

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill), A PARTIR DE COTILEDONES Y HOJAS DE LA VARIEDAD CAMPBELL 28

✉ Alejandro D Fuentes, Natacha Soto, Dubiel Alfonso, Pedro Oramas

División de Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 8070; E-mail: virplant@cigb.edu.cu

ABSTRACT

The influence of different compounds of the culture media such as hormone and sucrose concentrations and the type of gelling agent on regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) plants from cotyledons and leaves of cultivar Campbell 28 was studied. It was established that, for cotyledons, the optimal concentrations of zeatine and indolacetic acid are 0.5 and 0.1 mg/L, respectively, in a culture media with 20 g/L of sucrose and 0.2% of Gel-Rite, where the average amount of shoots obtained per explant was 2.75. In the case of leaves, the optimal conditions for regeneration were achieved with 0.5 mg/L of zeatine and 0.4 mg/L of indolacetic acid in a culture media, containing 20 g/L of sucrose and 0.7% of agar, and reaching three shoots per explant.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*, regeneration, tomato

Biotecnología Aplicada 1998;15:242-245

RESUMEN

Se estudió la influencia de diferentes componentes del medio de cultivo, como la concentración de hormonas y de sacarosa y el tipo de agente gelificante sobre la regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) a partir de cotiledones y hojas de la variedad Campbell 28. Se estableció que para cotiledones las concentraciones óptimas de zeatina y ácido 3 indolacético (AIA) son: 0,5 y 0,1 mg/L, respectivamente, en un medio con 20 g/L de sacarosa y 0,2% de Gel-Rite, donde la cantidad de brotes obtenida por explante fue de 2,75 como promedio. En el caso de las hojas, las condiciones óptimas de regeneración se obtuvieron con 0,5 mg/L de zeatina y 0,4 mg/L de AIA en un medio que contiene 20 g/L de sacarosa y 0,7% de agar; de este modo se alcanzó tres brotes por explante.

Palabras claves: *Lycopersicon esculentum*, regeneración, tomate

Introducción

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es una de las principales plantas hortícolas que se siembra en Cuba, y además de consumirse a gran escala en estado fresco constituye una fuente importante de materia prima para la industria de conservas. Entre las variedades que se cultivan en nuestro país sobresale por su importancia Campbell 28, que abarca alrededor de 8 100 ha en todo el país. Sin embargo, esta variedad es afectada por diferentes plagas y enfermedades, entre las cuales se encuentran los geminivirus, que disminuyen las producciones de tomate hasta en un 100% (MINAGRI, 1996, comunicación personal). Por los métodos convencionales de mejoramiento resulta muy difícil obtener plantas con un nivel de resistencia adecuado, lo que pudiera lograrse por medio de la ingeniería genética [1-4].

Se ha demostrado que para la manipulación genética de las plantas se requieren procedimientos eficientes de regeneración a partir de diferentes explantes. Existen diferencias en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración en las plantas de tomate. Dicha capacidad está determinada por el genotipo, las condiciones de cultivo, el estado fisiológico de la planta y el tipo de explante utilizado [5-8].

La regeneración a partir de cotiledones y hojas ha sido estudiada en diferentes variedades de tomate y se ha visto que ésta ocurre vía organogénesis directa e indirecta [9-15].

El objetivo del siguiente trabajo es establecer las condiciones de regeneración de plantas a partir de cotiledones y hojas de la variedad de tomate Campbell 28.

Materiales y Métodos

Los explantes de cotiledones y de hojas fueron obtenidos a partir de germinados y plantas, respectivamente, cultivados *in vitro*. Para ello, las semillas de tomate de la variedad Campbell 28 fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 3% durante 20 min, se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril y se sembraron en medio de Murashige y Skoog (MS) [16], que contenía 30 g/L de sacarosa y 0,8% de agar.

Las plantas se obtuvieron a partir de ápices provenientes de germinados de 13-16 días. Estos ápices se sembraron en MS suplementado con 30 g/L de sacarosa y 0,7% de agar.

