbell-28' (tratamientos 13 al 18) mostró los resultados más bajos, no obteniéndose en ninguna combinación estudiada una inducción máxima o media de los callos.

Estos resultados confirman el efecto del genotipo en la inducción de callos, aspecto planteado con anterioridad por Pérez & al. (2003) quienes encontraron diferencias en el comportamiento entre las variedades de arroz estudiadas en cuanto al porcentaje de formación de callos y las características morfológicas de los mismos.

### Crecimiento de los callos:

Resultados similares se observan al analizar el crecimiento de los callos (Fig. 2.), donde de nuevo se observan los mayores valores con el cv. 'Cubanacán 1243' con relación a los otros cultivares evaluados y las mejores respuestas en el crecimiento de los callos en los explantes hipocótilos cuando se cultivan en los medios M2 y M3.

Para el cv. 'Cuba C - 2781' el crecimiento máximo fue obtenido en el medio M1 con el explante hipocotilo, el cual se ha mostrado con anterioridad apropiado para lograr un óptimo crecimiento de los callos (Rodríguez & al., 2002).

Otra vez se observó que el cv. 'Campbell 28' mostró los valores más bajos de crecimiento, resultando como promedio en todos los medios utilizados un crecimiento mínimo de los callos.

**TABLA I**

Diferentes tratamientos utilizados para evaluar el efecto del genotipo, explante y medio de cultivo en la callogénesis y rizogénesis espontánea en los cultivares estudiados.

TRATAMIENTO	GENOTIPO	EXPLANTE	MEDIO DE CULTIVO
1	Cubanacán- 1243	Hojas	M1
2			M2
3			M3
4		Hipocótilos	M1
5			M2
6			M3
7	Cuba C-2781	Hojas	M1
8			M2
9			M3
10		Hipocótilos	M1
11			M2
12			M3
13	Campbell- 28	Hojas	M1
14			M2
15			M3
16		Hipocótilos	M1
17			M2
18			M3

M1- MS + 2 mg/L ANA y 1 mg/L BAP.  
 M2- MS + 2 mg/L ANA y 1 mg/L KIN.  
 M3- MS + 2 mg/L ANA y 1 mg/L 2iP.

Según la escala de valores propuesta, los callos cuando fueron evaluados tenían un peso promedio de: 0,05 mg (explante inicial), (I) 0,25 mg (crecimiento mínimo), (II) 1,15 mg (crecimiento medio), (III) 1,75 mg (crecimiento activo) y (IV) 3,15 mg (crecimiento máximo).

Los resultados muestran un comportamiento diferente entre los genotipos utilizados. El cv. 'Cubanacán 1243' mostró los mejores resultados tanto en la inducción como en el crecimiento de los callos, correspondiendo al explante hipocótilo las mejores respuestas.

El comportamiento del cv. 'Campbell 28' en cuanto a la baja capacidad de inducción y crecimiento de los callos, coincide con la reportado por Capote & al. (2001) al estudiar la capacidad de regeneración de brotes de estos genotipos, donde se observó una respuesta muy baja (0,10 vástagos/ explante) en este cultivar, lo que pudiera deberse a su genotipo, caracterizado por presentar un crecimiento determinado típico, el cual limita el crecimiento de la planta.

En este estudio los medios suplementados con BAP (M1) y KIN (M2) resultaron superiores, tanto para la inducción como el crecimiento de los callos, con relación al medio donde se adicionó 2iP (M3). Sin embargo, se ha observado que no siempre el medio de mayor inducción corresponde al medio de mayor crecimiento,

ya que se ha demostrado que los medios difieren significativamente, indicando su influencia directa sobre el crecimiento de los callos (Prede & al., 2001).

**TABLA II**

Escala de rangos empleada para evaluar los parámetros estudiados en la obtención de callos en los diferentes cultivares de tomate.

