

UTILIZACION DEL METODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA EN LA DETERMINACION DE DOSIS OPTIMAS DE ANA, AIA Y KINETINA PARA LA FORMACION DE ORGANOS EN TOMATE (LYCOPERSICON ESCULENTUM MILL) CULTIVADO IN VITRO

NANCY SANTANA¹, J. REYNALDO² Y MARIA E. GONZALEZ¹

RESUMEN

Se realizaron siete experimentos de laboratorio, donde se estudió el efecto de cuatro niveles de concentración (0,0; 0,1; 1,0 y 2,0 mg/l) del ANA, AIA y kinetina sobre la formación de órganos de tomate (Lycopersicon esculentum Mill) cultivado in vitro. Para la determinación de la dosis óptima de las hormonas en estudio, se utilizó la metodología de superficie de respuesta en cada uno de los experimentos realizados. Los resultados obtenidos contribuyeron a crear un sistema de balance hormonal, para la formación de órganos en el cultivo del tomate en nuestras condiciones.

INTRODUCCION

El tomate (Lycopersicon esculentum Mill) es un cultivo para el cual la organogénesis es aun relativamente limitada; sin embargo, han sido obtenidas plantas completas a partir de explantes de hoja (Behki y Lesley, 1976; Herman y Mass, 1978 y Nancy Santana, 1985), explantes de tallo (Aucora et al., 1977 y De Langhe y De Bruijne, 1976), meristemos (Kantha et al., 1976), explantes de hipocotilo (Gunay y Rao, 1980) y anteras (Gresshof y Doy, 1972 y Nancy Santana, 1984).

Existen evidencias de que las fitohormonas están seriamente involucradas en el proceso de organogénesis (Reinert, 1973; Sheridan, 1974 y Warreing y Phillips, 1971) y, en algunas especies, la regulación de la diferenciación es gobernada por interacciones cuantitativas entre citoquininas y auxinas (Skoog y Miller, 1957; Gresshoff, 1973; Tran ThanhVan et al., 1974 y Dui Dan Ha et al., 1975), por lo que es asegurado a los mismos el papel determinante en el sistema.

Segun Negruți (1978), una de las principales dificultades del proceso de organogénesis lo constituye la limitada posibilidad de extender los métodos, para la diferenciación de una planta en particular, a otras especies y en ocasiones, a las diversas partes de una misma planta.

El objetivo del presente estudio fue determinar las dosis óptimas del ácido Naftalenacético (ANA), el ácido Indolacético (AIA) y la kinetina en el sistema auxina-citoquinina, para la formación de raíces y brotes aéreos en ovarios, anteras y hojas de tomate (Lycopersicon esculentum Mill) cultivados in vitro.

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana.

²Facultad de Mecanización, ISCAH, La Habana.

MATERIALES Y METODOS

Para realizar este estudio se condujeron 7 experimentos en un arreglo factorial 4×4 , montado sobre un diseño completamente aleatorizado, con 20 unidades experimentales por tratamiento. La variedad seleccionada fue la Manalucie.

En los experimentos del 1 al 4 se estudiaron las combinaciones del ANA con la kinetina y del S al 7, las combinaciones del AIA con la kinetina.

En los experimentos 1 y 2 se estudio el efecto del ANA y la kinetina sobre la formación de raíces, en ovarios y anteras respectivamente, mientras que los experimentos 3 y 4 estuvieron encaminados a estudiar la formación de brotes y raíces, al tratar hojas con dichas combinaciones hormonales.

En el experimento 5 se estudio el efecto del AIA combinado con kinetina sobre la formación de raíces en ovarios. En el experimento 6 se estudio la formación de brotes en anteras y en el experimento 7 se estudio la formación de raíces en hojas.

En las Tablas I y II se muestran las combinaciones hormonales y las dosis estudiadas, así como la respuesta de cada explante al tratamiento.

La desinfección y manipulación del material vegetal se realizó según metodología descrita por Nancy Santana (1984 y 1985).

