

INDUCCION DE BROTES *in vitro* A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DEL TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) HIBRIDO BLAZER

Diego Zárate Tovar, Mario Arce Montoya, Pedro Solano Vergara, Mario Gutiérrez Rodríguez, Laura Domínguez Vergara y Margarita Chávez Saldaña¹

RESUMEN

Se determinaron la combinación y las concentraciones óptimas de ácido indol-3-acético (AIA) con 6-bencilaminopurina (BAP) o cinetina (K), para la inducción de brotes *in vitro* a partir de explantes foliares del tomate híbrido Blazer. Los explantes aislados de plántulas de 10 días de edad, se cultivaron asépticamente en medio Murashige-Skoog adicionado con 0.1, 1 o 10 μ M de AIA, en combinación con 1, 5 o 10 μ M de BAP o K, bajo condiciones ambientales controladas. La combinación AIA-BAP resultó significativamente superior a la combinación AIA-K en la inducción de Brotes; y la concentración óptima fue 1 μ M para AIA y 10 μ M para ambas citoquininas.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Micropropagación, Organogénesis somática *in vitro*

SUMMARY

The best combination and concentration of indole-3-acetic acid (AIA) with 6-benzylaminopurine (BAP) or kinetin (K) were determined for the *in vitro* shoot-induction from leaf explants of the tomato hybrid Blazer. Leaf explants isolated from 10-day-

old seedlings were aseptically cultured on a Murashige and Skoog medium supplemented with 0.1, 1 or 10 μ M AIA combined with 1, 5 or 10 μ M BAP or K, under defined environmental conditions. The AIA-BAP combination was significantly better for shoot-induction than the AIA-K combination, while the best concentrations were 1 μ M for AIA and 10 μ M for both cytokinins.

ADDITIONAL INDEX WORDS

Micropropagation, *in vitro* somatic organogenesis

INTRODUCCION

En nuestro país el tomate es un importante recurso alimenticio que se cultiva a gran escala y que genera empleos y divisas por exportación. Sin embargo, existen limitaciones para el establecimiento de siembras comerciales con semillas mejoradas por su alto costo de importación, particularmente en el caso de los híbridos comerciales, los cuales no son propagables por semillas resultantes de autofecundación, debido a la disminución en el carácter de heterosis mostrada entre una generación y otra.

Por lo anterior, es necesaria la búsqueda de otras alternativas como los métodos de propagación *in vitro*, que proveen de una herramienta capaz de producir grandes cantidades de brotes adventicios a partir de ex-

¹ Laboratorio de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 04510.

plantas del tejido original, susceptibles de ser llevados a plantas maduras (Murashige, 1974).

La inducción de brotes de tomate ha sido lograda previamente, a partir de meristemos apicales, tallos, hipocotilo y hoja (Gunay y Rao, 1980; Kartha *et al.*, 1976 y 1977; Padmanabhan *et al.*, 1974; Locy, 1983). No obstante, se han observado diferencias en la respuesta de los explantes de una especie a las condiciones *in vitro*, aún en la misma variedad, por lo cual resulta necesario definir las condiciones de cultivo específicas para el material biológico empleado en la micropropagación.

Uno de los aspectos más importantes a considerar es el tipo y concentración de auxinas y citocininas en el medio nutritivo (Murashige, 1974). En este sentido, en el presente trabajo, se buscó definir la combinación y concentraciones óptimas de fitorreguladores que indujeran el mayor número de brotes por explante foliar del tomate híbrido Blazer y posibilitar así su propagación *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon semillas del tomate híbrido Blazer, las cuales fueron desinfectadas superficialmente con etanol al 70% durante 30 segundos, seguidos de hipoclorito de calcio al 10% durante 10 minutos y nuevamente colocadas en etanol al 70% durante 30 segundos, para finalizar con varios enjuagues de agua destilada estéril, de acuerdo al método descrito por Soriano (1977). Posteriormente se sembraron bajo condiciones asépticas en frascos de cultivo conteniendo 25 ml de agar bacteriológico Bioxon al 1% con pH 5.8, e incubadas durante 10 días a 26°C constantes en obscuridad.

Una vez obtenidas las plántulas, se procedió a fragmentar los folíolos en explantes de aproximadamente 2 a 3 mm, mismos que fueron sembrados en frascos de cultivo conteniendo 25 ml del medio basal Murashige-Skoog (1962) suplementado con sacarosa al 3% y agar al 1%, además de 0.1, 1 o 10 μM de AIA en combinación con 1, 5 o 10 μM de BAP o K. El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de ser esterilizado en autoclave a 1.15 kg/cm² durante 20 minutos.

