

# Evaluación de la capacidad de desdiferenciación y rediferenciación *in vitro* de cuatro genotipos de *Lycopersicon esculentum* Mill.

R. Zorzoli, L.A. Mroginski y L.A. Picardi

## RESUMEN

Con la finalidad de evaluar diferentes condiciones culturales para la producción de callos y la posterior regeneración se analizaron 4 genotipos de *Lycopersicon esculentum*: Planeuco INTA (P<sub>2</sub>), Rossol Selección La Consulta (R), Cal J (C) y Raci 53 (R<sub>53</sub>) en dos condiciones: luz y oscuridad. Como explanto se utilizaron folíolos. El medio basal para la producción de callos fue el MS con diferentes concentraciones de reguladores vegetales: ANA 2 mg.l<sup>-1</sup> + BAP 1 mg.l<sup>-1</sup> (MI) y ANA 1 mg.l<sup>-1</sup> + BAP 0,5 mg.l<sup>-1</sup> (MII). Los medios de regeneración tuvieron la misma base salina pero diferentes concentraciones de reguladores vegetales: BAP 2,25 mg.l<sup>-1</sup> + AIA 0,175 mg.l<sup>-1</sup> (MA) y BAP 4,5 mg.l<sup>-1</sup> + AIA 0,175 mg.l<sup>-1</sup> (MB). A los 30 días de la siembra *in vitro* se evaluó el porcentaje de callos (C). El explanto desdiferenciado se rediferenció en bajo porcentaje y esto dependió de las condiciones previas a las cuales fueron sometidos los explantos. Estos resultados permiten concluir que la inducción de organogénesis a partir de tejidos indiferenciados en las condiciones culturales probadas no permitió desarrollar un protocolo de selección *in vitro* de mutantes.

**Palabras Clave:** *Lycopersicon esculentum*, cultivo *in vitro*, desdiferenciación, rediferenciación.

R. Zorzoli, L.A. Mroginski and L.A. Picardi, 1994. Evaluation of *in vitro* de-differentiation and redifferentiation capacity of four genotypes of *Lycopersicon esculentum* Mill. Agriscientia XI : 55-60.

## SUMMARY

Four *Lycopersicon esculentum* genotypes, Planeuco INTA, Rossol Selección La Consulta, Cal J and Raci 53, were evaluated to produce callus and further regeneration. Folioli were used as explants. The basal medium for callus production was MS with different concentrations of plant regulators: ANA 2 mg.l<sup>-1</sup> + BAP 1 mg.l<sup>-1</sup> (MI) and ANA 1 mg.l<sup>-1</sup> + BAP 0.5 mg.l<sup>-1</sup> (MII). The genotypes were analysed under two environmental conditions: light and darkness. Regeneration media was the same but with different concentrations of plant regulators: AIA 0.175 mg.l<sup>-1</sup> + BAP 2.25 mg.l<sup>-1</sup> (MA) and AIA 0.175 mg.l<sup>-1</sup> + BAP 4.50 mg.l<sup>-1</sup> (MB). Ca-

llus percentage was evaluated after 30 days from *in vitro* culture. The percentage of redifferentiation was low and it depended on the previous conditions they were exposed to

**Key words:** *Lycopersicon esculentum*, *in vitro* culture, dedifferentiation, redifferentiation.

R. Zorzoli y L.A. Picardi, Cátedra de Genética - Fac. Cs. Agrarias - U.N.R. - C.I.U.N.R., CC 14 - 2123 Zavalla, Argentina. L.A. Mroginski, Instituto de Botánica del Nordeste - U.N.NE. CC 209 - 3400 Corrientes, Argentina.

## INTRODUCCIÓN

La regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos indiferenciados (callos) puede proveer germoplasma ventajoso para los programas de mejoramiento aprovechando la nueva variación provocada por el cultivo en sí mismo (variación somaclonal) (Larkin and Scowcroft, 1982). Desde que se reconoció la importancia potencial de este fenómeno se han publicado numerosos trabajos sobre el tema. La selección *in vitro* de mutantes a nivel de callo requiere de un sistema efectivo de iniciación, mantenimiento y subsecuente regeneración de plantas a partir de los mismos. La respuesta positiva de los tejidos cultivados *in vitro* de *L. esculentum* para estas etapas (al igual que en otras especies) depende del explanto, del genotipo y del medio usado en cada fase del cultivo. Zorzoli *et al.* (1991) demostraron que los genotipos de tomate pueden clasificarse por su capacidad de regeneración *in vitro* en altos, medianos y bajos utilizando explantos foliares en el cultivo inicial.