En todos los tratamientos se utilizaron las sales recomendadas por Murashige y Skoog (1962), a las cuales se les adiciono 30 g/l sacarosa, 100 mg/l de inositol y las vitaminas de Morell. Cada combinación hormonal constituyo un tratamiento al adicionarse al medio de cultivo. Los medios fueron solidificados con agar técnico No. 3 (8 g/l).

En todos los casos se ajusto un modelo cuadrático de la forma:

$$(1) Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{12} X_1 X_2 + E$$

donde $E \sim N(0, \sigma^2)$

Se determinaron los puntos estacionarios (X_{10}, X_{20}) resolviendo el sistema de ecuaciones.

$$(2) \frac{dy}{dx_i} = 0; i = (1, 2).$$

Las superficies de respuesta obtenidas fueron reducidas a su forma canonica.

$$(3) Y - Y_0 = \lambda_1 W_1^2 + \lambda_2 W_2^2$$

donde Y_0 es el valor en el punto estacionario; λ_1 y λ_2 indican las tasas de incremento en la variable dependiente a través de los nuevos ejes transformados W_1 y W_2 a partir del punto estacionario; λ_1 permite determinar la naturaleza de dicho punto.

$$Z_1 = X_1 - X_{10} \quad y \quad Z_1 = W_1 \cos \theta - W_2 \sin \theta$$

$$Z_2 = X_2 - X_{20} \quad Z_2 = W_1 \sin \theta + W_2 \cos \theta$$

donde:

$$\theta = 1/2 \text{ arc. tan } \frac{b_1 Z}{b_{11} - b_2 Z} \quad \text{si } b_{11} \neq b_2 Z$$

$$\theta = \pi/4 \quad \text{si } b_{11} = b_2 Z$$

Tabla I. Respuesta de los diferentes organos (%) frente al ANA y a la kinetina (mg/l).

ANA	K	Ovario	Antera	Hoja	
		Raíces (%)	Raíces (%)	Brotos aéreos (%)	Raíces (%)
0,0	0,0	0	0	5	5
	0,1	40	50	85	20
	1,0	40	30	75	30
	2,0	80	80	95	60
0,1	0,0	0	0	20	10
	0,1	35	25	80	80
	1,0	65	75	90	80
	2,0	75	75	100	90
1,0	0,0	0	0	5	30
	0,1	45	40	60	85
	1,0	85	85	80	80
	2,0	85	65	95	90
2,0	0,0	0	0	30	15
	0,1	15	25	25	25
	1,0	25	30	30	35
	2,0	35	30	70	50

Tabla II Respuesta de los diferentes organos (%) frente a la kinetina y el AIA (mg/l).

Kinetina	AIA	Ovario	Antera	Hoja
		Raíces (%)	Brotos aéreos (%)	Raíces (%)
0,0	0,0	0	0	5
	0,1	0	0	10
	1,0	0	0	20
	2,0	0	0	20
0,1	0,0	0	0	20
	0,1	15	0	25
	1,0	75	10	45
	2,0	70	10	40
1,0	0,0	20	0	65
	0,1	80	10	45
	1,0	80	30	85
	2,0	95	5	85
2,0	0,0	20	0	35
	0,1	40	20	45
	1,0	50	20	70
	2,0	50	15	80

La significación de los coeficientes de regresión fue determinada mediante la prueba t y se calcularon las combinaciones óptimas de ANA, AIA y kinetina, considerando solo los coeficientes de regresión que resultaron significativos ($p < 0,05$) en la superficie de respuesta.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto del ANA y la kinetina sobre la formación de raíces en ovarios

La ecuación de la superficie ajustada según el modelo (1) fue:

$$(4) Y = 10,58 + 33,89 * A + 68,82 * K - 19,23 * A^2 - 18,66 * K^2 - 8,16 AK$$

A: ANA K: Kinetina * : significativo ($p < 0,05$)

con un coeficiente de determinación $R^2 = 78,35 \%$

Resolviendo el sistema de ecuaciones, según se plantea en Materiales y Métodos, se obtuvo el punto estacionario cuando se combina 0,475 mg/l de ANA y 1,107 mg/l de kinetina.