Parámetros	Escala
Inducción	(1) Sin respuesta
	(2) Mínima
	(3) Media
	(4) Máxima
Crecimiento	(1) Mínimo
	(2) Medio
	(3) Activo
	(4) Máximo
Color	(1) Crema pálido
	(2) Pardo claro
	(3) Pardo oscuro
	(4) Verde claro
Consistencia	(1) Friable
	(2) Compacto
Rizogénesis espontánea	(1) Nula
	(2) Mínima (1-5 raíces)
	(3) Media (5- 10 raíces)
	(4) Máxima (más de 10 raíces)

De las hormonas empleadas para la obtención de callos de tomate, las combinaciones de ANA y BAP muestran una excelente capacidad para inducir la formación de los mismos, aunque las concentraciones óptimas de estas hormonas varían en dependencia del cultivar utilizado. Así está planteado, que los tejidos cultivados pueden desarrollar callos en dependencia de la composición del medio (especialmente el balance hormonal), las condiciones de cultivo y factores tales como el genotipo de la planta donante, pudiéndose utilizar como explante cualquier órgano o tejido (Hille & al., 1989).

La tabla IV muestra los resultados obtenidos para los caracteres color y consistencia de los callos según las variantes estudiadas. En ella se observa que el color de los mismos va desde un crema hasta un pardo oscuro y solamente los callos obtenidos al cultivar los segmentos de hipocótilos del cv. 'Cubanacán 1243' en el medio M1 muestran una coloración verde claro. Esta variación en el color y textura de los callos, así como en la capacidad morfogénica de los mismos se debe en gran medida al genotipo utilizado (George, 1993). Por otra parte, se ha planteado que los callos que presentan color oscuro pierden su potencial organogénico, lo cual es un síntoma de senescencia en el cultivo del tomate (Cappadocia & Ramulu, 1980).

En todos los casos, los callos mostraron una consistencia compacta, aspecto positivo si se tiene en cuenta que Vnuchkova (1977) observó que solamente los callos de tomate más densos obtenidos en las concentraciones más altas de hormonas pueden ser inducidos a formar brotes.

Por su parte, Ali & Shijun (1994) plantearon que la presencia de los diferentes reguladores del crecimiento revela una gran variación en la formación de callos, tamaño, color y dureza de los mismos en los diversos genotipos de tomate utilizados, lo cual coincide con nuestros resultados.

### Rizogénesis espontánea:

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la inducción espontánea de raíces mostró diferencias altamente significativas (H: 48,823 \*\*\*) entre los factores estudiados (Tabla III).

El mayor valor de inducción de raíces se obtuvo con los explantes hojas del cultivar 'Cubanacán- 1243' cultivados en el medio M3, el cual difiere significativamente del resto de los tratamientos (Fig. 3.).

En general, se observa que los tratamientos 6, 12 y 18 (Tabla I) muestran los mayores valores de inducción de raíces, los cuales corresponden al medio suplementado con 2iP (M3).

Al calcular el coeficiente de Spearman entre los valores obtenidos de rizogénesis en los diferentes medios de cultivo utilizados se encontró una correlación negativa en todos, pero resultó solamente significativa para el medio M3 (Tabla V), donde se observa un menor crecimiento, lo que demuestra que tanto la inducción como el crecimiento de los callos se ve reducida en medios que estimulan la inducción de raíces.

Los cultivos de tejidos de tomate presentan una relativa autonomía en cuanto a la diferenciación de raíces se refiere (Coleman y Greyson, 1977) cuestión que no siempre resulta deseable, sobre todo cuando se desea utilizarlos en experimentos donde se requiere el uso del tejido indiferenciado. Se plantea que esa autonomía es debida a las altas concentraciones de auxinas endógenas presentes en estas plantas (Kantha & al., 1976).

Es de gran utilidad evaluar el crecimiento de los callos y otras características de los mismos con el empleo de una escala de rangos y con un análisis biométrico adecuado sin necesidad de destruir los cultivos, para su futura utilización en otras investigaciones (González, 1984).

**TABLA III**

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación de los callos obtenidos en los diferentes tratamientos según los parámetros estudiados. (\*\*\*) diferencias significativas  $p < 0.01$ .

Parámetros	Valores de H y su significación		
	Inducción	Crecimiento	Rizogénesis
Genotipos	84,178 ***	55,495 ***	0,587 ns
Medios	0,802 ns	0,854 ns	22,409 ***
Explantos	8,477 **	15,4308 ***	7,6523 **
Genotipo x Explante	96,619 ***	91,089 ***	21,863 ***
Genotipo x Medio	91,216 ***	59,398 ***	24,169 ***
Medio x Explante	4,957 ns	17,155 ***	72,621 ***
Genotipo x Medio x Explante	121,784 ***	92,585 ***	48,823 ***

**TABLA IV**

Variaciones obtenidas en el color y consistencia de los callos de tres cultivares de tomate bajo las diferentes condiciones evaluadas.