La regeneración de vástagos a partir de tejidos indiferenciados se ha logrado en varias especies: *Medicago* (Reisch and Bingham, 1980), *Phaseolus* (Mok *et al.*, 1980), *Hordeum vulgare* (Komatsuda *et al.*, 1989). En el tomate cultivado la proliferación de vástagos a partir de callos es un hecho poco frecuente dependiendo esto en gran parte del genotipo usado (Locky, R., 1983). Tanto las condiciones físicas (fotoperíodo) como químicas (reguladores vegetales) a las que se somete el tejido han sido descritas como un estímulo fundamental para la rediferenciación en otras especies tales como en el trigo (Maddock *et al.*, 1983) y en el maíz (Vasil and Vasil, 1986).

En todo proceso de selección *in vitro* a patógenos y/o estrés (sales, herbicidas, etc.) es indispensable previamente determinar las condiciones de cultivo que anulen o disminuyen la capacidad de diferenciación así como las condiciones necesarias para la inducción de los callos. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar en cuatro ge-

notipos de tomate de distintos orígenes genéticos su capacidad de dediferenciación y posterior rediferenciación combinando condiciones de fotoperíodo con distintas concentraciones de reguladores vegetales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 4 cultivares comerciales de tomate: Planeuco I.N.T.A. (P<sub>2</sub>); Rossol Selección La Consulta (R), ambos argentinos; Cal J(C), de origen californiano y Raci 53 (R<sub>53</sub>), italiano. Planeuco y Cal J son cultivares de elevada capacidad de regeneración *in vitro* en el cultivo inicial mientras que Raci 53 y Rossol lo son de mediana (Zorzoli *et al.*, 1991).

Las plantas donadoras de explantos se sembraron en macetas de 10 cm de diámetro y cuando las plantas alcanzaron 15 cm de altura se efectuó la extracción para la siembra *in vitro*. Se usó como explanto el tercer folíolo más cercano al ápice para uniformar la edad fisiológica de las plantas y se eliminó la zona cercana a la inserción peciolar. Zorzoli *et al.* (1988) demostraron que este estado fisiológico del explanto y de la planta donadora eran los óptimos para la siembra *in vitro*. La desinfección se efectuó sumergiendo los folíolos en alcohol 96° (5 segundos) y luego en hipoclorito de sodio al 4% de cloro activo durante 4 minutos. Posteriormente se lavaron en agua bidestilada estéril. Para la inducción de callos se empleó el medio básico de Murashige and Skoog (1962) (MS) suplementado con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento: Medio I (MI): 2 mg.l<sup>-1</sup> ANA + 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP; Medio II (MII): 1 mg.l<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.l<sup>-1</sup> BAP. El MI y MII fueron formulados con la auxina (ANA) en mayor concentración que la citocinina para inducir la formación de callos. Los medios se solidificaron con 1% de agar después de ajustar el pH a 5,8. Se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Los explantos fueron cultivados con el envés en contacto con el medio de cultivo e incubados en cuarto climatizado a 28 ± 2°C.

Se probaron dos tratamientos físicos en los que variaba el fotoperíodo, TL: 16 horas de luz y TO: oscuridad.