La reducción de la ecuación (4) a la forma canónica arrojó:

$$(5) Y - 71,36 = - 23,04 W_1^2 - 14,85 W_2^2$$

Como $\lambda_1 = - 23,04$ y $\lambda_2 = - 14,85$, el punto (A_0, k_0) es un punto de máxima, en el cual se pronostica un 71,36 % de formación de raíces; del $|\lambda_1| > |\lambda_2|$ se infiere que una variación en el nivel óptimo de ANA tiene una influencia más fuerte en la reducción del por ciento de formación de raíces que una variación en el nivel óptimo de kinetina.

Considerando los coeficientes de regresión que resultaron significativos, la combinación óptima de ANA y kinetina sería cuando se adicionan al medio 0,88 mg/l de ANA y 1,84 mg/l de kinetina, para los cuales se espera un 88,96 % de formación de raíces.

Efecto del ANA y kinetina sobre la formación de raíces en anteras

La ecuación de superficie ajustada según el modelo (1) fue:

$$(6) Y = 9,78 + 3,42 A + 72,92 * K - 16,69 A^2 - 20,42 * K^2 - 10,04 AK$$

A: ANA K: kinetina * : significación ($p < 0,05$)

con un coeficiente de determinación $R^2 = 71,80\%$, se obtiene el punto estacionario cuando se combinan 0,436 mg/l de ANA y 1,677 mg/l de kinetina.

La reducción de (6) a la forma canónica arrojó:

$$(7) Y - 77,81 = - 23,91 W_1^2 - 13,20 W_2^2$$

donde: $\lambda_1 = -23,91$ y $\lambda_2 = -13,20$, por lo que se infiere que (A_0, k_0) es un punto de máxima, en el cual se pronostica un 77,81 % de formación de raíces. El hecho de que $|\lambda_1| > |\lambda_2|$ hace pensar que una variación en el nivel óptimo de ANA tiene una influencia más fuerte en la reducción del por ciento de formación de raíces que una variación en el nivel óptimo de kinetina, pero si solo se consideran los coeficientes significativos de la ecuación de regresión, se hace evidente que la presencia de ANA no es necesaria, pues la combinación óptima sufre una modificación en la cual se suprime el ANA y se aumenta la dosis de kinetina a 1,78 mg/l, para la cual se espera un 74,87 % de formación de raíces.

Efecto del ANA y la kinetina sobre la formación de brotes de hojas

La ecuación de la superficie ajustada según el modelo (1) fue:

$$(8) Y = 35,76 + 31,42 A + 52,53 * K - 19,24 A^2 - 10,39 K^2 - 6,75 A K.$$

A: ANA K: kinetina *: significación ($p < 0,05$)

con un coeficiente de significación $R^2 = 62,49 \%$ se obtiene el punto estacionario cuando se combinan $0,395 \text{ mg/l}$ de ANA y $2,398 \text{ mg/l}$ de kinetina. La reducción de la ecuación (8) a la forma canónica arrojó:

(9) $y - 104,96 = -20,38 W_1^2 - 9,25 W_2^2$, donde $\lambda_1 = -20,38$ y $\lambda_2 = -9,25$, por lo que el punto (A_0, K_0) es un punto de máxima en el cual se espera un por ciento de formación de brotes muy próximo al 100 %, aunque este resultado se debe tomar con precaución pues representa una extrapolación al modelo.

Como $|\lambda_1| > |\lambda_2|$, se infiere que una variación en el nivel óptimo de ANA tiene una influencia más fuerte en la reducción del por ciento de formación de brotes, que una variación en el nivel óptimo de kinetina. Si en la ecuación de regresión solo se consideran los coeficientes significativos, se observa un efecto lineal de kinetina cuando hay presencia de ANA, por lo cual incrementando el nivel de kinetina se espera un aumento en el por ciento de formación de brotes.