Regeneración a partir de cotiledones

Los cotiledones fueron escindidos a partir de germinados de 10-13 días, cortados por los extremos y puestos sobre el medio de regeneración con el haz hacia abajo. Se realizaron los siguientes experimentos:

Experimento 1. Establecimiento de la combinación óptima de zeatina y ácido 3 indolacético (AIA) para la formación de brotes a partir de cotiledones. El medio de cultivo contenía sales y vitaminas MS, 30 g/L de sacarosa, zeatina (0,5-2 mg/L), AIA (0,2-4 mg/L) y agar 0,8% (Tabla 1).

1. Seong-Lyul R, Hwa-Jin C, Byung-Dong K, Wolfgang S, Klaus G. Development of insect resistance in tomato plants expressing the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis*. *Molecular Breeding* 1995;1:229-36.

2. Kunik T, Salomón R, Zanur D, Navot N, Zeidan M, Michelson I. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Biotechnology* 1994;12:500-4.

3. Fischhoff DA, Bowditch KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick SM, Niedermeier JG, et al. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology* 1987;5:807-12.

4. Brunetti A, Tavazza M, Noris E, Tavazza R, Caciagli P, Ancora G, et al. High expression of truncated viral rep protein confers resistance to tomato yellow leaf curl virus in transgenic tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1997;10:571-9.

5. Zelcer A, Soferman O, Izhar S. An *in vitro* screening for tomato genotypes exhibiting efficient shoot regeneration. *J. Plant Physiol* 1984;115:211-5.

6. Maureen R Hanson. Cell and tissue culture of *Lycopersicon*. *Proc 5th Intl Cong. Plant tissue and cell culture. Plant tissue culture* 1982.

7. Pratta G, Zorzol R, Picardi L. Intra and interspecific variability of *in vitro* culture response in *Lycopersicon* (tomatoes). *Brazilian Journal of Genetics* 1997;20:75-8.

Tabla 1. Regeneración de brotes a partir de cotiledones en medio con diferentes combinaciones de zeatina y AIA. Experimento 1.

(Z + AIA) mg/L	Brot/expl regenerado	Frecuencia de expl regenerados (%)	Brot/expl totales (eficiencia de regeneración)
0,5 + 0,2	1,76 ± 0,20	83,3	1,46 ± 0,19
0,5 + 0,5	2,13 ± 0,27	85,7	1,82 ± 0,27
0,5 + 1,0	2,15 ± 0,31	63,3	1,36 ± 0,43
0,5 + 2,0	1,00 ± 0,22	23,3	0,23 ± 0,13
0,5 + 4,0	-	-	-
1,0 + 0,2	2,12 ± 0,26	71,4	1,51 ± 0,12
1,0 + 0,5	1,07 ± 0,21	40,0	0,42 ± 0,13
1,0 + 1,0	1,18 ± 0,26	36,6	0,43 ± 0,15
1,0 + 2,0	1,75 ± 0,34	13,3	0,23 ± 0,14
1,0 + 4,0	2,50 ± 0,62	10,0	0,25 ± 0,25
2,0 + 0,2	1,50 ± 0,33	17,1	0,25 ± 0,14
2,0 + 0,5	1,50 ± 0,32	22,8	0,34 ± 0,18
2,0 + 1,0	-	-	-
2,0 + 2,0	1,00 ± 0,14	8,5	0,08 ± 0,08
2,0 + 4,0	-	-	-

El número de brotes por explante (brot/expl) se muestra con el error estándar. Para cada combinación se usaron 35 explantes.

Experimento 2. Efecto del Gellum-gum o Gel-Rite como agente gelificante sobre la formación de brotes en medio suplementado con las sales y vitaminas MS, 30 g/L de sacarosa, zeatina 0,1- 2mg/L, AIA 0,1- 2 mg/L, Gel-Rite 0,2% (Tabla 2).

Experimento 3. Determinación de la concentración óptima de sacarosa para la regeneración a partir de cotiledones. El medio de cultivo contenía sales y vitaminas MS, sacarosa 5-60 g/L, zeatina 0,5 mg/L, AIA 0,1mg/L, Gel-Rite 0,2% (Tabla 3).

Regeneración a partir de hojas

Los explantes se obtuvieron cortando las hojas en segmentos de 1 cm² y se pusieron con el haz hacia el medio. Las hojas que se tomaron fueron la primera, segunda y tercera contando a partir del ápice. Las plantas seleccionadas tenían de cinco a seis semanas de cultivo.