Se incluyó un tratamiento testigo en el cual el medio de cultivo estaba libre de fitorreguladores. Se prepararon 10 repeticiones para cada tratamiento, con cinco explantes cada uno.

Los explantes sembrados, se mantuvieron durante 35 días en una cámara de cultivo a 26°C con iluminación constante (1000 lux), al final de los cuales se procedió a cuantificar el número de brotes por explante, considerando como brote a aquellas estructuras adventicias semejantes a tallos u hojas mayores o iguales a 0.5 cm de longitud.

RESULTADOS Y DISCUSION

A diferencia del tratamiento testigo, en el cual no hubo respuesta, en varias combinaciones de fitorreguladores se observó el inicio de proliferación celular en los explantes después de ocho días de cultivo. Después de 35 días, se apreció una mayor tendencia a la inducción de proliferación celular con los explantes cultivados en presencia de concentraciones intermedias de AIA (1.0 μM). El grado de crecimiento del callo también se encontró ligado a la concentración de BAP o K, ya que fue mayor con los niveles altos de citocinina (10 μM). La proliferación

celular formada presentó una textura granulosa, friable en las porciones más externas y compacta en las internas, con un color verde claro por lo general.

La formación de raíces inició a los ocho días de cultivo, y después de 35 días se observó que en altas concentraciones de AIA combinadas con bajas concentraciones de citocinina (BAP o K) se estimuló la formación de raíces adventicias, cuyo nivel de inducción decrecía conforme disminuía la concentración de auxina.

Después de 14 días de cultivo se observó la formación de yemas y a los 15 días la formación de brotes, generalizándose a los 21 días para la mayoría de los tratamientos. A los 35 días de cultivo se procedió al recuento de los brotes por explante en cada réplica; los valores promedio se encuentran en los Cuadros 1 y 2. El análisis de varianza a distribución libre de Kruskal-Wallis (Hollander y Wolfe, 1973), mostró diferencias significativas respecto al número de brotes inducidos por tratamiento, aún al nivel 0.001 de probabilidad.

En los Cuadros 3 y 4 se observa que el promedio de brotes formados en los explantes, representado por la suma de rangos para cada tratamiento, disminuye conforme se reducen los niveles de citocinina, tanto en el caso de la combinación de AIA-BAP como en la de AIA-K. Sin embargo, no es posible afirmar que la concentración de citocinina en el medio sea el factor decisivo en dicho comportamiento, pues cuando los explantes son cultivados en un medio adicionado con 10 μM de BAP o de K y con AIA en concentración de 0.1 μM , el número de brotes disminuye, lo que indica que la respuesta de los explantes depende del balance que guarden ambos fi-

torreguladores en el medio, como ha sido citado para otros casos (Murrashige, 1974).

La mejor respuesta para la inducción de brotes se obtuvo con los explantes cultivados en 10 μM de BAP o de K en combinación con 1 μM de AIA. Para comparar entre el efecto del tipo de citocinina en combinación con AIA, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney (Siegel, 1970), empleando los promedios del número de brotes por tratamiento. Resultó que el efecto de la combinación AIA-BAP sobre el número de brotes inducidos es significativamente superior al mostrado por la combinación AIA-K ($p \leq 0.05$), lo cual apoya las observaciones hechas en otras variedades de esta especie (Gunay y Rao, 1980; Kartha *et al.*, 1976).

CONCLUSIONES

1. La concentración óptima para la inducción de brotes *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* híbrido Blazer a partir de explantes foliares, es de 1 μM y 10 μM para la auxina y citocinina, respectivamente.
2. La combinación AIA-BAP es mejor para la inducción de brotes que la combinación de AIA-K.
3. La presencia y el adecuado balance de auxinas y citocininas en el medio de cultivo son determinantes para inducir la formación de brotes *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Lic. Jaime Saldevilla, Gerente General de SPAHSA, por la donación de las semillas certificadas de tomate híbrido Blazer (Moran Seeds Inc., USA) empleadas en el presente trabajo.

Cuadro 1. Número promedio de brotes inducidos por explantes en la combinación AIA-BAP*, a los 35 días de cultivo.