Efecto del ANA y la kinetina sobre la formación de raíces en hojas

La ecuación de la superficie ajustada según el modelo (1) fue:

$$(10) Y = 22,46 + 95,35 * A + 32,08 K - 48,03 * A^2 - 4,79 K^2 - 6,01 AK$$

donde: $R^2 = 68,85 \%$ A: ANA K: kinetina *: significación ($p < 0,05$)

Resolviendo el sistema de ecuaciones (2), según se plantea en Materiales y Métodos, se obtuvo el punto estacionario para $0,815 \text{ mg/l}$ de ANA y $2,837 \text{ mg/l}$ de kinetina. Este resultado debe tomarse con precaución, pues constituye una extrapolación al modelo.

La reducción de la ecuación (10) a la forma canónica arrojó que:

(11) $y - 106,83 = -48,24 W_1^2 - 4,58 W_2^2$ por lo que el punto (A_0, K_0) es un punto de máxima.

Si en la ecuación de regresión solo se consideran los coeficientes significativos, la ecuación quedaría:

$$Y = 22,43 + 95,35 A - 48,03 A^2$$

Ello revela que en realidad la kinetina no ejerce una influencia considerable en el por ciento de formación de raíces en hojas, obteniéndose el punto de máxima cuando la dosis de ANA es de $0,9926 \text{ mg/l}$, para la cual el por ciento esperado es de 89,78.

Los resultados obtenidos evidencian que la formación de raíces está gobernada, en gran medida, por el ácido naftalenacético, el cual, con ligeras variaciones de la dosis óptima, provoca un incremento en el por ciento de formación de raíces, que en el caso de los ovarios se hace más notable la diferencia; sin embargo, los estudios realizados sobre organogénesis han demostrado que esta está basada, fundamentalmente, en el concepto del balance auxina/citoquinina (Skoog y Miller, 1957).

Efecto del AIA y la kinetina sobre la formación de raíces en ovarios

La ecuación de la superficie de respuesta según el modelo (1) fue:

$$(12) Y = -5,63 + 104,46 * K + 52,99 * A - 45,25 * K^2 - 17,20 * A^2 - 1,63 * KA$$

donde: K: kinetina A: AIA con un coeficiente de determinación $R^2 = 66,67 \%$

Resolviendo el sistema de ecuaciones (2), se obtuvo el punto estacionario $K_0 = 1,127$ y $A_0 = 1,486$, es decir, al combinarse 1,127 mg/l de kinetina con 1,486 mg/l de AIA se obtienen los mayores valores de formación de raíces.

La reducción de la ecuación (12) a la forma canónica arrojó que:

$$(13) Y - 92,65 = -45,28 W_1^2 - 17,17 W_2^2$$

Como $\lambda_1 = -45,28$ y $\lambda_2 = -17,17$ el punto (K_0, A_0) es un punto de máximas en el cual se espera un por ciento de formación de raíces de 92,65.

Como el valor absoluto de λ_1 es mayor que el valor absoluto de λ_2 ($|\lambda_1| > |\lambda_2|$), se infiere que una variación en el nivel óptimo de kinetina tiene un efecto más fuerte en la reducción de la formación de raíces en ovarios que una variación en el nivel óptimo de AIA, sin embargo, si en la ecuación de regresión solo se consideran los coeficientes significativos, se obtiene un nivel óptimo de kinetina a 1,154 mg/l y se evidencia un efecto lineal del AIA, aumentando el por ciento de formación de raíces con esta hormona, resultando muy lógico si tomamos en cuenta que las auxinas (en este caso AIA) son particularmente estimuladoras de la formación de raíces, por lo que parece acertado tomar en cuenta los coeficientes significativos para hacer los análisis en superficie de respuesta.

Efecto del AIA y la kinetina sobre la formación de brotes en anteras

La ecuación de la superficie ajustada según el modelo (1) fue:

$$(14) Y = -2,60 + 101,65 * K + 50,11 * A - 45,43 * K^2 - 16,41 * A^2 + 0,43 * KA$$

Resolviendo el sistema de ecuación (2), se obtuvo el punto estacionario cuando se combina 1,26 mg/l de kinetina y 1,54 mg/l de AIA.

