

Regeneración de Plantas de Tomate (*Lycopersicon esculentum*) por Cultivo *In Vitro* de Folíolos¹

R. Zorzoli*, E. L. Cointry*, E. A. Prado*, L. A. Mroginski**, L. A. Picardi*

ABSTRACT

The capacity to form shoots was evaluated in five cultivars of *Lycopersicon esculentum* using folioles in different environmental conditions. The regeneration was studied in two phases of the vegetative cycle and in spring and fall seedings. The basal medium was M.S with the addition of two concentrations of growth regulators: BA 10 $\mu\text{M}/1$ + AIA 1 $\mu\text{M}/1$ and with BA 5 $\mu\text{M}/1$. The responses of the genotypes were classified according to their organogenic capacity into high, average, or low. The propagation *in vitro* of these cultivars depends upon particular conditions such as the state in which the explant is removed, the time of seeding and the concentration of the growth regulators.

COMPENDIO

Se evaluó la capacidad para formar vástagos en cultivares de *Lycopersicon esculentum*, utilizando folíolos en diferentes condiciones ambientales. La regeneración se estudió en dos etapas del ciclo vegetativo y en épocas de siembra de primavera y otoño. El medio basal fue M.S con la adición de dos concentraciones de reguladores de crecimiento: una con BA 10 $\mu\text{M}/1$ + AIA 1 $\mu\text{M}/1$ y la otra BA 5 $\mu\text{M}/1$. Las respuestas de los genotipos permitió clasificarlos en alta, mediana y baja capacidad organogénica. La propagación *in vitro* de estos cultivares depende de condiciones particulares, tales como el estado en el cual el explante se extrae, la época de la siembra y la concentración de los reguladores de crecimiento.

INTRODUCCION

Para la propagación *in vitro* de especies de importancia agronómica no sólo es necesario determinar el tipo de explante sino también las mejores condiciones para que cada genotipo regenere. Con respecto a los explantes, en *Lycopersicon* se han utilizado cotiledones, tallos (9), hipocótilos (8) y entrenudos (2). También, se ha logrado regenerar plantas a partir de callos provenientes de folíolos (1, 4, 6) Frankenberger, *et al*, (3) comprobaron que, en folíolos de tomate, las condiciones como la localización de los folíolos en la planta, porciones proximales, centrales y distales de los mismos y épocas de siembra modificaban la expresión fenotípica y la capacidad de regeneración

En el presente trabajo se indujo la regeneración de plantas en cinco cultivares de *Lycopersicon esculentum* de uso comercial en el área hortícola de Rosario, República Argentina. Se consideró el efecto de dos épocas de cultivo, dos momentos del ciclo vegetativo y diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento. El objetivo fue determinar el ambiente en el cual puede expresarse la máxima capacidad organogénica de cada uno de estos cultivares para lograr una mayor eficiencia en la producción de plantines.

MATERIALES Y METODOS

La experiencia se llevó a cabo con plantas cultivadas en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias en la localidad de Zavalla, Departamento San Lorenzo, provincia de Santa Fe, República Argentina, situado a 33° de latitud Sur. La temperatura media de los meses primaverales fue 17.9°C y la de los otoñales, 14.3°C, siendo la precipitación de 61 mm y 56.5 mm, respectivamente.

Se utilizaron los cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum*): Platense INTA (P₁), Planeuco INTA (P₂) y Platauco INTA (P₃), de hábito de crecimiento indeterminado; Marmande (M) semideterminado y Rossol Selección La Consulta (R), determina-

1 Recibido para publicación el 20 de abril de 1987. Laboratorio Facultad de Ciencias Agrarias (U.N.R.) por su apoyo técnico y al Señor Marcelo José Fusi, por su ayuda técnica en la ejecución de las fotografías. Nuestro agradecimiento al laboratorio Facultad de Ciencias Agrarias (U.N.R.) por su apoyo técnico y al Señor Marcelo José Fusi, por su ayuda técnica en la ejecución de las fotografías.

* Cátedra de Genética. Facultad de Ciencias Agrarias (U.N.R.) Santa Fe 2051. 2000 Rosario - Argentina.

