

APLICACION DEL CULTIVO IN VITRO EN EL MEJORAMIENTO DEL TOMATE (Lycopersicon esculentum). II. OBTENCION DE PLANTULAS A PARTIR DE ANTERAS Y OVARIOS.

NANCY SANTANA¹

RESUMEN

Este trabajo constó de dos etapas: primeramente la inducción de callos a partir de anteras y ovarios; posteriormente, la diferenciación y obtención de plántulas. Para ello, se empleó en la primera etapa el medio - recomendado por Nancy Santana (1981, en imprenta), y en la segunda, como medio basal, las sales recomendadas por Murashige y Skoog (1962), adicionando combinaciones hormonales (IAA, NAA y kinetina). Se pudo comprobar el papel importante de estas sustancias del crecimiento en cada fase del cultivo, obteniéndose callos con crecimiento indefinido; diferenciación de plántulas completas y en otros casos, callos que solamente formaron raíces, según la combinación empleada en cada situación.

INTRODUCCION

Los intensos esfuerzos realizados durante los últimos años han dado - como resultado un considerable incremento en el espectro de especies de - plantas para las cuales se han establecido programas de mejoramiento mediante el empleo de las técnicas del cultivo "in vitro" (Chaleff y Stolarz, 1981).

El cultivo de anteras es empleado principalmente para obtener plantas haploides, sin embargo, se ha comprobado que los niveles de ploidía pueden variar (Nishi y Mitsuoka, 1969; Nitsch y Nitsch, 1970; Narayanaswamy y Chandy, 1971; Smith y col., 1974). Hughes y col., 1975, obtuvieron -

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, ISCAH, La Habana.

varios niveles de ploidía a partir de anteras y ovarios de arroz.

Una desventaja del método es la baja proporción de plantas que se obtienen con relación a la cantidad de anteras cultivadas (Oono, 1975), no obstante estas dificultades pueden ser solucionadas con el empleo de estas mismas técnicas.

El objetivo de este trabajo fue establecer un método para el mejoramiento de la variedad de tomate Bolívar, mediante el uso de las técnicas del cultivo de tejidos.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento del INCA, durante el período comprendido entre septiembre de 1982 y junio de 1983.

Para la consecución de los objetivos, el trabajo se enmarcó en dos etapas; 1ra Etapa.- Inducción de callos en ovarios y anteras.

2da Etapa.- Diferenciación de órganos a partir de los callos obtenidos.

1ra Etapa: Inducción de callos de ovarios y anteras. Anteras y ovarios de tomate (*Lycopersicon esculentum*) de la variedad Bolívar fueron aislados según metodología descrita por Nancy Santana (1983, parte I; sin publicar).

Se seleccionaron anteras de 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 cm de longitud, según lo recomendado por Gulchan (1981) para este cultivo y colocados en contacto con medio sólido conteniendo las sales de Musashige y Skoog (1962) y suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y 0,1 mg/L de BAP, (Nancy Santana, - 1983).

Los ovarios fueron tratados de forma similar y sometidas las siembras a un período inicial de 15 días de oscuridad y el resto del tiempo, luz continua.

2da Etapas: Diferenciación de órganos a partir de los callos obteniendo - después de un período de incubación de 2-3 meses. Los callos fueron divididos en porciones de aproximadamente 10 mg y transferidos a medios de - diferenciación en los cuales se emplearon distintas combinaciones de - -

auxina y/o citoquininas (Tabla No. 1), donde permanecieron alrededor de tres meses. En este período se realizaron tres pasajes a medio fresco. Las observaciones se realizaron diariamente.

En general, el pH de los medios fue ajustado a 5,8 con KOH; la temperatura del cuarto de incubación osciló entre los $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los medios fueron solidificados con 7 g/L de Agar Técnico No. 3.