AIA (μ M)	BAP (μ M)	Repeticiones										Media	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.1	5.0	0.0	7.8	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	7.6	3.2	0.6	2.04	
0.1	10.0	0.8	7.6	0.0	0.0	8.8	1.2	5.0	4.4	0.0	2.2	3.0	
1.0	1.0	0.6	0.0	0.6	0.6	0.2	0.6	2.0	0.6	0.8	0.4	0.64	
1.0	5.0	0.8	1.2	11.2	3.8	5.4	1.0	2.2	0.4	1.4	3.0	3.04	
1.0	10.0	9.8	5.4	3.0	2.4	2.0	2.8	7.2	5.0	1.6	2.8	4.2	
10.0	1.0	0.6	0.2	2.0	0.8	1.8	1.4	0.0	0.4	0.0	0.0	0.72	
10.0	5.0	0.8	4.0	2.4	0.6	0.3	4.0	2.8	4.2	1.2	2.6	2.29	
10.0	10.0	1.0	4.4	2.8	2.0	0.8	2.0	2.2	1.4	2.2	1.8	2.06	

* Cada valor es promedio de 5 explantes.

Cuadro 2. Número promedio de brotes inducidos por explantes en la combinación AIA-K*, a los 35 días de cultivo.

AIA (μ M)	K (μ M)	Repeticiones										Media	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.02
0.1	5.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.8	0.4	2.8	1.0	0.0	0.56	
0.1	10.0	1.6	0.0	0.0	5.4	6.4	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	1.64	
1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
1.0	5.0	0.4	0.0	0.0	1.7	3.2	2.0	1.8	2.8	0.4	0.4	1.27	
1.0	10.0	1.5	2.8	3.6	3.0	2.6	3.4	0.8	5.0	1.2	6.4	3.03	
10.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
10.0	5.0	2.0	0.8	0.2	0.2	0.4	0.0	1.6	0.8	0.6	0.4	0.7	
10.0	10.0	1.0	4.4	0.8	1.2	4.0	2.4	0.0	2.0	1.8	0.6	1.82	

* Cada valor es promedio de 5 explantes.

Cuadro 3. Suma de rangos para cada tratamiento en la combinación AIA-BAP.

AIA (uM)	BAP (uM)	Rango (Rj)	Significancia estadística ¹
1	10	818.0	a
1	5	686.0	b
10	5	670.5	b
10	10	670.5	b
0.1	10	599.5	c
0.1	5	457.0	d
1	1	416.0	d
10	1	402.5	d
0.1	1	165.0	e
0	0	165.0	e

¹ Comparación múltiple de sumas de rangos de Kruskal-Wallis (p ≤ 0.05).

Cuadro 4. Suma de rangos para cada tratamiento en la combinación AIA-K.

AIA (uM)	BAP (uM)	Rango (Rj)	Significancia estadística ¹
1	10	867.5	a
10	10	748.0	b
1	5	659.0	c
10	5	624.0	c
0.1	10	530.5	d
0.1	5	492.5	d
0.1	1	303.5	e
1	1	275.0	e
10	1	275.0	e
0	0	275.0	e

¹ Comparación múltiple de sumas de rangos de Kruskal-Wallis (p ≤ 0.05).

BIBLIOGRAFIA

- Gunay, A.L. and P.S. Rao. 1980. *In vitro* propagation of hybrid tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L.) using hypocotyl and cotyledon explants. *Ann. Bot.* 45:205-207.
- Hollander, M. and D.A. Wolfe. 1973. *Nonparametric Statistical Methods*. John Wiley & Sons. New York. pp. 503.
- Kartha, K.K., S. Champoux, O.L. Gamborg, and K. Pahl. 1977. *In vitro* propagation of tomato by shoot apical meristem culture. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 102(3):346-349.
- _____, O.L. Gamborg, J.P. Shyluk, and F. Constabel. 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.
- Locy, R.D. 1983. Callus formation and organogenesis by explants of six *Lycopersicon* species. *Can. J. Bot.* 61:1072-1079.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
- _____, and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-397.
- Padmanabhan, V., E.F. Paddock and W.R. Sharp. 1974. Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. *Can. J. Bot.* 52:1429-1432.
- Siegel, S. 1970. *Estadística no Paramétrica*. Trillas. México. pp. 344.
- Soriano G., J. 1977. Aislamiento de protoplastos a partir de tejidos de jitomate. Tesis Profesional. Facultad de Química, UNAM, México. 54 p.