

Influencia del citoplasma sobre la capacidad de regeneración *in vitro* en híbridos y sus generaciones segregantes en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)

R. Zorzoli; E.L. Cointry; E.A. Prado; L.A. Mroginski; L.A. Picardi.

RESUMEN

Con el objeto de estudiar la influencia del citoplasma sobre la capacidad de regeneración *in vitro* en tomate se usaron tres cultivares de tomate (Rossol Selección La Consulta (R); UC 82 (U) y Platauco INTA (P), sus cruza recíprocas y las F₂. Los explantos foliares se cultivaron sobre el medio Murashige y Skoog (MS) con 0,175 mg/l de AIA y 2,25 mg/l de BA (M_I) y 1,125 mg/l de BA (M_{II}). La capacidad de regeneración fue evaluada a través de 2 variables: la tasa de desarrollo (TD): proporción de explantos con callos y/o vástagos y la tasa de prolificidad (TP): proporción de vástagos por explantos desarrollados. No se encontraron diferencias en los cultivares entre ambos medios para TD ni para TP. En el M_I se manifestaron diferencias para TP entre las cruza recíprocas (R x U y U x R) (t = 1,8; p < 0,05). Las plantas F₂ se obtuvieron por autofecundación de las F₁. En la generación segregante las plantas con el citoplasma U presentaron una TP 2,43 y para el citoplasma R = 1,93 (t = 2,81; p < 0.01). Estos resultados permiten concluir que los efectos del citoplasma encontrados en la F₁ se conservan en la F₂.

Palabras clave: tomate - híbridos - capacidad de regeneración - citoplasma.

R. Zorzoli; E.L. Cointry; E.A. Prado; L.A. Mroginski; L.A. Picardi, 1992. Cytoplasmic influences for *in vitro* shoot-forming capacity in tomato hybrids and their segregating generations. Agriscientia IX N° 2 : 15-19.

SUMMARY

Three tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum* Mill): Rossol Selección La Consulta (R); UC 82 (U) and Platauco INTA (P), their reciprocal crosses were studied for their shoot-forming capacity. Leaf explants were cultured *in vitro* on Murashige and Skoog (MS) medium with AIA 0.175 mg/l + BA 2.25 mg/l

(M_I) and with BA 1.125 mg/l (M_{II}). Shoot-forming capacity was evaluated through two measures: the development rate (DR): proportion of explants with calli and/or shoots, and prolificity rate (Pr): proportion of shoots to developed explants. No differences among cultivars were found in both media for Dr. and Pr. In M_I significant differences between reciprocal crosses (R x U - U x R) were found for Pr ($t = 1.8$; $p < 0.05$). F₂ plants were obtained by selfing the F₁ and 171 of the former had the U cytoplasm while 85 had the R one. The U cytoplasm Pr was 2.43 and R was 1.93 ($t = 2.81$; $p < 0.01$) There results would indicate that the cytoplasm effects on regeneration are still active in the F₂ generation. Since it can be inferred that the genetic variability for the regeneration ability might be inhibited by cytoplasmic effects.

Key words: tomato - hybrids - shoot-forming capacity - cytoplasm.

R. Zorzoli; E.L. Cointry; E.A. Prado y L.A. Picardi, Cátedra de Genética, Facultad de Cs. Agrarias, U.N. de Rosario, Santa Fe 2051, 2000 Rosario, Argentina. L.A. Mroginski, IBONE, U.N. del Nordeste, C.C. 209, 3400 Corrientes, Argentina.

INTRODUCCION

El cultivo de tejidos es una técnica ampliamente difundida para propagar genotipos híbridos obtenidos entre especies, variedades o líneas de probada aptitud combinatoria. Si bien la capacidad organogénica es un carácter complejo que resulta de la interacción del genotipo con las condiciones físicas y químicas del medio de cultivo, en *Lycopersicon esculentum* existen experiencias que han demostrado que este género puede micropropagarse sin dificultad (Padmanabhan *et al.*, 1974; Behki and Lesley, 1976; Zelcer, *et al.*, 1984).

Sin embargo, cuando el genotipo a multiplicar es un híbrido pueden presentarse diferencias entre cruzamientos recíprocos para la capacidad de regeneración *in vitro*, tal como lo demostraron Ohki *et al.* (1978). Estos autores postularon que un carácter de expresión tan temprana en el desarrollo como es la diferenciación morfogenética podría estar afectada por factores citoplasmáticos.