** Instituto de Botánica del Nordeste (U.N.N.E.) C.C. 209. 3400 Corrientes - Argentina.

do Planeuco INTA y Platauco INTA se obtuvieron por retrocruzas con Platense INTA, por lo cual tienen un acervo genético común

Las plantas donadoras se cultivaron a campo en la época primaveral (Sp), que es el periodo normal para esta planta, en el área (setiembre-diciembre de 1984) y en la época otoñal (So) (abril-junio de 1985). Estas siembras se efectuaron en macetas de 10 cm de diámetro. Cuando las plantas alcanzaron 15 cm de altura se transplantaron. Se utilizaron como explantes folíolos de igual edad fisiológica obtenidos de la quinta hoja, contando desde el ápice. Fueron extraídos en distintos momentos del ciclo: Estado I (EI): plantas con sólo cinco folíolos y Estado II (EII): sesenta días después

Previo a la siembra *in vitro*, se eliminaron de los folíolos la zona cercana a la inserción peciolar. La desinfección se efectuó sumergiendo los folíolos en alcohol 96° (cinco segundos), seguidos de NaOCl al 4% de cloro activo con 0.1 ml de Tween -20 durante diez minutos y posteriormente lavados en agua bidestilada estéril.

Se empleó el medio básico de Murashige y Skoog (M.S) (7), con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento (4). El Medio A se suplementó con ácido indol acético (AIA) 1 μ M/l y bencil adenina (BA) 10 μ M/l y el Medio B con BA 5 μ M/l. Se agregó 1% de agar después de ajustar el pH a 5.8. Los medios se esterilizaron en autoclave a 120°C durante veinte minutos y luego se distribuyeron 10 ml de medio, en cajas de Petri estériles, de 10 cm de diámetro.

Los folíolos (1 por caja de Petri), fueron cultivados con el envés en contacto con el medio. El número de repeticiones se presenta en el Cuadro 1. La incubación se realizó en un cuarto de cultivo con un fotope-



Fig. 1. Masas callosas aparecidas a los 10 días de la siembra (2.8 x).

ríodo de 16 horas (aproximadamente, 50 micro Einstein/m². seg.) y 28°C \pm 2°C. La capacidad de regeneración de vástagos se analizó con base en: (1) porcentaje de folíolos con formación de callos y/o regeneración de plantas (%F) y (2) número promedio de vástagos (N.V) medido como VT/F (VT = número de vástagos totales con folíolos expandidos). Las variables fueron analizadas por medio de una prueba no paramétrica (X² Cuadrada).

RESULTADOS Y DISCUSION

Durante los 10 primeros días de cultivo, todos los explantes, independientemente del cultivar, sufrieron hiperplasia. Posteriormente, se formaron callosidades en puntos aislados de las hojas que presentaron coloraciones verdosas (Fig. 1). Para el porcentaje de callos no hubo diferencias significativas entre los genotipos, estando los valores entre un 30% a un 35%. Entre los 30 y 35 días, fue evidente el desarrollo de primordios caulinares, a partir de los callos así como del tejido epidérmico del folíolo. Una semana después, el 75% de los vástagos presentó el primer folíolo expandido

Cuadro 1. Número de repeticiones y plantas regeneradas por genotipos y tratamientos.

Variedades		Medio A						Medio B																	
Epocas	Momentos del ciclo	P ₁		P ₂		P ₃		M		R		Total		P ₁		P ₂		P ₃		M		R		Total	
		n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
Sp	EI	15	6	15	10	15	3	15	3	15	3	75	25	15	18	15	4	15	6	15	6	15	-	75	34
	EII	12	-	12	4	12	26	13	9	12	1	61	40	8	6	8	2	8	-	8	1	8	-	40	9
So	EI	4	7	8	35	6	18	3	-	4	-	25	60	4	3	7	10	7	-	3	2	3	-	24	15
	EII	10	3	10	4	10	5	10	1	10	4	50	17	10	7	10	5	10	11	10	4	10	-	50	26

Referencias:

n: número de repeticiones (explantes sembrados); p: número de plantas regeneradas.
Epocas: siembra primaveral Sp; siembra otoñal So
Momentos del ciclo: EI plantas con sólo 5 folíolos; EII sesenta días después

(Fig. 2). El número de plantas regeneradas para cada cultivar se muestra en el Cuadro 1. Después de 50 días de cultivo se observó, en los explantes cultivados en ambos medios, la diferenciación de raíces, lo cual permitió su traslado a tierra (Fig. 3). Sobre un total de 198 plantas regeneradas y transplantadas, debido a la acción de distintos factores no identificados, sólo el 10% sobrevivió.

Los valores de % F y de N.V. se resumen en los Cuadros 2 y 3 respectivamente. Hubo diferencias significativas para % F en Platense INTA, Planeuco INTA y Platauco INTA ($X^2_{P_1} = 5.64; p < 0.01; X^2_{P_2} = 5.9; p < 0.01; X^2_{P_3} = 24.9; p < 0.01$). Para Marmande y Rossol, no hubo diferencias entre los valores superiores. En cuanto a N.V., sólo Planeuco INTA, Platauco INTA y Rossol dieron diferencias significativas ($X^2_{P_2} = 40.96; p < 0.01; X^2_{P_3} = 5.9; p < 0.01; X^2_R = 8; p < 0.01$).

