

Efecto de diferentes factores sobre la regeneración de plantas *in vitro* a partir de folíolos de cinco genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

Amelia Capote Rodríguez, Zoila Fundora Mayor y Odalys Pérez Díaz

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT)

RESUMEN

Se estudió el efecto de diferentes medios de cultivo sobre la capacidad de regeneración del tejido foliar en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). La respuesta se determinó evaluando las variables: Tasa de Desarrollo (TD) y Tasa de Proliferación (TP). Mediante la Prueba t de Student fueron detectadas diferencias significativas entre los medios de cultivo empleados. Los mejores resultados se obtuvieron al cultivar los folíolos en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con ANA 0,175 mg/L y BAP 1,5 mg/L. El efecto de los diferentes genotipos sobre la morfogénesis fue evaluado por las variables anteriores y el Porcentaje de Callos (PC). Los resultados se evaluaron por un Análisis de Varianza (ANOVA) de clasificación simple y se determinó la repetibilidad del carácter. Las variables Porcentaje de Callos y Tasa de Desarrollo resultaron ser caracteres más estables que la Tasa de Proliferación. Esta última varía en dependencia del genotipo utilizado.

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum*, regeneración, genotipos, *in vitro*, cultivo de tejidos

ABSTRACT

The effect of different culture media on the regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaf tissue was studied. The response was determined by the evaluation of the rate of: Development (TD) and Prolificity (TP). Significant differences between the employed culture media were found using the t Student test. The best results were obtained when the leaflets were cultivated on MS (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with ANA 0,175 mg/L and BAP 1,5 mg/L. The effect of different genotypes on morphogenesis was evaluated by the same rates and the Calli Percentage (PC). Results were evaluated by a variance analysis of single classification and the repetibility of the character was determined. PC and TD were more stable than TP, which varies depending on the genotype used.

Key words: *Lycopersicon esculentum*, regeneration, genotypes, *in vitro*, tissue culture

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) constituye la principal especie hortícola en Cuba; no obstante, su producción resulta insuficiente por lo que se están desarrollando programas de mejoramiento genético para obtener variedades con mayores rendimientos y adaptabilidad. Dentro de éstos las técnicas de cultivo *in vitro* constituyen una valiosa herramienta por las perspectivas que ofrece en el mejoramiento de las especies vegetales.

La regeneración directa de plantas a partir de segmentos foliares en tomate ha sido reportada por diversos autores (Kantha *et al.*, 1976; Behki y Lesley, 1980; Kut y Evans, 1982; Zorzoli *et al.*, 1989-1993), brindando una excelente vía para su aplicación en la selección *in vitro* para obtener resistencia a factores bióticos y/o abióticos (Evans, 1985), así como su utilización para la introducción de caracteres deseables en genotipos seleccionados mediante las técnicas de ingeniería genética (Horsch *et al.*, 1985).

Se conoce que la capacidad organogénica en tomate es un carácter complejo que resulta de la interacción de diferentes factores siendo los de mayor importancia la combinación de reguladores del crecimiento adicionados a los medios de cultivo, y el genotipo utilizado (Behki y

Lesley, 1976).

El objetivo del presente trabajo es demostrar el efecto de diferentes medios de cultivo y genotipos sobre la capacidad de regeneración *in vitro* de tejidos foliares de diferentes genotipos de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de diferentes líneas promisorias de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (G1, G2, G3, G4 y G5) seleccionadas para incluir en los programas de mejoramiento genético.

Las semillas fueron previamente lavadas con agua y detergente comercial con dos gotas de Tween-80 (1 hora) y sumergidas en una solución de lejía comercial al 2% durante 15 minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril por tres veces.

Para la germinación *in vitro* se empleó un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) sin la adición de reguladores del crecimiento.

Los folíolos provenientes de las plántulas de 10 a 15 días de edad de los genotipos G3 y G4, fueron seccionados en segmentos (5 x 5 mm) y cultivados con el envés en

contacto con el medio de cultivo. Se cultivaron seis frascos por variante (5 explantos/ frasco).