Se realizaron los siguientes experimentos:

Experimento 4. Establecimiento de la combinación óptima de bencil aminopurina (BAP) y AIA para la

Tabla 2. Regeneración de brotes a partir de cotiledones en medio con 0,2% de Gel-Rite. Experimento 2.

(Z+AIA) mg/L	Brot/expl regenerado	Frecuencia de expl regenerados (%)	Brot/expl totales (eficiencia de regeneración)
0,1 + 0,1	2,00 ± 0,30	50,0	0,50 ± 0,38
0,1 + 0,2	2,16 ± 0,45	40,0	0,86 ± 0,30
0,1 + 0,5	1,20 ± 0,21	33,3	0,40 ± 0,14
0,2 + 0,1	2,00 ± 0,52	45,7	0,94 ± 0,18
0,2 + 0,2	1,85 ± 0,19	66,6	1,23 ± 0,28
0,2 + 0,5	1,72 ± 0,27	51,4	0,88 ± 0,17
0,5 + 0,1	2,75 ± 0,52	57,1	1,57 ± 0,39
0,5 + 0,2	2,12 ± 0,42	53,3	1,13 ± 0,36
0,5 + 0,5	1,75 ± 0,87	26,6	0,46 ± 0,16
1,0 + 0,1	1,47 ± 0,71	31,4	0,45 ± 0,25
1,0 + 0,2	1,35 ± 0,20	37,1	0,48 ± 0,33
1,0 + 0,5	1,23 ± 0,19	28,5	0,37 ± 0,32
1,0 + 1,0	1,00	6,6	0,06 ± 0,09
2,0 + 0,1	1,00	2,8	0,03 ± 0,07
2,0 + 0,2	1,00	6,6	0,06 ± 0,09
2,0 + 0,5	-	-	-
2,0 + 1,0	-	-	-
2,0 + 2,0	-	-	-

El número de brotes por explante (brot/expl) se muestra con el error estándar. Para cada combinación se usaron 30 explantes.

Tabla 3. Regeneración de brotes a partir de cotiledones en medio con diferentes concentraciones de sacarosa. Experimento 3.

Sacarosa (g/L)	Brot/expl regenerado	Frecuencia de expl regenerados (%)	Brot/expl totales (eficiencia de regeneración)	Formación de callos
60	-	-	-	+++
50	1,00 ± 0,21	6,6	0,06 ± 0,04	+++
40	1,50 ± 0,40	16,0	0,124 ± 0,11	++
30	1,50 ± 0,12	64,0	0,96 ± 0,14	++
20	1,84 ± 0,21	95,0	1,75 ± 0,17	+
10	1,42 ± 0,38	23,3	0,33 ± 0,22	+
5	1,00 ± 0,16	3,3	0,03 ± 0,03	+

El número de brotes por explante (brot/expl) se muestra con el error estándar. Para cada combinación se usaron 30 explantes. +: escasa formación de callos; +++: abundante formación de callos.

formación de brotes a partir de explantes de hojas. El medio de regeneración contenía sales MS, vitaminas B-5 [17], sacarosa 30 g/L, BAP 1-4 mg/L, AIA 0,2-1 mg/L, agar 0,7% (Tabla 4).

Experimento 5. Establecimiento de la combinación óptima de zeatina y AIA para la formación de brotes a partir de explantes de hojas. El medio de regeneración contenía sales y vitaminas MS, sacarosa 30 g/L, zeatina 0,5-2 mg/L, AIA 0,2-0,8 mg/L, agar 0,7% (Tabla 5).

Experimento 6. Determinación de la concentración óptima de sacarosa para la inducción de brotes a partir de explantes de hojas. El medio contenía sales y vitaminas MS, zeatina 0,5 mg/L, AIA 0,4 mg/L, sacarosa 5-30 g/L, agar 0,7% (Tabla 6).

Experimento 7. Influencia de la edad de la planta y la posición de la hoja sobre la regeneración a partir de explantes de hoja. El medio contenía sales y vitaminas MS, sacarosa 20 g/L, zeatina 0,5 mg/L, AIA 0,4 mg/L, agar 0,7%. Las edades a evaluar fueron: cuatro, cinco y seis semanas desde que se cultivó el ápice. Las hojas fueron: la primera, segunda y tercera contando a partir del ápice hacia la raíz (Tabla 7).