La formación de callos fue evaluada en cada genotipo a las 4 semanas de la siembra *in vitro* y se calculó el porcentaje de explantos que exclusivamente desarrollaron callos (C = porcentaje de callos). Luego de las 4 semanas los callos obtenidos sobre el MI y MII fueron repicados a 2 medios para inducir diferenciación de vástagos y subsecuente regeneración de plantas con un tratamiento único de 16 horas de luz. Estos medios también fueron formulados sobre la base salina del medio Murashige and Skoog (1962) con distintas concentraciones de reguladores vegetales, MA: MS + 2,25 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 0,175 mg.l<sup>-1</sup> AIA y MB: MS + 4,5 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 0,175 mg.l<sup>-1</sup> AIA siendo el número de repeticiones de 30 por genotipo y medio. Zorzoli *et al.* (1991) comprobaron que el MA es la formulación adecuada para inducir regeneración en el cultivo primario con explantos foliares en estos genotipos de *L. esculentum* por lo que se decidió utilizar esas concentraciones de reguladores para rediferenciar callos. Los callos se incubaron en cámara climatizada a 28 ± 2°C. La capacidad de rediferenciación en cada genotipo se evaluó por el porcentaje de callos repicados que diferenciaron primordios caulinares y vástagos a los 30 días del subcultivo. Las diferencias genotípicas para C se analizaron por la prueba del  $\chi^2$  y luego con la G (Sokal y Rohlf, 1969) para segregar el efecto de la interacción medio - tratamiento sobre los genotipos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se detalla el número de repeticiones (n) y el porcentaje de callos (C) en el MI y MII para ambos tratamientos (TL y TO). Los genotipos expresaron según estas condiciones diferentes comportamientos *in vitro* para la desdiferenciación. En todos los genotipos y en todos los tratamientos se logró inhibir la totipotencialidad celular obteniéndose masas callosas. Para el genotipo Rossol se obtuvo un bajo porcentaje porque el explanto no proliferó o bien porque se obtuvieron masas callosas que diferenciaron en tejidos radiculares.

No se encontraron diferencias significativas entre los fotoperíodos para Cal J y Raci 53 ( $\chi^2 = 0,02$  ns;  $\chi^2 = 0,02$  ns respectivamente). El fotoperíodo no modificó la producción de callos pero sí fue importante el medio de cultivo (ver Tabla 1). Aparentemente estos dos cultivares son insensibles al fotoperíodo para inducir la desdiferenciación. En estos

**Tabla 1.** Porcentaje de callos (C) de cada genotipo para los medios MI y MII en TL y TO.

Medios	M I				M II			
	TO		TL		TO		TL	
Genotipos	n	C	n	C	n	C	n	C
Rossol	17	25	16	31	16	69	15	13
Raci 53	16	81	16	69	17	47	17	53
Cal J	16	94	17	88	17	47	17	41
Planeuco	16	75	17	94	17	71	14	50

n: número de repeticiones  
 TL: 16 horas de luz MI : MS + 2 mg.l<sup>-1</sup> ANA + 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP  
 TO: oscuridad MII: MS + 1 mg.l<sup>-1</sup> ANA + 0.5 mg.l<sup>-1</sup> BAP

genotipos los mayores porcentajes se obtuvieron sobre el medio MI independientemente del tratamiento físico. El análisis estadístico con la G de Sokal (Tabla 2) demostró que la desdiferenciación requiere diferentes inductores según el genotipo. Para los genotipos Rossol y Planeuco, se evidencia una interacción significativa entre inductores físicos (fotoperíodo) y químicos (reguladores) por lo que sólo la combinación de ambos factores en los niveles probados permitiría la expresión de la desdiferenciación de estos genotipos argentinos.

Con respecto a la rediferenciación se pueden comparar en la Figura 1 (a y b) el porcentaje de callos repicados que produjeron primordios y vástagos en los 2 medios de regeneración según el origen del callo. El genotipo Cal J es el que rediferenció en mayor proporción, pero estos valores resultan bajos si se los compara con los que presenta este genotipo cuando se siembra su explanto foliar en el cultivo inicial (96.05%) (Zorzoli *et al.*, 1991). Por otro lado, Planeuco, que también tiene elevada capacidad de regeneración *in vitro* en el cultivo inicial (89.28%), fue el que expresó en la rediferenciación el porcentaje más bajo. Esto demuestra que la expresión de un genotipo, en cuanto a su capacidad de regeneración, puede variar según el tipo de tejido (folíolo o callo) (Tatchell and Binns, 1986, Zorzoli *et al.*, 1991). Posiblemente el paso previo de proliferación en tejido indiferenciado anularía su capacidad organogénica. Este hecho lleva implícito las diferencias que pueden encontrarse entre genotipos de *L. esculentum* cuando se promueve la organogénesis. Las condiciones previas a las cuales