Se utilizó el medio MS con la adición de sacarosa 30 g/L y ácido indol acético (AIA) 0,175 mg/L y se suplementó con 6- bencil amino purina (BAP) 1,5 mg/L (Medio 1) y 2,25 mg/L (Medio 2). El pH de los medios fue ajustado en todos los casos a 5,8 con HCl o NaOH previo a la adición de agar (7 g/L) y los mismos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

El cultivo se realizó en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 14 horas luz y una temperatura de (25 ± 2) °C. A las ocho semanas de cultivo se evaluó la capacidad de regeneración de vástagos según las siguientes variables propuestas por Zorzoli *et al.* (1992): Tasa de Desarrollo (TD): número de folíolos desarrollados en función del número de folíolos cultivados (considerándose folíolos desarrollados los que produjeron callos, primordios y/o vástagos) y Tasa de Proliferación (TP): número de vástagos por folíolos desarrollados (se considera vástago al primordio que presenta el primer folíolo expandido). Ambas variables se evaluaron estadísticamente mediante una Prueba t de Student ($p < 0,01$).

A partir de estos resultados se seleccionó el medio 1 y se evaluó el efecto de un mayor número de genotipos. Se sembraron segmentos foliares de los genotipos G1, G2, G3, G4 y G5 y se cultivaron en las mismas condiciones anteriormente descritas.

Se evaluaron las variables antes planteadas (TD y TP) y se consideró además la variable Porcentaje de Callos (PC) con el objetivo de estimar la capacidad de dediferenciación de estos tejidos.

En este caso las variables fueron analizadas por un ANOVA de clasificación simple y las diferencias significativas determinadas mediante una prueba de Newman-Keuls 5%. Se estimó además, la repetibilidad (r) para cada variable estudiada. Previo a la realización del análisis estadístico se usó la transformación $1/\sqrt{X}$ para los datos obtenidos. Todos los análisis se realizaron según el programa estadístico STATITCT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre los 45 y 60 días de cultivo fue evidente el desarrollo de los primordios caulinares y del primer folíolo expandido en los vástagos (Fig. 1). Se observó que la mayor inducción de brotes ocurrió sobre la zona de corte y la haz de los explantos, lo que coincide con lo planteado por del Valle y Raymundo (1993).

Las ventajas de cultivar los folíolos con el envés en contacto con el medio ha sido planteada anteriormente. Raymundo

et al. (1998) reportan la propagación del tomate utilizando segmentos foliares, y obtienen la mayor capacidad de regeneración (59,97 %) y un mayor número de brotes por explanto (2,44) al cultivarlos con el envés en contacto con el medio de cultivo.



Fig. 1. Desarrollo de brotes y vástagos a partir de tejido foliar de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivado en medio MS suplementado con AIA 0,175 mg/L y BAP 1,5 mg/L.

En la figura 2 se observa la respuesta morfogénica del tejido foliar de tomate obtenida en las diferentes concentraciones de BAP estudiadas. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas para TD ($t = 5,5376$ ***) y TP ($t = 3,9158$ ***) en los medios utilizados. Para ambas variables se obtuvieron los mejores resultados en el medio 1 (MS+ AIA0,175 mg/L y BAP1,5 mg/L), combinación que ha sido reportada efectiva para otros genotipos estudiados por Zorzoli *et al.* (1988).

Por otra parte, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en dependencia del genotipo utilizado; sin embargo, las diferencias genéticas para la capacidad de formación de brotes en los diversos genotipos de *Lycopersicon esculentum* han sido descritas en numerosos trabajos (Ohki *et al.*, 1978; Tan *et al.*, 1987).

Debido a los resultados anteriores se seleccionó el medio 1 (M1) y se empleó para analizar el comportamiento de un mayor número de genotipos. Los resultados mostraron que existen diferentes respuestas de éstos para todas las variables analizadas. Las variables PC (Fig. 3) y TD (Fig. 4) solamente mostraron diferencias significativas para el genotipo G5 existiendo una repetibilidad de $r = 0,73$ y $r = 0,75$ respectivamente, lo cual indica una alta estabilidad para estos caracteres.

La regeneración de brotes en genotipos de tomate está a menudo acompañada por la formación de callos sobre el explanto inicial (Hille *et al.*, 1989). Se plantea que la

formación de brotes ocurre como un resultado de la organogénesis y requiere de un período inicial de proliferación de callos el cual está estimulado por la presencia de las auxinas endógenas o por la adición de auxinas y citocininas al medio de regeneración (Kut *et al.*, 1983).

El elevado Porcentaje de Callos es un carácter de gran utilidad para los estudios de mutagénesis y resistencia a factores bióticos y/o abióticos ya que permite aplicar un alto índice de selección *in vitro* en materiales promisorios (Kut *et al.*, 1983).