Puesto que la mayor eficiencia para la micropropagación de un determinado genotipo se logra cuando se cultivan pocos explantes *in vitro* y de ellos se obtiene un elevado número de plantas; se definió para cada genotipo la situación de regeneración más apropiada basándose en estas dos variables analizadas, como así también en el número total de plantas regeneradas (Cuadro 4). Planeuco INTA dio un mayor rendimiento en la condición So - EI - A. En Platauco INTA, a pesar del incremento en N.V. en Sp - EII - A, no se compensa la disminución del % F respecto a So - EI - A, lo cual llevó a seleccionar como óptima esta condición. Para Platense INTA, no se encontraron diferencias en N.V. entre So - EI - A y Sp - EI - B, pero, se eligió la primera por su mayor % F. El caso inverso se presentó con Rossol. Para Marmande se optó,



Fig. 2. Vástagos con primer foliolo expandido (2.8 x).

de las tres condiciones superiores para % F por la de mayor valor de N.V. Para todos los cultivares, la regeneración fue superior en el medio A.

Comparando las respuestas de los genotipos en los Cuadros 2 y 3, se les clasificó según su N.V. y % F (Cuadro 5). Planeuco y Platauco fueron genotipos de alta producción, Platense y Rossol intermedios y Marmande baja. Kurtz *et al.* (5) con otros cultivares de *Lycopersicon esculentum*, lograron una clasificación similar.

Frankenberger *et al.* (3) encontraron, en otros genotipos de tomate, una disminución en la capacidad de regeneración para la época primaveral, independientemente del hábito de crecimiento de estas plantas. En esta experiencia se logró, en el período otoñal, una mayor producción de tallos en cultivares con há-

Cuadro 2. Porcentajes de foliolos desarrollados (%F) según genotipo, medio y momentos del ciclo en dos épocas de siembra.

Medios		A						B					
Variedades		P ₁	P ₂	P ₃	M	R	n	P ₁	P ₂	P ₃	M	R	n
Epocas	Momentos del ciclo												
	Sp	EI	26.7	20.0	20.0	13.3	6.7	75	33.3	6.7	20.0	0.0	75
	Sp	EII	0.0	25.0	50.0	31.0	8.0	61	25.0	12.5	0	12.5	40
So	EI	50.0	87.5	83.3	0.0	0.0	25	25.0	42.9	0	0.0	33.3	24
	So	EII	33.3	40.0	50.0	10.0	40.0	50	33.3	20.0	50	20.0	50

Referencias:

n: número de repeticiones.

Variedades: P₁ - Platense INTA; P₂ - Planeuco INTA; P₃ - Platauco INTA; R; Rossol Selección la Consulta M; Marmande

Momentos del ciclo: EI; con sólo 5 foliolos EII; sesenta días después

Epocas de siembra: Sp; siembra primaveral So; siembra otoñal

Cuadro 3. Número promedio de vástagos (N.V) en las distintas condiciones, según el número de repeticiones especificadas en el Cuadro 1.

Medios		A					B						
Variedades		P ₁	P ₂	P ₃	M	R	P ₁	P ₂	P ₃	M	R		
Epocas	Momentos del ciclo												
		Sp	EI	1.5	3.3	1.0	3.0	1.5	3.6	4.0	2.0	2	0
			EII	0.0	1.3	4.3	2.2	1.0	3.0	2.0	0.0	1	0
So			EI	3.5	5.0	3.6	0.0	0.0	3.0	3.3	0.0	0	2
			EII	1.3	4.5	4.0	3.0	3.0	2.3	2.5	2.2	2	0

Cuadro 4. Situación de regeneración más apropiada para cada genotipo según época de siembra, momento del ciclo y medio.

Genotipos	Epocas de siembra		SP				SO				
	Momento del ciclo		EI		EII		EI		EII		
	Medios		A	B	A	B	A	B	A	B	
Platense INTA										X	
Planeuco INTA										X	
Platauco INTA										X	
Rossol											X
Marmande				X							

bito indeterminado como son Platense INTA, Planeuco INTA, Platauco INTA y en uno de hábito determinado, como es Rossol; no así en Marmande que es semideterminado.