**Tabla 2.** Prueba de la G de Sokal para segregar el efecto de la interacción medio-tratamiento.

	gl	Genotipos			
		Rosol	Raci 53	Cal J	Planeuco
Hipotesis					
Independencia M x C	1	0	0	0,01	0,25
Independencia M x P	1	0,50	4,45*	18,05**	4,64*
Independencia P x C	1	5,84*	0,06	0,18	0,01
Interacción M x C x P	1	4,72*	0,72	0,23	3,84*
Independencia M x C x P	4	11,07*	5,24	18,49**	8,74

\* p < 0,05    \*\* p < 0,01.  
M = Medio. C = Condición física. P = Producción de callos.

fueron sometidos los explantos determinarían su comportamiento en la regeneración posterior. Así, por ejemplo, los callos de Raci 53 y Planeuco sólo regeneran si son obtenidos en oscuridad y sobre el medio MI para el primero, y en luz y MII para el segundo, mientras que los callos de los otros tratamientos no logran la rediferenciación (Figura 1,b). Las experiencias de Sahondra *et al.* (1990) demostraron también que en la *Festuca arundinacea* Schreb. y en *Lolium multiflorum* Lamb. el paso de la oscuridad a la luz era un cambio ambiental importante para la regeneración.

Para estos genotipos de *L. esculentum* el explanto desdiferenciado se rediferencia en bajo porcentaje lo que corrobora los resultados obtenidos por otros autores (Tatchell and Binns, 1986). Aparentemente, si se logra "disparar" la desdiferenciación se daría lugar a que algunas células siguieran este patrón y dejaran así de expresar su totipotencialidad (Reinert and Backs, 1968). Por otro lado la rediferenciación variará según el genotipo, indicando la presencia de definidos controlés génicos. Esto ha sido demostrado también en otras especies como cebada (Dale and Deambroggio, 1979) y arroz (Rines and Mc. Coy, 1981).

Se concluye que para estos genotipos no es posible inducir una eficiente organogenesis a partir de tejidos indiferenciados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Dale, P.J. and E. Deambroggio, 1979. A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordeum vulgare*. Z. Pflanzenzucht 94 : 65 -77.
- Komatsuda, T; S. Enomoto and K. Nakajima, 1989. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley. J. of Heredity 80(5): 345-350.
- Larkin, P.S. and W.R. Scowcroft, 1982. Somaclonal variation: A new option for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60 : 197.
- Locky, R.D., 1983. Callus formation and organogenesis by explants of six *Lycopersicon* species. Can. J. Bot. 61 : 1072-1079.
- Maddock, S.F.; V.A. Lancaster; R. Risiott and J. Franklin, 1983. Plant regeneration from cultured immature embryo and inflorescence of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*) . J. Exp. Bot. 34 : 915 -926.
- Mok, M.C. ; D.W.S Mok ; D.J. Armstrong ; A. Raba-koarihanta and S.G. Kim, 1980. Cytokinin autonomy in tissue cultures of *Phaseolus*: a genotype-specific and heritable trait. Genetics 94 : 675-686.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
- Reinert, B. and E. Bingham, 1968 . Control of totipotency in plant cells growing *in vitro*. Nature (Lond.) 220: 1340-1441 .
- Reisch, B. and E. Bingham, 1980. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. Plant Sci. Lett. 20 :71-77.
- Rines, H. W. and T.J. Mc. Coy, 1981. Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats. Crop Sci. 21: 837-842.
- Sahondra, R.R. ; G. Alibert and C. Planchon, 1990. Continuous plant regeneration from established embryogenic cell suspension cultures of Italian Ryegrass and tall festue . Plant Breeding 104: 265-271.