Evans y Sharp (1983) demostraron que los brotes regenerados a partir de éstos a veces resultan mutagénicos, por lo que sugiere que pueden ser utilizados para introducir rápidamente variabilidad genética en este cultivo.

En la tabla I se muestra el Porcentaje de Callos que desarrollaron vástagos y el número de vástagos por explanto para cada genotipo utilizado. En ella es posible observar la influencia que ejerce el genotipo en la respuesta morfogenética del tejido foliar.

La línea G1 mostró los valores más altos de porcentaje de explantos con desarrollo de vástagos (73 %) y un número de vástagos / explanto (6,21), mientras que en la línea G5 no fue posible obtener brotes en las condiciones estudiadas.

Con relación a la variable TP se detectaron diferencias significativas entre los genotipos estudiados (Fig. 5). Esta variable mostró un valor de repetibilidad menor ($r = 0,47$) que las otras estudiadas (PC y TD) por lo que se puede asumir que es un carácter menos estable fuertemente influenciado por el genotipo utilizado.

Los genotipos G1 (1,97) y G2 (1,81) mostraron los valores más altos de TP y no difieren significativamente entre sí, lo cual permitió clasificarlos como genotipos de elevada capacidad de regeneración a diferencia de G5 que presentó muy baja capacidad (0,83). Por su parte, los genotipos G3 y G4 mantuvieron un comportamiento intermedio.

Kurtz y Lineberger (1983) encontraron diferencias genotípicas en la habilidad para regenerar brotes y el número promedio de brotes regenerados según el medio de cultivo utilizado y sus resultados mostraron que algunos cultivares producen numerosos brotes mientras que otros fueron más recalcitrantes.

Aún así, la mayoría de los laboratorios reportan solamente la inducción de uno a tres brotes/ explanto con un máximo de seis obtenido por DeLaughe y DeBruijne (1976), resultados que concuerdan con los obtenidos recientemente por Fuentes *et al.* (1998) al estudiar las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de tomate a partir de cotiledones y hojas, donde plantean la obtención de 2,75 y 3 brotes/ explanto respectivamente.

La diferente respuesta *in vitro* se debe a las interacciones existentes entre los genotipos y la composición hormonal de los medios de cultivo en la regeneración de órganos a partir de explantos de tomate (Thurling y Mullegadoo, 1988).

Los resultados de este trabajo confirman que existe variabilidad genética para la capacidad organogenética, dada por las diferentes respuestas de los genotipos estudiados reportada por otros autores (Zorzoli *et al.*, 1988) y concuerdan con la clasificación de genotipos propuesta para la regeneración *in vitro* de vástagos a partir del tejido foliar en tomate.

CONCLUSIONES

·La mayor inducción de brotes en el tejido foliar de tomate se obtuvo en el medio MS suplementado con AIA 0,175 mg/L y BAP 1,5 mg/L.

·Los resultados obtenidos corroboran la marcada influencia del genotipo en la respuesta morfogenética, lo cual nos permite mantener la clasificación de genotipos propuesta anteriormente por otros autores.

·Es factible utilizar estos resultados en investigaciones relacionadas con la selección *in vitro* a factores bióticos y/o abióticos y para la transformación genética de genotipos deseados.

TABLA I

Efecto de diferentes genotipos en la capacidad de regeneración de foliolos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

GENOTIPO	Porcentaje de explantos con vástagos	Número de vástagos/ explanto
G1	73 a	6,21 a
G2	59 a.	4,23 ab
G3	50 b	3,09 b
G4	38 c	1,57 c
G5	0,8 d	0,00 d