En todos los medios el pH fue ajustado a 5,8 antes de autoclavar y los cultivos se mantuvieron en cuartos iluminados a una temperatura de 25 °C con un régimen de 16 h luz por 8 h de oscuridad.

En todos los experimentos se evaluaron el número de brotes por explante que regeneró, la frecuencia de explantes que regeneran (por ciento) y el número de brotes por explantes totales (eficiencia de regeneración). En los experimentos 3 y 6 se consideró la formación de callos.

Se empleó un análisis de varianza factorial (3 x 3) para el experimento 7, donde los factores fueron las

Tabla 4. Regeneración de brotes a partir de explantes de hojas en medio suplementado con BAP y AIA. Experimento 4.

(BAP+AIA) mg/L	Brot/expl regenerado	Frecuencia de expl regenerados (%)	Brot/expl totales (eficiencia de regeneración)
1,0 + 0,2	1,92 ± 0,34	61,9	1,19 ± 0,59
2,0 + 0,2	1,25 ± 0,17	50,0	0,62 ± 0,16
4,0 + 0,2	2,50 ± 0,35	47,6	1,19 ± 0,26
1,0 + 0,5	2,31 ± 0,36	69,5	1,60 ± 0,27
2,0 + 0,5	2,07 ± 0,45	56,5	1,17 ± 0,39
4,0 + 0,5	1,00 ± 0,14	38,0	0,38 ± 0,07
1,0 + 1,0	1,85 ± 0,30	66,6	1,23 ± 0,21
2,0 + 1,0	1,66 ± 0,32	68,1	1,13 ± 0,22
4,0 + 1,0	1,66 ± 0,24	50,0	0,88 ± 0,36

El número de brotes por explante (brot/expl) se muestra con el error estándar. Para cada combinación se usaron 21 explantes.

8. Torelli A, Soragni E, Bolchi A, Petrucci S, Ottonello S, Branca C. New potential markers of *in vitro* tomato morphogenesis identified by mRNA differential display. *Plant Molecular Biology* 1996;32:891-900.

9. Padmanabhan V, Paddock EF, Sharp WR. Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. *Can J Bot* 1974; 52:1429-32.

10. Kut SA, Evans DA. Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species. *In vitro* 1982;18:593-8.

11. Tan MMC, Colijn-Hooymans CM, Lindhout WH, Kool AJ. A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. *Theor Appl Genet* 1987;75:105-8.

12. Hamza S, Choupeau Y. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Experimental Botany* 1993;44:1837-45.

13. Branca C, Torelli A, Fermi P, Altamura MM, Bassi M. Early phases in *in vitro* culture of tomato cotyledons: starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. *Protoplasma* 1994;182:59-64.

14. Yan-San Chyi, Phillips GC. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. *Plant Cell Reports* 1987;6:105-8.

15. Manacelli B, Altamura MM, Pasqua G, Biasini MG, Sala F. The histogenesis of somaclones from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) cotyledons. *Protoplasma* 1988;142:156-63.

16. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962;15:473-97.

Tabla 5. Regeneración de brotes a partir de explantes de hojas en medios suplementados con zeatina y AIA. Experimento 5.

(Z+AIA) mg/L	Brot/expl regenerado	Frecuencia de expl regenerados (%)	Brot/expl totales (eficiencia de regeneración)
0,5 + 0,2	1,25 ± 0,40	33,3	0,16 ± 0,21
1,0 + 0,2	2,70 ± 0,64	40,0	1,06 ± 0,46
2,0 + 0,2	2,00 ± 0,50	25,0	0,50 ± 0,16
0,5 + 0,4	5,25 ± 1,69	53,3	2,80 ± 1,74
1,0 + 0,4	3,22 ± 1,12	60,0	1,93 ± 1,26
2,0 + 0,4	1,00	66,6	0,66
0,5 + 0,8	2,87 ± 0,62	66,6	1,91 ± 0,58
1,0 + 0,8	1,43 ± 0,24	58,3	0,83 ± 0,28
2,0 + 0,8	1,90 ± 0,08	83,3	1,58 ± 0,15

El número de brotes por explante (brot/expl) se muestra con el error estándar. Para cada combinación se usaron 12 explantes.

hojas y las semanas. Las medias se compararon por la prueba de rangos múltiples de Duncan [18].