Un modelo experimental apropiado para analizar el efecto del citoplasma sobre la manifestación de la capacidad de regeneración *in vitro* sería probar sobre diferentes medios de cultivo genotipos homocigotas y cruzamientos recíprocos. Por otro lado se puede verificar si dicho efecto puede aún manifestarse en las generaciones obtenidas a partir de los cruzamientos recíprocos.

Para contestar parte de estos interrogantes se cruzaron distintos genotipos de *Lycopersicon esculentum* evaluándose en las F₁ recíprocas y en las F₂ la influencia del citoplasma sobre la capacidad de regeneración.

MATERIALES Y METODOS

Como material experimental se utilizaron tres cultivares de *Lycopersicon esculentum*: Platauco INTA (P); Rossol Selección La Consulta (R) y UC 82 (U) y sus cruzamientos recíprocos como así también la generación F₂ de los híbridos donde intervienen R y U. En esta generación se segregaron las plantas por su origen citoplasmático. El híbrido P x U no produjo semillas. Las semillas se sembraron en macetas de 10 cm de diámetro y se extrajo el tercer folíolo más cercano al ápice cuando las plantas alcanzaron 15 cm de altura. El medio de cultivo se formuló con los componentes orgánicos e inorgánicos de Murashige y Skoog (1962) con la adición de ácido indol acético (AIA) 0,175 mg/l + bencil adenina (BA) 2,25 mg/l (M_I) y BA 1,125 mg/l (M_{II}). El pH se ajustó a 5,8. Los medios se esterilizaron en autoclave a 120° C durante 20 min previo agregado de 1% P/V de agar. La desinfección se efectuó sumergiendo los explantos en hipoclorito de sodio al 4% de cloro activo durante cinco minutos con el agregado de 0,1 ml. de Tween 20, previa inmersión en alcohol 96° durante cinco segundos. Los folíolos se cultivaron con el envés en contacto con el medio. La incubación se realizó en un cuarto climatizado con un fotoperíodo de 16 hs. y una temperatura de 28 ± 2° C.

La capacidad de regeneración de los genotipos se evaluó por medio de la Tasa de Desarrollo (TD), número de folíolos desarrollados en función del número de folíolos sembrados, (considerándose folíolos desarrollados a aquellos explantos que produjeron callo, primordio y/o vástagos) y la Tasa de Prolificidad (TP), número de vástagos por folíolo desarrollado, (se consideró vástago al

primordio que presentó el primer folíolo expandido). Las TD de los genotipos se compararon por medio de la prueba de X^2 mientras que las TP se analizaron por medio de la prueba "t" de Student previa transformación por $\sqrt{x} + \sqrt{x+1}$ (Sokal y Rohlf, 1967). Como forma de evaluar la variancia genética presente para el carácter dentro de cada fuente citoplasmática y determinar su influencia se estimó entre las plantas F_2 la repetibilidad (r) a través de un ANOVA a un criterio de clasificación (Falconer, 1981).

RESULTADOS Y DISCUSION

El desarrollo de los folíolos se produjo tanto en los cultivares como en sus cruzas entre los 30 y 35 días de su siembra *in vitro* mientras que los vástagos aparecieron entre los 45 y 50 días.

El análisis de la tasa de desarrollo reveló la existencia de diferencias significativas entre los cultivares siendo el cultivar Rossol el que establece dichas diferencias (R vs (U+P), $X^2 = 28,2$; $p < 0,01$) (Tabla 1). Estas diferencias se manifiestan independientemente del medio de cultivo. Por su parte las cruzas no mostraron diferencias recíprocas ni tampoco superaron el promedio de los progenitores, siendo además indiferentes a la composición química de los medios.

Con respecto a la variable tasa de prolificidad se detectaron diferencias significativas entre los cultivares ($t = 3,9$; $p < 0,01$) presentando el cultivar U los mayores valores. Tampoco hubo diferencias significativas entre los medios (Fig. 1). Estas diferencias genotípicas confirmarían la presencia de variancia genética para este carácter manteniendo la clasificación propuesta por Zorzoli *et al.* (1988) para la prolificidad en dos categorías: alta (U) y mediana (R y P). El análisis de esta variable en las F_1 reveló la existencia de un comportamiento diferencial según el medio de cultivo utilizado tanto para el híbrido R x U como para el P x R ($t = 2,6$; $p < 0,01$ y $t = 2,9$; $p < 0,01$ respectivamente) (Fig. 1). Por el contrario en sus respectivas cruzas recíprocas (U y R y R x P), la proliferación fue independiente del medio de cultivo. Al analizar entonces las cruzas recíprocas de cada medio se detectaron diferencias significativas en aquellos donde intervienen U y R ($t = 2,8$; $p < 0,05$) manifestándose sólo en M_I estas diferencias. En M_{II} el híbrido R x U incrementa su tasa a valores cercanos a U x R y entonces desaparecen las diferencias entre recíprocos. Ohki *et al.* (1978) y Frankenberger *et al.* (1981) analizaron la capacidad de regeneración *in vitro* en genotipos de tomate y sus cruzas recíprocas, pero sólo en el pri-