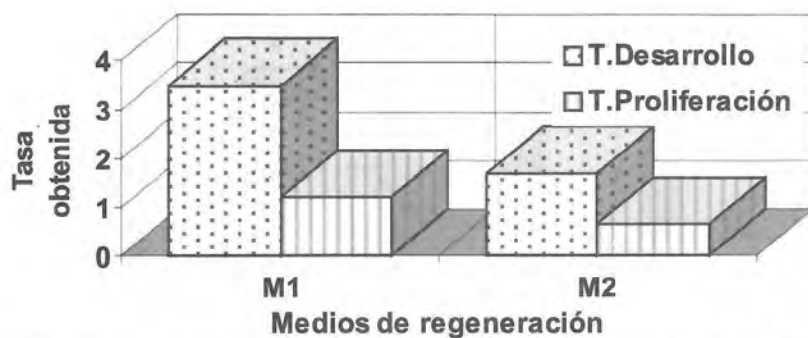
BIBLIOGRAFÍA

- Behki RM and Lesley SM. 1976. *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Lycopersicon esculentum* (tomato). Can. J. Bot. 54 (21): 2409- 2414.
- Behki RM and Lesley SM. 1980. Shoot regeneration from leaf callus of *Lycopersicon esculentum*. Z. Pflanzenphysiol. 98: 83-87.
- DeLanghe E and DeBruije E. 1976. Continuous propagation of tomato plants by means of callus cultures. Sci. Hort. 4: 221- 227.
- del Valle E y Raymundo J. 1993. Características de producción de plantas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. 'Contessa' obtenidas *in vitro*. Montecillo, México. 121 p.
- Evans DA and Sharp WR. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. Science 221: 949- 951.
- Evans DA. 1985. Practical use of *in vitro* culture generated genetic variation. In: International Symposium on nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement, Vienna, Austria. 8 p.
- Fuentes AD, Soto N, Alfonso D and Oramas P. 1998. Study of culture conditions for regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants from cotyledons and leaves of cultivar 'Campbell-28'. Resúmenes III Encuentro de Biotecnología Vegetal Red Bio'98. La Habana. 59 p.
- 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 JE, 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.
- Kartha KK, Gamborg OL, Shyluk JP and Constabel F. 1976. Morphogenetic investigations on *in vitro* leaf culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. 'Starfire') and high frequency plant regeneration. Z. Pflanzenphysiol. 77: 292-301.
- Kurtz SM and Lineberger RD. 1983. Genotypic differences in morphogenic capacity of cultured leaf explants of tomato. J. Am. Soc. Hort. Sci. 108(5): 710- 714.
- Kut SA and Evans DA. 1982. Plant regeneration from cultured leaf explants of 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 and Yamada Y. Handbook of plant cell culture. Vol. 2. Crop Species. 1983: 247- 289.
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473- 497.
- Ohki S, Bigot C and Mouseau J. 1978. Analysis of shoot-forming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids. Plant Cell Physiol. 19: 27- 42.
- Raymundo JR, Carrillo-Castañeda G y Velázquez J. 1998. Producción de vitroplantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y determinación de la producción de frutos. Biotecnología Aplicada 15(2): 77-82.
- Tan MLMC, Colijn-Hooymans CM, Lindhout WH and Kool AJ. 1987. A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. Theor. Appl. Genet. 75: 105- 108
- Thurling N and Mullegadoo K. Interactions between genotype and hormonal composition of the culture medium in relation to organ regeneration from tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissue explants. In: McWhirter KS, Downes RW and Read BJ. Ninth Australian Plant Breeding Conference Proceedings. Wagga Wagga, N.S.W. 1988: 139-140.
- Zorzoli R, Cointry EL, Prado EA, Mroginski LA y Picardi LA. 1988. Regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) por cultivo *in vitro* de folíolos. Turrialba 38 (4): 332- 336.
- Zorzoli R, Cointry EL, Prado EA, Picardi LA y Mroginski LA. 1992. Influencia del citoplasma sobre la capacidad de regeneración *in vitro* en híbridos y sus generaciones segregantes en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Agriscientia IX (2): 15- 19.
- Zorzoli R, Bueno MS y Picardi LA. 1989-93. 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: 23 de octubre de 1998.

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.

Efecto de diferentes medios de cultivo en la regeneración de folíolos.