Resultados y Discusión

El proceso de regeneración ocurre, como lo han demostrado diferentes autores [5, 9, 19-22], en un medio que contiene una combinación de auxina y citoquinina. Como se demuestra a continuación se confirmó la observación de Kartha y cols. en 1976 [19] que el medio que contiene BAP o zeatina a concentraciones de 0,5-5 mg/L combinada con AIA, (0,1-0,5 mg/L) es efectivo para la regeneración de plantas a partir de cotiledones y hojas. Además de la combinación de fitohormonas, se comprobó que sobre la regeneración influyen otros componentes del medio como la sacarosa [6] y el agente gelificante [23]. También se investigó otro factor para la regeneración de hojas como es la edad del explante y su posición en la planta.

Regeneración a partir de cotiledones

Se testaron varias concentraciones de zeatina y AIA en un medio de inducción de brotes con el objetivo de determinar la combinación óptima para la regeneración (Tabla 1). Se demostró que a medida que aumenta la concentración de AIA respecto a la de zeatina disminuyen tanto el por ciento de explantes que regeneran como la eficiencia de regeneración. Por otra parte la mayor eficiencia de regeneración se

Tabla 6. Regeneración de brotes a partir de explantes de hojas en medio suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa. Experimento 6.

Sacarosa (g/L)	Brot/expl regenerado	Frecuencia de expl regenerados (%)	Brot/expl totales (eficiencia de regeneración)	Formación de callos
5	1,09 ± 0,17	36,6	0,40 ± 0,14	+
10	2,00 ± 0,33	56,6	1,13 ± 0,41	+
20	2,91 ± 0,52	80,0	2,33 ± 0,52	++
30	1,83 ± 0,22	60,0	1,10 ± 0,25	+++

El número de brotes por explante (brot/expl) se muestra con el error estándar. Para cada combinación se usaron 30 explantes. +: escasa formación de callos; ++: abundante formación de callos.

obtuvo en el medio con la combinación 0,5 mg/L de zeatina más 0,5 mg/L de AIA. Con esta combinación también resultó el mayor porcentaje de explantes que regeneran. Estas concentraciones de zeatina y AIA coinciden con las reportadas para cotiledones por Hamza y Chupeau, en la variedad UC82B [12]. Sin embargo, la cantidad máxima de brotes obtenidos para Campbell 28 es inferior que para la UC82B; éstas son de 2,13 y 13 brotes, respectivamente, lo cual confirma que la regeneración es genotipo dependiente.

Si se comparan los resultados para la combinación de zeatina 0,5 mg/L y AIA 0,5 mg/L obtenidos sobre agar (Tabla 1) y sobre medios gelificados con Gel-Rite (Tabla 2) vemos que hay un descenso de los tres parámetros a evaluar, el cual es evidente para la frecuencia de explantes que regeneran y la eficiencia de regeneración. Sin embargo, al disminuir la concentración de AIA respecto a la de zeatina hasta 0,1 mg/L ocurre un incremento de estos parámetros. Precisamente, es la combinación de 0,5 mg/L de zeatina con 0,1 mg/L de AIA en medio solidificado con Gel-Rite la que se seleccionó para el experimento 3 debido a que es mayor el número de brotes por explantes que regeneran, da lugar a una abundante morfogénesis (formación de callos, hojas individuales y brotes) y los brotes emergen principalmente de la zona de corte del cotiledón donde primeramente se forma una callosidad, lo cual no sucede sobre agar. Por otro lado, el tiempo de formación de los brotes en Gel-Rite es de 25 días mientras que en agar demoran como mínimo 50 días. El hecho de que el porcentaje de explantes que regeneran no haya alcanzado el nivel de la mejor combinación en agar (0,5 mg/L de zeatina

17. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 1968;50:151-8.

18. Duncan DB. A significance test for differences between ranked treatments in an analysis of variance. *Virginia J Sci* 1951;1:71-89.