RESULTADOS Y DISCUSION

1ra Etapa: Inducción de callos en ovarios y anteras. Los callos obtenidos a la semana de la siembra mostraron una masa abundante, observándose nuevamente el efecto favorable de la combinación del BAP (0,1 mg/L) y el 2,4-D (2,0 mg/L), tanto para los ovarios como para las anteras (Figura 1 y 2).

El crecimiento del callo fue rápido, haciéndose necesario dividir los callos y pasarlos a medio fresco varias veces, a pesar de lo cual muchos de éstos alcanzaron gran tamaño (Figuras No. 3 y 4). No obstante, puede observarse algunas fases del desarrollo del callo en las anteras (Figuras 5, 6 y 7) y los ovarios (8 y 9).

La respuesta de las anteras fue similar para todas las longitudes estudiadas, sin embargo, pudo observarse que aunque el crecimiento de los más pequeños fue más lento, el callo mostró mejor consistencia en los de 0,1 y 0,2 cm. Resultados similares fueron obtenidos por Gulchan (1981) y Nancy Santana (1983). Por otra parte, se ha comprobado que el crecimiento de los callos haploides es lento mientras que otros niveles de ploidía es más rápido (Nüzcki y Oono, 1968).

Algunas anteras formaron callo sin abrirse previamente (Figura 10) lo que hace pensar en la posibilidad de que esta masa no haya sido producida a partir del polen, sino la pared de la antera o el tejido somático en general. Este hecho no puede ser descartado, Sunderland y Hunwell (1971) trabajando con *Nicotina tabacum* plantearon que la presencia de otras partes de anteras no afectan la respuesta del polen.



Figura No. 1: CALLO FORMADO A LA SEMANA DE LA
SIEMBRAS DE LA ANTERA.

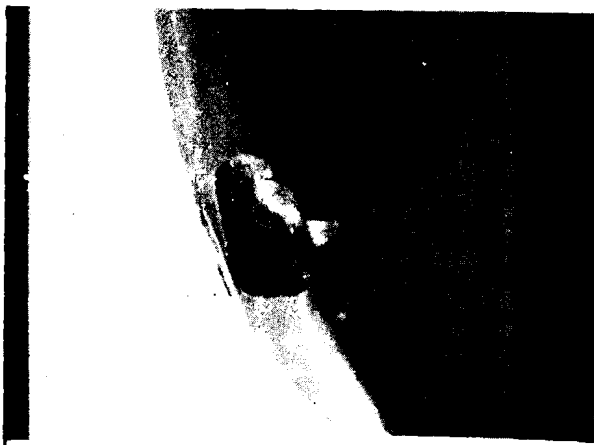


Figura No. 2: CALLO FORMADO A LA SEMANA DE LA
SIEMBRAS DEL OVARIO.

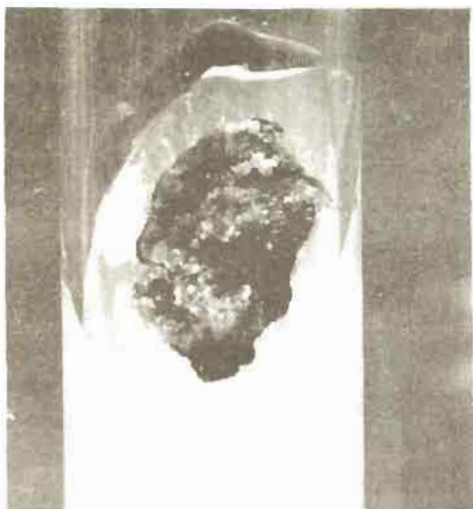


Figura No. 3: CALLO FORMADO
DESPUES DE VARIAS DIVI -
SIONES DEL CALLO (OVARIO).