La reducción de la ecuación (14) a la forma canónica arrojó que:

$$(15) Y - 93,25 = -16,41 W_1^2 - 45,43 W_2^2$$

Como $\lambda_1 = -16,41$ y $\lambda_2 = -45,43$, el punto (K_0, A_0) es un punto de máximas para el cual se espera obtener un 93,25 % de formación de brotes a partir de anteras de tomate.

Como el valor absoluto de λ_1 es menor que el valor absoluto de λ_2 ($|\lambda_1| < |\lambda_2|$), se infiere que una variación en el nivel óptimo de AIA tendrá un efecto más fuerte en una reducción en el por ciento de formación de brotes que una variación en el nivel óptimo de kinetina de 1,118 mg/l y se evidencia un efecto lineal del AIA aumentando el por ciento de formación de brotes con el aumento de este.

Efecto del AIA y la kinetina sobre la formación de raíces en hojas

La ecuación de la superficie ajustada según el modelo (1) fue:

(16) $Y = 9,76 + 91,24 * K + 26,44 * A - 38,27 * K^2 - 9,68 A^2 + 6,27 * KA$ con un coeficiente de regresión de $R^2 = 89,86 \%$.

Resolviendo el sistema de ecuación (2), se obtuvo el punto estacionario cuando se combinó 1,339 mg/l de kinetina y 1,8 mg/l de AIA. La reducción de la ecuación (16) a la forma canónica arrojó que:

$$(17) Y - 94,69 = - 9,34 W_1^2 - 38,61 W_2^2$$

Como $\lambda_1 = - 9,34$ y $\lambda_2 = - 38,61$, el punto (K_0, A_0) es un punto de máxima, en el cual se espera un 94,69 % de formación de raíces a partir de tejido foliar en tomate.

Como el valor absoluto de λ_2 ($|\lambda_1| < |\lambda_2|$), se infiere que una variación en el nivel óptimo de AIA tiene un efecto más fuerte en una reducción en el por ciento de formación de raíces. En este caso, al considerar los coeficientes significativos en la regresión dio resultados ilógicos.

Como resultado, se observó que el AIA mostro un efecto mas fuerte en la formación de raíces, tanto en ovarios como en hojas, y aunque las dosis óptimas varían para una y otra parte de la planta, el por ciento de formación de raíces esperado es similar para ambos casos (98,65 y 94,60 %); sin embargo, para la formación de brotes en anteras también el AIA ejerce un efecto lineal al tomarse en cuenta los coeficientes de significación, así como bajas dosis de kinetina (1,118 mg/l), para lo que el por ciento de formación de brotes esperado es de 93,25.

Aunque la organogenesis *in vitro* ha sido ampliamente estudiada en un gran número de especies durante los últimos años, el mecanismo y control de dicho proceso no ha quedado totalmente dilucidado (Vasil y Vasil, 1972; Sheridan, 1974 y Smith, 1974); sin embargo, si parece comprensible que todas las correlaciones del crecimiento son afectadas, de una forma u otra, por los patrones de distribución de las hormonas en las diferentes partes de la planta (Reinert, 1973). Estudios en este sentido han sido realizados por Negruti (1978); Tal et al. (1977); Warreing y Phillips (1971) y Nancy Santana (1984 y 1985), entre otros.

Estos resultados permiten establecer las dosis óptimas de ANA, AIA y kinetina para la formación de órganos en diferentes partes de la planta, permitiendo conocer además la capacidad para formar brotes y raíces en cada una de ellas.