mero de estos trabajos se encontró efectos citoplasmáticos para este carácter. En una primera interpretación, del análisis conjunto de los cultivares R y U y sus cruzas recíprocas en ambos medios de cultivo, se podría inferir que si los factores que gobiernan el carácter regeneración fuesen exclusiva o predominantemente de origen citoplasmático cada híbrido debería comportarse como su respectivo progenitor femenino debido a la herencia uniparental de los plástidos. Esta situación parece cumplirse sólo cuando se analiza el M_I pero si, además, los factores responsables fuesen de origen nuclear no deberían existir diferencias entre los cruzamientos recíprocos, situación que solo se verifica en M_{II} . Por lo tanto estos hechos conllevan a plantear la hipótesis de la existencia de una interacción citoplasma-núcleo responsable de la expresión del carácter y que, por otra parte, serían las condiciones nutritivas las que permitirían o no expresar las diferencias entre los genotipos F_1 .

El análisis del carácter en la generación F_2 de las cruzas donde interviene U y R en M_I reveló que las plantas poseedoras de citoplasma U (descendencia del híbrido U x R) presentaron un valor de TP promedio de 2,43 mientras que las poseedoras de citoplasma R (descendencia del híbrido R x U) un valor de 1,93 dirigiendo estos valores significativamente ($t = 2,81$; $p < 0,01$) (Tabla 2).

Estos resultados indicarían que aún en la generación F_2 habría un efecto citoplasmático que afecta la regeneración puesto que es de suponer que la magnitud de la segregación genética nuclear ha sido igual dentro de cada fuente cito-

Tabla 1. Tasa de desarrollo (TD) para los cultivares e híbridos en los medios M_I , M_{II} y ($M_I + M_{II}$).

| Cultivares | M_I | | M_{II} | | $(M_I + M_{II})$ |
|------------|-------|------|----------|------|------------------|
| | n | TD | n | TD | TD |
| Rossol | 12 | 0.25 | 17 | 0.23 | 0.24 |
| UC 82 | 13 | 0.85 | 14 | 0.71 | 0.78 |
| Platauco | 14 | 0.93 | 13 | 0.85 | 0.89 |
| Híbridos | | | | | |
| R x U | 13 | 0.69 | 15 | 0.80 | 0.75 |
| U x R | 11 | 0.54 | 11 | 0.82 | 0.68 |
| P x R | 11 | 0.91 | 11 | 0.91 | 0.91 |
| R x P | 15 | 0.80 | 20 | 0.75 | 0.77 |