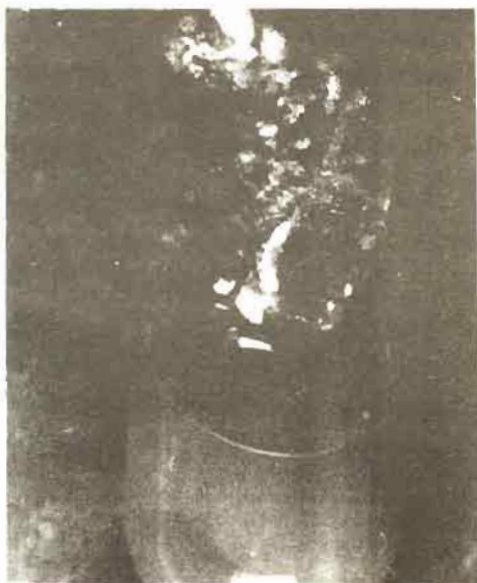


Figura No. 4: CALLO FORMADO
DESPUES DE VARIAS DIVI -
SIONES (ANTERA).



Figura No. 5: DISTINTAS FASES EN EL DESARROLLO DEL CALLO DE ANTERAS.

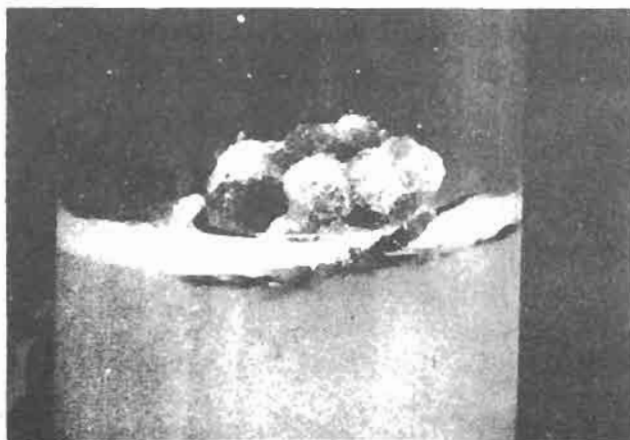


Figura No. 6: DISTINTAS FASES EN EL DESARROLLO DEL CALLO DE ANTERAS.

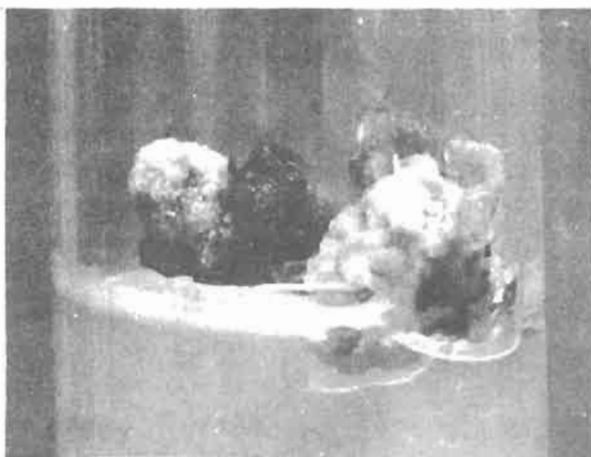


Figura No. 7: DISTINTAS FASES EN EL DESARROLLO DEL CALLO DE ANTERAS.



Figura No. 8: DISTINTAS FASES EN EL DESARROLLO DEL CALLO DE OVARIO.

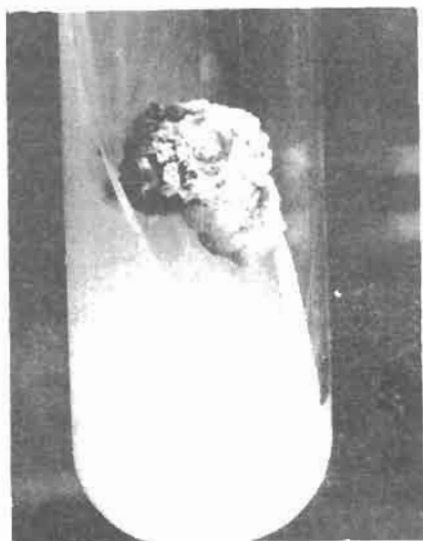


Figura No. 9: DISTINTAS FASES
EN EL DESARROLLO DEL CALLO
DE OVARIO.