Genotipo	Explante	Medio	Color del callo	Consistencia del callo
Cubanacán 1243	Hojas	M1	Crema	Compacto
		M2	Crema	Compacto
		M3	Pardo oscuro	Compacto
Cuba C 2781	Hipocótilos	M1	Verde claro	Compacto
		M2	Crema	Compacto
		M3	Crema	Compacto
	Hojas	M1	Crema	Compacto
		M2	Pardo oscuro	Compacto
		M3	Crema	Compacto
Campbell 28	Hipocótilos	M1	Pardo oscuro	Compacto
		M2	Pardo claro	Compacto
		M3	Crema	Compacto
	Hojas	M1	Crema	Compacto
		M2	Pardo oscuro	Compacto
		M3	Pardo oscuro	Compacto
	Hipocótilos	M1	Crema	Compacto
		M2	Pardo oscuro	Compacto
		M3	Crema	Compacto

A través de nuestro trabajo se evidencia que es posible utilizar la escala de rangos para evaluar otros parámetros, como es la rizogénesis espontánea, sin afectar los cultivos, lo que permite su aplicación en investigaciones relacionadas con la inducción y crecimiento de los callos en los trabajos de selección *in vitro*, ya que éstos pueden ser usados como una herramienta efectiva para estudiar los mecanismos de resistencia y susceptibilidad a las enfermedades (Jones, 1990).

**TABLA V**

Coefficientes de rangos de Spearman calculados para el crecimiento de los callos y la rizogénesis espontánea en los cultivares de tomate estudiados.

Medio de cultivo	$r_s$	Significación ( $p < 0,05$ )
<b>M1</b>	-0,2811	Ns
<b>M2</b>	-0,1490	Ns
<b>M3</b>	-0,4537	*

**CONCLUSIONES**

- Se demostró que existen diferencias en la inducción y crecimiento de los callos en dependencia de factores como genotipo, tipo de explante y medio de cultivo empleado.
- En los medios de menor inducción de raíces se estimula la mayor inducción y crecimiento de los callos.
- Los resultados obtenidos permiten caracterizar el comportamiento de los callos de tomate obtenidos bajo diferentes condiciones, lo cual facilita su utilización en posteriores estudios de selección *in vitro*.

**BIBLIOGRAFÍA**

Ali Y y Shijun L. 1994. Effect of various growth regulators (ZT, IAA and BA) on the initiation, size, colour and differentiation of callus in different genotypes of tomato. *Sarhad J. of Agriculture (Pakistan)*, 10 (4): 399- 405.

Cassells AC. 1998. *In vitro*-induced mutations for disease resistance. In: Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. S.M. Jain; D.S. Brar y B.S. Ahloowalia. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. Vol.32. Berkshire. U.K., 367- 378.

Cappadocia M & Ramulu KS. 1980. Plant regeneration from *in vitro* cultures of anthers and stem internodes in an interspecific hybrid, *L. esculentum x L. peruvianum* Mill. and cytogenetic analysis of the regenerated plants. *Plant Sci. Lett.*, 20: 157- 166.

Capote A, González-Chávez M & Pérez O. 2001. Comportamiento *in vitro* de cultivares seleccionados de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) I. Análisis del potencial organogénico de diferentes explantes. *Revista Jardín Bot. Nac. Univ. Habana*, 22: 253- 259.

Coleman WR y Greyson RI. 1977. Analysis of root formation in leaf of *Lycopersicon esculentum* Mill cultured *in vitro*. *Ann. Bot.*, 41: 307- 320.

Collins HA & Dix PJ. 1990. Culture systems and selection procedures. In: *Plant cell line selection. Procedures and applications*. P.J. Dix (ed.) VCH, Germany, 3- 15.

George EF. 1993. Factors affecting growth and morphogenesis. I. Genotype and the physical environment. In: *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology*. Exegetics. 2<sup>nd</sup> Edition, 183- 218.