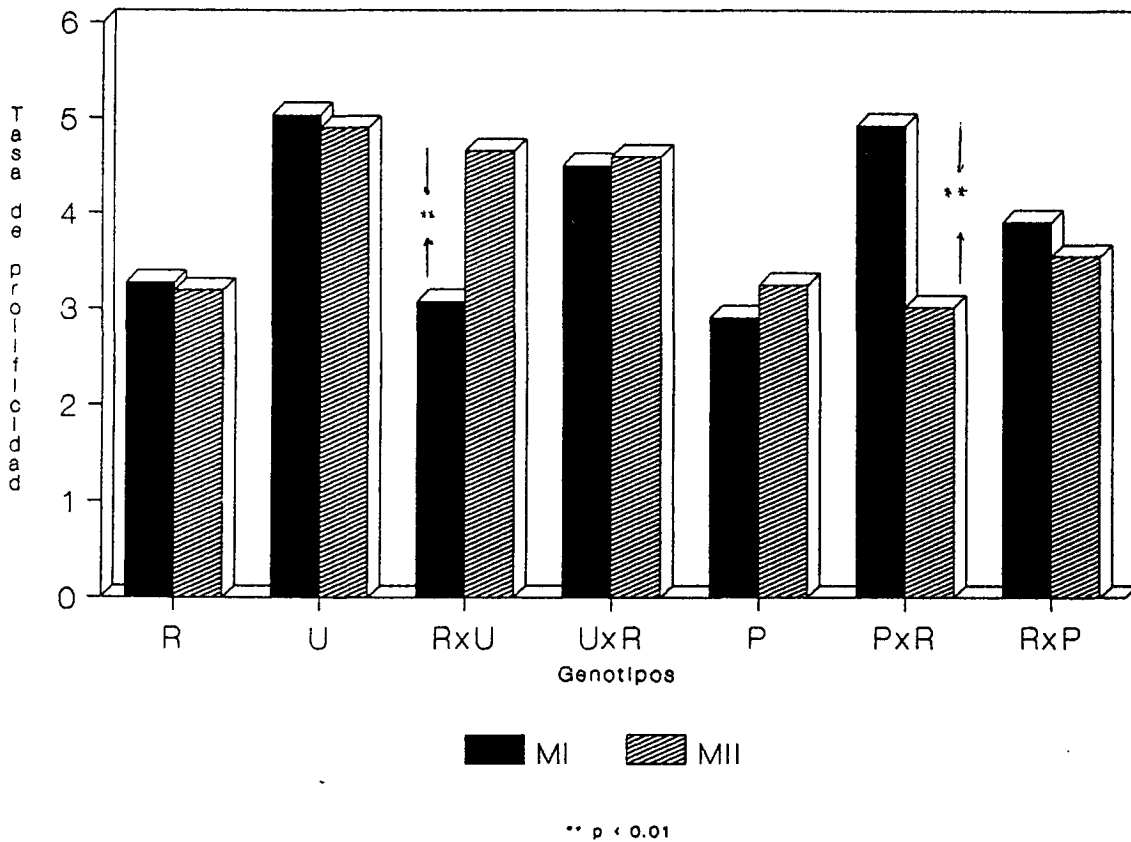


Figura 1. Tasa de prolificidad para Rossol (R), UC 82 (U), Platauco (P), F₁ (RxU), F₁ (U x R), F₁ (P x R) y F₁ (R x P) en cada medio de cultivo (M_I y M_{II})

plasmática. Por su parte los valores de repetibilidad obtenidos a través del ANOVA demostraron que la variancia genética puesta de manifiesto por las plantas F₂ poseedoras de citoplasma U fue superior a la variancia genética expresada por las plantas con citoplasma R. Los valores de repetibilidad fueron (U) = 30% (F = 4,5; p < 0,01) y (R) = 5% (F = 1,4 ns). Habida cuenta de que dentro de cada citoplasma se espera la misma segregación genética de origen nuclear los menores valores puestos de manifiesto en las plantas con citoplasma R indicarían un efecto inhibitorio de dicho citoplasma sobre la expresión de los genes nucleares. Este efecto sería el responsable de la falta de expresión de la variabilidad para el carácter regeneración en las plantas F₂ poseedoras de citoplasma R.

Este trabajo permite concluir que para la regeneración de genotipos híbridos es importante considerar la interacción entre el núcleo, el citoplas-

ma y el medio de cultivo como así también la expresión de los efectos citoplasmáticos y sobre todo será necesario considerar el grado de influencia del medio de cultivo en cada una de esas interacciones.

Tabla 2. Tasa de prolificidad (TP) en la generación F₂ según el tipo de citoplasma de la F₁.

| | $\bar{x} \pm S\bar{x}$ | n |
|-------------------------------|------------------------|-----|
| F ₂ (Citoplasma U) | 2.43 ± 0.11 | 171 |
| F ₂ (Citoplasma R) | 1.93 ± 0.14 | 85 |

** p < 0.01

BIBLIOGRAFIA

- Behki, R.M. and S.M. Lesley, 1976. *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Lycopersicon esculentum* (tomato) Can. J. Bot. 54: 24009-2414.
- Falconer, D.S., 1981. Introduction to Quantitative Genetics. Longman Group Limited. New York. pp. 126-130.
- Frankenberger, E.A.; P.M. Hasegawa, and E.C. Tigchehaar, 1981. Diallel analysis of shoot-forming capacity among selected Tomato genotypes. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 102:233-242.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-487.
- Ohki, S.; C. Bigot, and J. Mosseau, 1978. Analysis of shoot-forming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and their hybrids. Plant and Cell Physiol 19 (1): 27-42.
- Padmanabhan, V.; E.F. Paddock, and W.R. Sharp, 1974. Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. Can J. Bot. 104: 145-148.
- Sokal, R.R. and F.S. Rohlf, 1967. Biometría. H. Blume Ediciones. pp. 186-191.
- Zelcer, A.; D. Soferman; S. Izhar, 1984. An *in vitro* screening for tomato genotypes exhibiting efficient shoot regeneration. J. Plant Physiol. 115:211-215.
- Zorzoli, R.; E.L. Contry; E.A. Prado; L.A. Mroginski and L.A. Picardi, 1988. Regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) por cultivo *in vitro* de folíolos. Turrialba Vol. 38. Nº 4. Pag.: 332-336