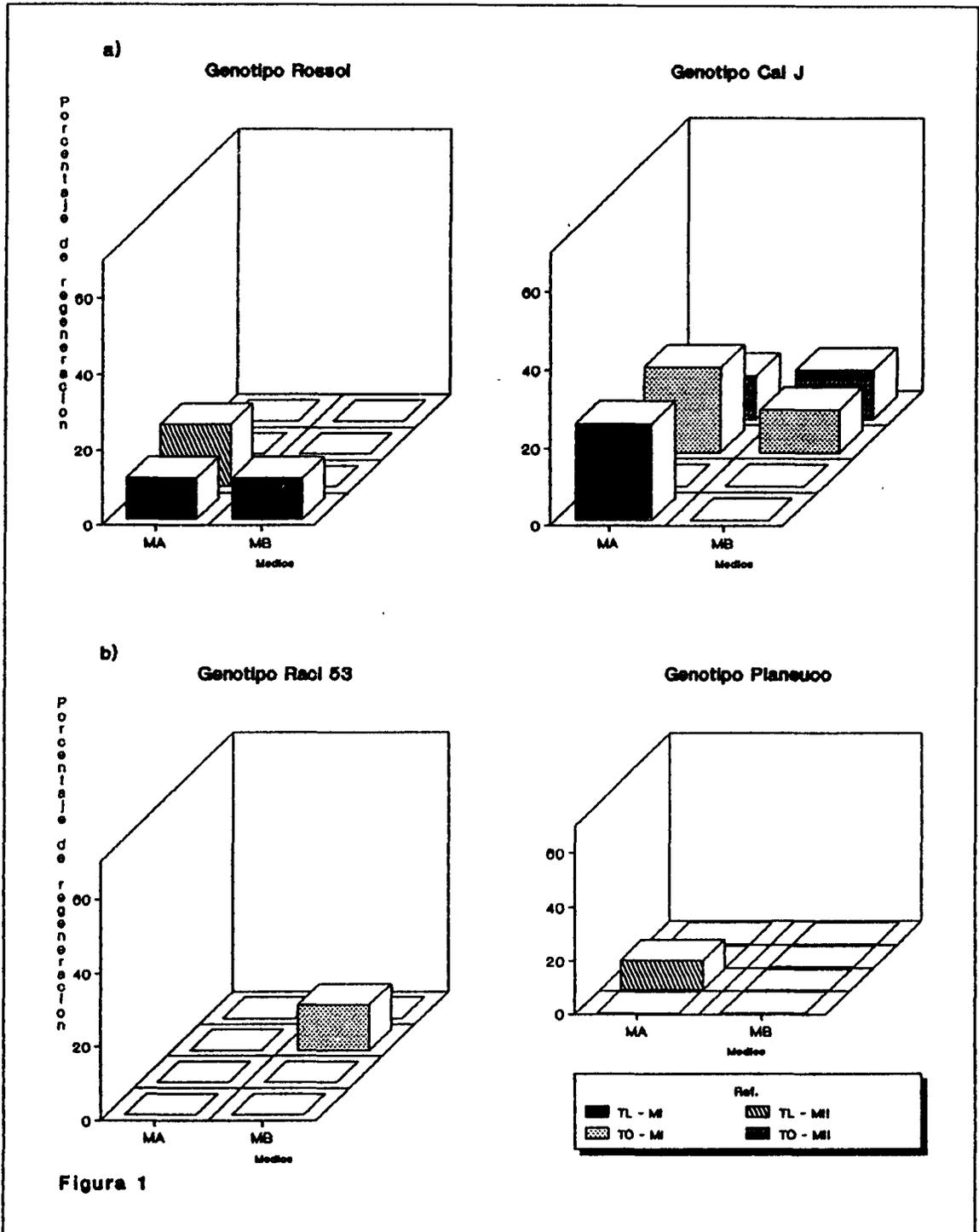


Fig. 1. Porcentaje de regeneración de cada genotipo en los dos medios de rediferenciación (MA y MB) y en cada tratamiento durante la desdiferenciación.

- Sokal, R.R. y F.S. Rohlf, 1969. *Biometria*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Tatchell, S. and A. Binns, 1986. A modified Murashige and Skoog media for regeneration of direct explants and long-term callus cultures of tomato. *Tomato Genet. Coop. Rep.* 36: 35-36.
- Vasil, V. and I.K. Vasil, 1986. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol* 124: 399-408.
- Zorzoli, R.; E.L. Cointry; E.A. Prado; L.A. Mroginski y L.A. Picardi, 1988. Regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) por cultivo *in vitro* de folíolos. *Turrialba* 38 (4): 332-336.
- Zorzoli, R.; M. Mitidieri; G. M. Nestares. y L.A. Picardi, 1991. Formación de vástagos *in vitro* con tres tejidos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a lo largo de sucesivos ciclos de regeneración. *Rev. Agron. N. O. Argent.* XXVI (1-2):5-17.