González S. 1984. Evaluación cualitativa del crecimiento de los callos y la regeneración de plántulas de caña de azúcar. *Revista Jar. Bot. Nac. Univ. Habana* 5(3): 81- 92.

González-Chávez M, Díaz Shagarodsky T & Alonso MC. 1997. Evaluación de la resistencia a *Alternaria solani* en cultivares primitivos de tomate. *Agrotecnia de Cuba*, 27 (2): 10- 14.

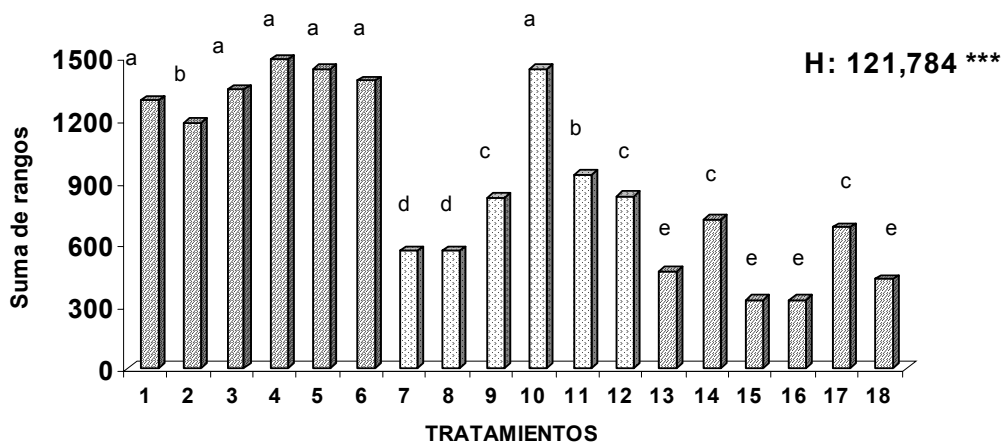


Fig. 1. Resultados de la Prueba de Student- Newman- Keuls ( $p < 0,01$ ) para la inducción de los callos de los cultivares estudiados en los diferentes tratamientos.

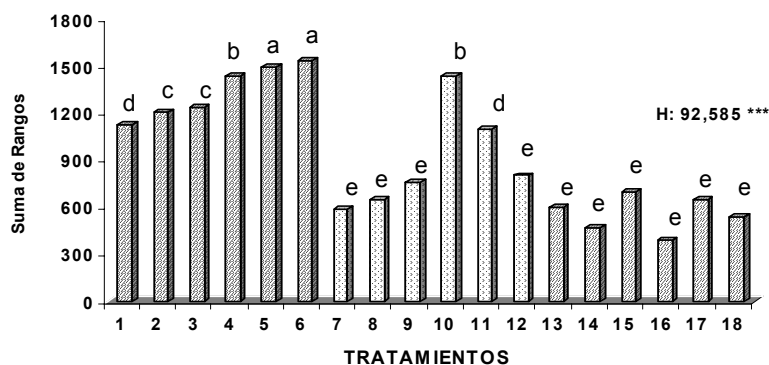


Fig. 2. Resultados de la Prueba de Student- Newman- Keuls ( $p < 0,01$ ) para el crecimiento de los callos de los cultivares estudiados en los diferentes tratamientos.

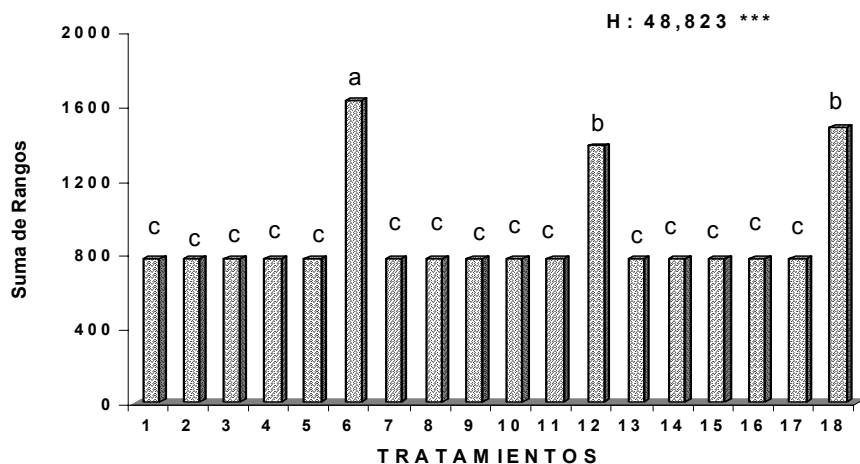


Fig. 3. Resultados de la Prueba de Student- Newman- Keuls ( $p < 0,01$ ) para la rizogénesis espontánea en los callos de los cultivares estudiados en los diferentes tratamientos.