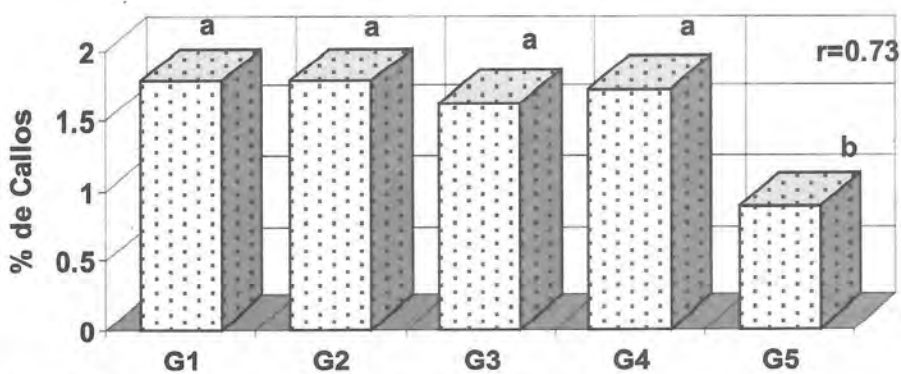


T.Desarrollo: $t=5.5376^{***}$

T. Proliferación: $t=3.9157^{***}$

Fig. 2. Efecto de diferentes medios de cultivo en la regeneración de folíolos de tomate (incluye ambos genotipos evaluados).

Inducción de callos en tejido foliar.



r: Índice de Repetibilidad.

Genotipos

Fig. 3. Variaciones en el parámetro Porcentaje de Callos (PC) al cultivar en el medio M1 los segmentos foliares de los diferentes genotipos evaluados. Letras iguales no difieren significativamente entre sí ($\alpha = 0,05$).

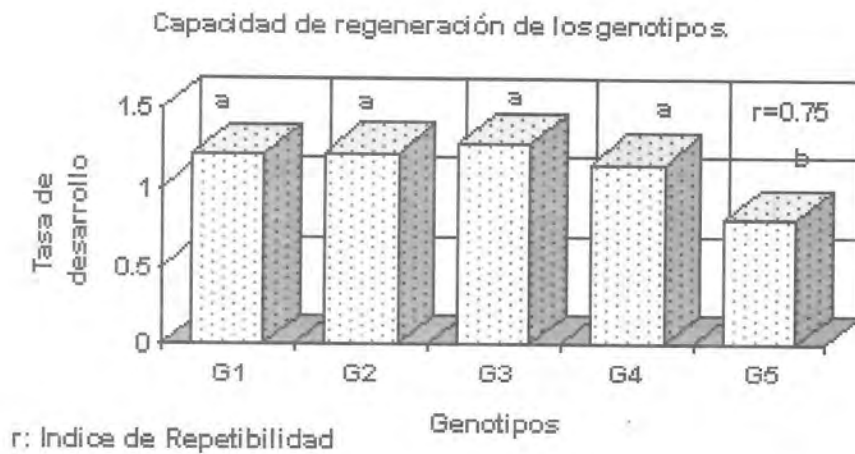


Fig. 4. Tasa de Desarrollo (TD) obtenida en los diferentes genotipos cultivados. Letras iguales no difieren significativamente entre sí ($\alpha = 0,05$).

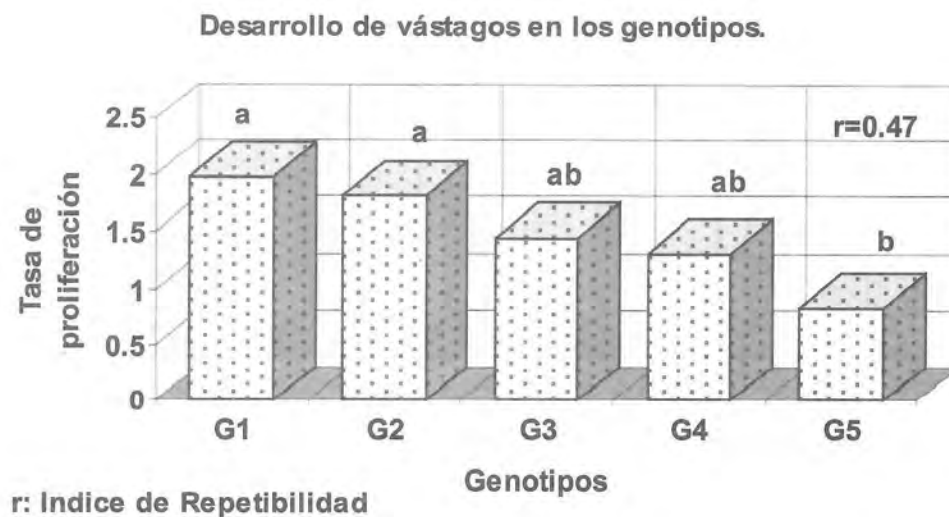


Fig. 5. Tasa de Proliferación (TP) evaluada para cada genotipo cultivado. Letras iguales no difieren significativamente entre sí ($\alpha = 0,05$).