19. Kartha KK, Gamborg OL, Shyluk JP, and Constabel F. Morphogenic investigations on *in vitro* leaf culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv Starfire) and high frequency plant regeneration. *Z Pflanzenphysiol* 1976;77:292-301.

20. Behki RM and Lesley SM. *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Can J Bot* 1976;2409-14.

21. Frankerberger EA, Hasegawa PM, Tigchelaar EC. Influence of environmental and developmental state on the shoot forming capacity of tomato genotypes. *Z Pflanzenphysiol* 1981;102:221-32.

22. Locky RD. Callus formation and organogenesis by explant of six *Lycopersicon* species. *Can J Bot* 1983;61:1072-9.

23. Kazuo I, Toshiko U, Kenkou T, Masayuki O, Masaaki N. Shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) in tissue culture using several kinds of supporting materials. *Plant Science* 1995; 108:93-100.

24. Kohlenbach HW, Wernicke W. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z Pflanzenphysiol* 1977;86:463-72.

25. Shillito RD, Paszkowski J, Patrikus I. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Rep* 1983;2:244-7.

26. Wernicke W, Kohlenbach. Investigation on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. *Z Pflanzenphysiol* 1976;79:189-98.

Tabla 7. Regeneración de brotes a partir de explantes de hojas teniendo en cuenta la edad de la planta y la posición de la hoja. Experimento 7.

Semanas de edad	Posición de la hoja	Brot/expl que regeneró	Frecuencia de expl que regeneran (%)	Brot/expl totales (eficiencia de regeneración)	Duncan
4	1	2,50 ± 0,23	66,6	1,66 ± 0,37	ab
4	2	3,00 ± 0,70	71,4	2,14 ± 0,78	ab
4	3	1,92 ± 0,32	61,9	1,19 ± 0,35	b
5	1	1,87 ± 0,33	71,4	1,33 ± 0,37	b
5	2	2,37 ± 0,38	76,1	1,80 ± 0,44	ab
5	3	3,09 ± 0,33	100,0	3,09 ± 0,33	a
6	1	3,06 ± 0,40	76,1	2,33 ± 0,44	ab
6	2	2,92 ± 0,60	66,6	1,95 ± 0,64	ab
6	3	2,20 ± 0,32	71,4	1,57 ± 0,33	ab

El número de brotes por explante (brot/expl) se muestra con el error estándar. Para cada combinación se usaron 21 explantes h(A); hojas: F = 0,147 ns. s(B); semanas; F = 0,579 ns. A x B; F = 2,544: significativo, p < 0,05. Letras diferentes representan diferencia significativa.

y 0,5 mg/L de AIA) puede deberse a la interacción entre las hormonas y el agente gelificante, que resulta en una mayor aparición de hojas individuales disminuyendo la posibilidad de formación de brotes. Se ha demostrado que determinados agentes gelificantes afectan la diferenciación y el crecimiento de los tejidos cultivados *in vitro* [23]. Varios autores han reportado que la diferenciación y el crecimiento de los tejidos son más lentos en agar que en agarosa o Gel-Rite [24-26], lo cual se confirma en el experimento 2.

La concentración de sacarosa también influyente sobre la regeneración de brotes (Tabla 3). Se demostró que en el medio que contenía 20 g/L de sacarosa se incrementaban los tres parámetros: la cantidad de brotes por explante que regeneró, la frecuencia de explantes que regeneran y la cantidad de brotes por explantes totales (eficiencia de regeneración). Como se observa al comparar los valores de brotes por explantes regenerados y la eficiencia de regeneración para 30 g/L de sacarosa en este experimento con los del experimento 2, hay un descenso de éstos. Ello podría estar relacionado con el lote de semillas que se utilizó.

Se debe destacar que a medida que se incrementaba la concentración de sacarosa aumentaba la formación de callos y disminuía hasta cero la cantidad de brotes.

Regeneración a partir de hojas

En todos los experimentos se observó la formación de brotes a partir de las cuatro semanas, los cuales emergían en las zonas de corte.

La combinación de BAP con AIA indujo la formación de brotes en todas las variantes probadas (Tabla 4), resultados que coinciden con los obtenidos por Demmel y cols. en 1993 [27]. Por lo general, a medida que aumenta la concentración de BAP, disminuyen la frecuencia de explantes que regeneran y la eficiencia de regeneración. La mejor variante resultó ser 1 mg/L de BAP con 0,5 mg/L de AIA, que mostró la mayor frecuencia de explantes que regeneran así como la eficiencia de regeneración más alta; ellos son 69,56% y 1,6, respectivamente.