- Hille J, Koornneef M, Ramanna MS & Zabel P. 1989. Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. *Euphytica*, 42: 1-23.
- Illeg RD. 1991. Culture de tecidos de ahlo e tomate: Variação somaclonal e seleção *in vitro*. In: Biotechnology for plant production. (O.J. Crocomo, WR Sharp y M Melo (editors). Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 259-278.
- Jones PW. 1990. *In vitro* selection for disease resistance. En: Plant cell line selection. Procedures and applications. Dix, PJ (ed.), 113-141.
- Karp A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*, 85: 295-302.
- Kartha KK, Gamborg OL, Shyluk JP y Constabel F. 1976. Morphogenetic investigation on *in vitro* leaf cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. *Z. Pflanzenphysiol*, 77 (4): 292-301.
- Löffler HJM & Florack DEA. 1997. Engineering for bacterial and fungus disease resistance. In: Biotechnology of ornamental plants. (R.L. Geneve; J.E. Preece y S.A. Merkle, editors). CAB INTERNATIONAL, 313-333.
- Mohan S. 1998. Somaclonal variation and mutagenesis in crop improvement. Resúmenes del III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal Red Bio'98, La Habana, 211.
- Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Pérez M, González A, Abreu D & Armas R. 2003. Estudio de la germinación y formación de callos de las variedades cubanas de arroz (*Oryza sativa* L.) Incuba-32, Reforma y Incuba-28. En: Memorias V Taller Internacional sobre Recursos Filogenéticos, FITOGEN'03, 2 al 4 de diciembre, Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Sancti Spiritus, Cuba, 119-120.
- Prede M, Rodríguez JB, Rodríguez L & Coronado Y. 2001. Efectividad de medios de cultivo y evidencia histológica de la morfogénesis *in vitro* durante la calogénesis en arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Jardín Bot. Nac. Univ. Habana*, 22: 261-269.
- Rodríguez AJ, Rodríguez A, López R, Pérez D, Pérez O & Marrero N. 2002. Obtención de callos de *Helianthus annuus* L. *Revista Jardín Bot. Nac. Univ. Habana*, 23: 131-136.
- Sigarroa A. 1985. *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana. Pueblo y Educación, 734 p.
- Srivastava DK, Gupta VK & Sharma DR. 1995. *In vitro* selection and characterization of water stress tolerant callus cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) *Indian J. Plant Physiol.* (India), 38 (2): 99-104.
- Toyoda H, Horikoshi K, Yamano Y & Ouchi S. 1991. Selection for *Fusarium* wilt disease resistance from regenerants derived from leaf callus of strawberry. *Plant Cell Rep.*, 10: 167-170.
- Ueno B, Teraoka T, Hosokawa D & Watanabe M. 1994. Biological activities of toxin produced by tomato canker bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, against tomato plant its callus cells. *Ann. Phytopatholog. Soc. of Japan*, 60 (1): 13-19.
- Wenzel G & Foroughi-Wehr B. 1990. Progeny test of barley, wheat and potato regenerated from cell cultures after *in vitro* selection for disease resistance. *Theor. Appl. Genetics*, 80: 359-365.
- Vnuchkova VA. 1977. Development of a method for obtaining regenerate tomato plants under tissue culture conditions. *Fiziol. Rast.*, 24: 1094-1100.
- Zamora AB, Lapitan VC, Pérez EC, del Rosario DA & Sumague A. 1991. Selection for calli and plant regenerants of tomato cv. Improved Pope with NaCl tolerance. *Philippine J. Crop Sci.*, 16: 34.

**Recibido:** 26 de septiembre del 2001.

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