Figura No. 10: CALLO FORMADO
EN ANTERAS SIN ABRIRSE.



2da Etapa: A la 8va semana los callos fueron transferidos a medio de diferenciación para inducir la formación de órganos. Como resultado de las combinaciones estudiadas (Tabla No. 1) se pudo observar que los callos sometidos al efecto del ANA (2 mg/L) y la Kinetina (2 mg/L) continuaron creciendo indefinidamente; los callos en presencia de ANA (2 mg/L) e IAA (2 mg/L) se tornaron carmelita y finalmente el tejido se necrosó. Sin embargo, cuando se combinó el IAA (4 mg/L) y la Kinetina (4 mg/L) se formaron plántulas completas tanto de ovario como de anteras (Figura 11) pero con una frecuencia muy baja (0,1%) aunque este resultado no deja de ser alentador si lo comparamos con resultados obtenidos por otros investigadores donde el porciento de éxito no supera el 0,02 (Rayna e Iyer, 1973 ; Wagner y Mess, 1974). Estas plántulas desde que comenzaron a formar sus órganos, presentaron sus hojas trifoliadas.

Según reportan numerosos autores, la principal dificultad del cultivo de anteras ha sido la baja capacidad del grano de polen de producir callus y la subsiguiente diferenciación en plántulas (Nüzcki y Oono, 1968 ; Hara, 1969; Woo y Tung, 1972). En este estudio la frecuencia de anteras que formó callus osciló entre el 80-88%, no así para formar órganos.

Se observaron callus cuyo crecimiento se prolongó durante varios meses perdiendo posiblemente, la capacidad para la diferenciación. Esto corrobora lo planteado por Wang Ching-Chu, y col. (1974) quienes reportaron que la edad del callo del polen afectan la habilidad de diferenciación de órganos.

El efecto del ANA (4 mg/L) sobre los callos provocó la formación de un abundante sistema radicular (Figuras 12 y 13) alcanzando algunas raíces hasta 6 cm de longitud, sin embargo no se formó la parte verde, aún después de emplear otras hormonas en el medio.

Luego de un período de adaptación las plantas están en fase de estudio en condiciones semicontroladas.

Resulta interesante comparar las plántulas obtenidas in vitro con las posturas obtenidas por el método tradicional, siendo los primeros en su morfología externa similares a las plantas adultas de tomate, mientras los segundos difieren notablemente en la etapa de semillero.

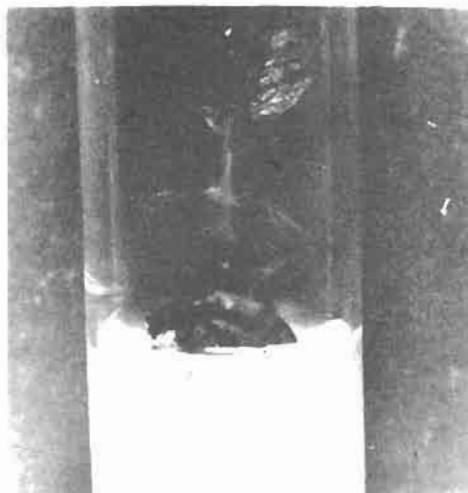


Figura No. 11: PLANTULA FORMADA A PARTIR DE CALLO EN EL MEDIO DE DIFERENCIACION QUE CONTENIA 4 mg/l DE IAA Y 4 mg/l DE KINETINA (ANTERAS).



Figura No. 12: EFECTO DEL ANA (4 mg/l) SOBRE LOS CALLOS, PROVOCANDO UN ABUNDANTE ENRAIZAMIENTO SIN FORMAR BROTE AEREO.