Sin embargo, se observó una heterogeneidad entre los brotes en cuanto a su morfología, lo cual influyó en la definición de éstos a plantas (datos no mostrados).

El uso de la zeatina combinada con el AIA ha sido reportada por diferentes autores [11, 28] para la regeneración a partir de hojas.

En el caso del gradiente de zeatina con AIA también se obtuvieron brotes en todas las concentraciones probadas (Tabla 5), se alcanzaron los mayores valores de número de brotes por explantes que regeneran y de eficiencia de regeneración en la variante de 0,5 mg/L de zeatina con 0,4 mg/L de AIA, que son 5,25 y 2,8, respectivamente. Sin embargo la frecuencia de explantes regenerados es menor que en otras variantes.

En 1976, Kartha y cols. [19] reportaron que la combinación de zeatina con AIA resultó superior a la combinación de BAP con AIA para inducir la diferenciación de brotes, lo cual se confirma en este experimento al obtenerse brotes mejor definidos. Por esta razón, la combinación de zeatina (0,5 mg/L) con AIA (0,4 mg/L) fue seleccionada para los siguientes experimentos.

La concentración óptima de sacarosa fue de 20 g/L, la cual dio lugar a un 80% de explantes que regeneran con una eficiencia de 2,33 brotes por explante (Tabla 6). Esta concentración óptima de sacarosa coincide con la establecida por nosotros para la regeneración de cotiledones y para explantes de hoja, por Tan y cols. [11]. En el caso de las hojas ocurre un proceso de morfogénesis muy parecido al de los cotiledones; mientras más alta la concentración, mayor desarrollo de los callos y se intensifica el color rojo en los explantes, señal de que aumenta la síntesis de antocianinas [29].

Se estudió también la influencia de la edad de la hoja y su posición en la planta sobre la regeneración. Aquí se demostró que no había diferencia significativa entre las hojas 1, 2 y 3 en cuanto a los parámetros evaluados; ni entre los explantes de semanas diferentes. Sin embargo, el análisis de varianza demostró que la interacción semana y hoja es significativa (Tabla 7). Esto sugiere que se debe tomar en cuenta, tanto la posición de la hoja como la edad de la planta; no obstante, si se repitiera el experimento con una mayor replicación, las conclusiones podrían ser más aceptables.

En relación con el empleo del Gel-Rite en la regeneración a partir de hojas, se demostró que se producía una masa de callos oscura que posteriormente no producían brotes (datos no mostrados). Esta podría ser la razón por la cual los trabajos que existen sobre la regeneración de tomate en medio solidificado con Gel-Rite se realizaron usando como explante solamente los cotiledones [23].

Conclusiones

1. Se determinaron las concentraciones hormonales óptimas para la regeneración de plantas a partir de cotiledones y hojas. Para cotiledones éstas son 0,5 mg/L de zeatina más 0,1 mg/L de AIA, en un medio con 0,2% de Gel-Rite; mientras que en hojas son 0,5 mg/L de zeatina más 0,4 mg/L de AIA, en un medio con 0,7% de agar.
2. Se estableció que la concentración óptima de sacarosa es 20 g/L para ambos tipos de explantes en el medio de inducción de brotes.
3. Se comprobó el efecto acelerador del Gel-Rite, sobre la regeneración a partir de cotiledones, comparado con el agar.

Agradecimientos

Los autores agradecen al doctor Ariel Arencibia por la revisión del manuscrito. Este trabajo fue financiado por un proyecto del ICGEB (CRP/CUB 94-05/b2).

27. Demmel MM, Moriconi DN, Mentaberry AN. Regeneración directa de seis variedades argentinas de tomate. II Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal. REDBIO-Argentina 1993.

28. Koornneef M, Jongma M, Weide R, Zabel P, Hille J. Transformation of tomato. *Tomato Biotechnology* 1987;1:69-78.

29. Chi Bao Do, Francois Cormier. Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell Reports* 1991;9:500-4.