REFERENCIAS

- AUCORA, G.K.; SRE RAMULU AND M. DEVIEUX. In Vitro Culture of Anthers and Stems Internodes of *Lycopersicon peruvianum*: Nuclear DNA Determinations in Cell and Cytological Analysis of Regenerated Plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 82 :377-388, 1977.
- BEHKI, R.M. AND S.M. LESLEY. In Vitro Plant Regeneration from Leaf Explants of *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Can. J. Bot.* 54 :2 409 - 2 414, 1976.
- DE LANGHE, E. AND E. DE BRUIJNE. Continuous Propagation of Tomato Plants by Means of Callus Cultures. *Soil Sci. Hort.* 4 :221-227, 1976.
- DUI DANG, MA; B. MORRELL AND A. MASSET. *J. Exp. Botany* 26 :263-269, 1975.
- GRESSHOFF, P.M. AND C.H. DOY. Development and Differentiation of Haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato) Plants. *Berl.* 107 :161-170, 1972.
- GRESSHOFF, P.M. PH. D. Thesis. Canberra. Austral. Natl. Univ., 1973.
- GUNAY, A.I. AND P.S. RAO. In Vitro Propagation of Hybrid Tomato Plants (*Lycopersicon esculentum* L.) Using Hypocotyl and Cotyledon Explants. *Ann. Bot.* 45 :205-207, 1980.

- HERMAN, E.B. AND G. HASS. Shoot Formation in Tissue Cultures of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Z. Pflanzenphysiol.* 89 : 467-470, 1978.
- KARTHA, K.K.; L. GOMBERG; J.P. SHYLUK AND F. CONSTABEL. Morphogenetic Investigations in vitro Leaf Culture of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Starfire) and Light Frequency of Plant Regeneration. *Z. Pflanzenphysiol.* 77 : 292-301, 1978.
- MURASHIGE, T. AND F. SKOOG. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Pl.* 15 : 473-497, 1962.
- NEGRUTI, I. In Vitro Organogenesis of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heinh. a Model System. In: *Plant Tissue Culture*. Boston: Pitman Advanced Publishing, 1978. p. 409-419.
- REINERT, J. Aspect of Organization, Organogenesis and Embryogenesis. In: *Plant Tissue and Cell Culture*, 1973. p. 338-355.
- SANTANA, NANCY. Aplicacion del cultivo "in vitro" en el mejoramiento del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) II. Obtencion de plantulas a partir de anteras y ovarios. *Cultivos Tropicales* 6 (1):13-26, 1984.
- SANTANA, NANCY. Estudio sobre la Formacion de brotes en cultivo "in vitro" de hojas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales* 7 (2) :117-121, 1985.
- SHERIDAN, W.F. *J. Cell. Biol.* 63 :313, 1974.
- SKOOG, F. AND C.O. MILLER. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11 :18-131, 1957.
- SMITH, H.H. *Bioscience* 24 :269-276, 1974.
- TAL, M.; K. DEHON AND H. HEINKIN. Morphogenetic Potential of Cultured Leaf Sections of Cultivated and Wild Species of Tomato. *Ann. Bot.* 41 :937-941, 1977.
- TRAN THANH VAN; H. CHLYAH AND A. CHLYAH. Regulation of Organogenesis in Thin Layers of Epidermal and Sub-Epidermal Cell. In: *Tissue Culture and Plant Science*, 1974. p. 101-139.
- VASIL, V. AND M. VASIL. *In Vitro* 8 :117-127, 1972.
- WAREING, P.H. AND I.D. PHILLIPS. *The Control of Growth and Differentiation in Plants*, 1971.

ABSTRACT

THE USE OF A SURFACE RESPONSE METHOD TO DETERMINE THE OPTIMUM DOSES OF ANA, AIA AND KINETINE FOR IN VITRO ORGAN FORMATION OF TOMATO (Lycopersicon esculentum Mill)

Seven laboratory experiments were performed, with the objective of studying the effect of four levels of ANA, AIA and Kinetine concentrations (0.0; 0.1; 1.0 and 2.0 mg/l) on in vitro organ formation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). A surface response methodology was applied to each experiment for determining the optimum hormonal doses studied. Results enabled to create a hormonal balance system for tomato organ formation under our conditions.

Manuscrito recibido el 29/VII/87.