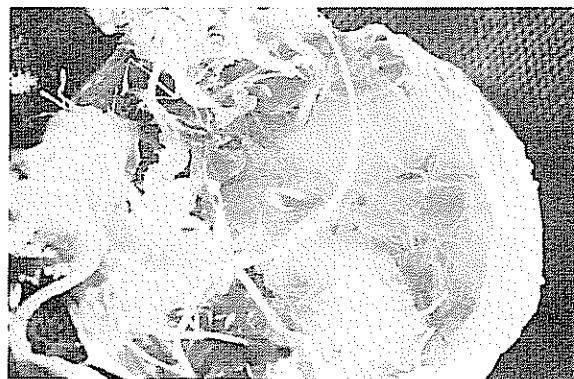


Fig. 3. Vástagos con raíces en condiciones de ser llevados a tierra (2 x).

Por otro lado, Platense, Planeuco y Platauco manifiestan una mayor producción en el Estado I. Esta coincidencia podría deberse a que los tres cultivares tienen un acervo genético común.

Si se toma el conjunto de condiciones analizadas, la situación más apropiada es la misma para los tres cultivares de hábito indeterminado (como se observa en el Cuadro 4); no así para Rossol y Marmande. Esto sugiere que podría existir una relación entre el hábito de crecimiento y las condiciones requeridas para la producción de tallos, aún cuando no se analizó toda la gama de genotipos posibles en *Lycopersicon esculentum*.

Vnuchkova (9) observó que los tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, para la diferenciación de tallos, depende de la estación del año en que se extrae el explante. En estos cultivares comerciales, las condiciones ambientales a las que fueron sometidos y la edad de la planta donante traerían como consecuencia diferentes estados hormonales. Por otro lado, se ha demostrado que habría variabilidad genética para la capacidad organogénica, dado las respuestas diferenciales de estos cultivares.

Cuadro 5. Orden de los cultivares en la condición óptima de % F y N.V.

Cultivares	N.V	% F
Planeuco INTA	5 (a)	87.5 (a)
Platauco INTA	3.6 (b)	83.3 (a)
Platense INTA	3.5 (b)	50.0 (b)
Rossol	3.0 (b)	40.0 (b)
Marmande	2.2 (c)	31.0 (c)

Entre a y b hay diferencias al 1%, al igual que entre b y c

En esta forma, se han podido definir, para cada uno de estos genotipos de uso comercial en la zona hortícola de Rosario, República Argentina, combinaciones apropiadas de factores para una eficiente producción de plantines.

CONCLUSIONES

La regeneración de vástagos fue superior en el medio con BA 10 $\mu\text{M}/\text{l}$ y AIA 1 $\mu\text{M}/\text{l}$.

Explantos obtenidos de plantas en período otoñal producen la mayor cantidad de vástagos para los genotipos Platense INTA, Platauco INTA y Planeuco INTA.

LITERATURA CITADA

1. BEHKI, R.M.; LESLEY, S.M. 1980. Shoot regeneration from leaf callus of *Lycopersicon esculentum* Zeitschrift Pflanzphysiol 98:83-87.
2. CAPPADOCIA, M.; SRES RAMULU, L. 1980. Plant regeneration from *in vitro* culture of anthers and stem internodes an interespecific hybrid, *Lycopersicon esculentum* L. x *L. peruvianum* Mill and cytogenetic analysis of the regenerated plants. Plant Science Letters 20:157-166.
3. FRANKENBERGER, E.A.; HASEGAWA, P.M.; TIGCHELAAR, E.C. 1981. Influence of environment and developmental state on the shoot - forming capacity of tomato genotypes Zeitschrift Pflanzphysiol 102: 221-232.
4. KARIHA, K.K.; GAMBORG, O.L.; SHYLUK, J.P.; CONSTABEL, F. 1976. Morphogenetic investigations on *in vitro* leaf culture of Tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill Cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. Zeitschrift Pflanzphysiol 77:293-301.
5. KURTZ, S.M.; LINEBERGER, R.D. 1983. Genotypic differences in morphogenic capacity of cultured leaf explants of tomato. Journal of the American Society for Horticultural Science 108:710-714.
6. KUI, S.A.; EVANS, D.A. 1982. Plant regeneration from culture leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species. *In vitro* 18:593-598.
7. MURASHIGE, I.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
8. OHKI, S.; BIGOT, C.; MOUSSEAU, J. 1978. Analysis of shoot forming capacity *in vitro* in two lines of tomato and their hybrids. Plant and Cell Physiology 19:27-42.
9. VNUCHKOVA, V.A. 1977. Development of a method for obtaining regenerate tomato plants under tissue culture conditions. Fiziol. Rast 24:1094-1100.