Figura No. 13: EFECTO DEL ANA (4 mg/l)
SOBRE LOS CALLOS, PROVOCANDO UN ABUN-
DANTE ENRAIZAMIENTO SIN FORMAR BROTE
AEREO.

Tabla No. 1: COMPOSICION HORMONAL DE LOS MEDIOS EMPLEADOS.

Medio base *	Auxinas		Citoquinina
	IAA	ANA	Kinet
MS	2	2	-
MS		2	2
MS	2	-	2
MS	4	-	4
MS	-	4	-

* Medio de Murashige y Skoog (1962).

Este estudio abarca una serie de trabajos para establecer los métodos más adecuados tanto para la obtención de plantas haploides como para la multiplicación del material de interés obtenido, por tanto, cada etapa reviste gran importancia para la consecución de nuestros objetivos.

REFERENCIAS

- CHING-CHU, W. y S. CHING-SAN y C. ZHIH-CHING, 1974. On the conditions for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction. Acta Botánica Sinica 11: 147-151.
- GULCHAN, T., 1981. Studies on anther cultures of tomato. Biolog. Planta 23(6):414-420.
- HARN, C., 1969. Studies on the anther culture of rice. Korcan J. Breed. Vol. 1:1-11.
- HUGHES, K. y J. CAPONETTE (1975). Anther-derived haploids of the African violet. Can J. Bot. 53, 1442-1444.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco Tissue cultures. Physiolog. Plant 15: 473-497.

- NARAYANASWAMY, S. y L. CHANDY, 1971. In vitro induction of haploid, diploid and triploid androgenic embryoids and plantlets in *Datura metil* L. *Ann. Bot.* 35:535-542.
- NUZCKI, H. y CONO, K., 1968. Induction of hybrid rice plant from anther culture. *Proc. Japan Acad.* 44:554-557.
- NISHI, T. y S. MITSUOKA, 1969. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of Rice plant. *Japan. J. Gene. trees.* Vol. 44, No. 6:341-346.
- NITSCH, J. y C. NITSCH, 1970. Obtention de plantes haploides a' partir de pollen. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 117:339-360.
- CONO, K. (1975). Production of haploid plants of rice (*Oryza sativa*) by anther culture and their use for breeding. *Bull. Not. Sustit. Agric. Sc. Tokyo. Series D. No. 26.* 139-222.
- SANTANA, NANCY y R. SOSA, 1983. Aplicación del cultivo "in vitro" en el mejoramiento del tomate (*Lycopersicon esculentum*). I Obtención de callus a partir de anteras (en imprenta)
- SMITH, S. y H. STREET, 1974. The decline of embryogenic potential as callus and suspension callus of carrot (*Daucus Carota* L) are seriously subcultured. *Ann. Bot.* 38, 223, 241.
- SUNDERLAND, N. y J. FURNWELL, 1971. Fohor Innes. *Ann. Rept. No. 62, p.60-61.*
- WOO, S. y J. TUNG, 1972. Induction of rice plants from hybrid Anthers of Indica and Japonica Cross. *Bot. Bull. Acad. Sc.* 13:67-69.

ABSTRACT

IN VITRO CULTURE APPLIED TO TOMATO (*LYCOPERSICON ESCULENTUM*) BREEDING. II. PLANTLETS AS OBTAINED FROM ANTHERS AND OVARIES.

This study consisted of two stages: first, induction of anther- and ovary-derived callus and further differentiation and plantlet production. Thus, a medium recommended by Nancy Santana (1981, in printing) was used

in the former whereas in the latter the salts recommended by Murashige & Skoog (1962) as basic medium, supplemented with different hormonal combinations (IAA, NAA and kinetine). The important role of such growing substances was also proved in each culture phase, obtaining undefined-growth calluses, differentiation of whole plants and in other cases, just rooted callus, according to the combination used for each situation.

Manuscrito recibido el 6/I/84.