

## Regeneración *in vitro* de plantas de *Solanum pimpinellifolium* L. a partir de explantes foliares

Shirley Valderrama-Alfaro\*, Julio Chico-Ruíz, Joselyne Quispe-Chávez, Raquel Sánchez-Marín.\*Autor para correspondencia

Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales. Av. Juan Pablo II s/n. San Andrés. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú. e-mail: shvalderrama@gmail.com

### RESUMEN

El tomate es una especie de gran importancia agrícola, además es fuente de vitaminas, minerales y compuestos antioxidantes, por ello es esencial buscar variedades resistentes a enfermedades. *Solanum pimpinellifolium* L. 'tomatillo silvestre', uno de los parientes silvestres del tomate, es considerado como reservorio de genes multipropósitos, lo cual hay que aprovechar. Con este interés se regeneraron plantas *in vitro* a partir de hojas de 'tomatillo silvestre'. Se estableció un sistema de germinación *in vitro* para las semillas de procedencia *ex vitro*, la utilización de semillas permitió obtener en poco tiempo plántulas adecuadas para el inicio de la regeneración. La respuesta *in vitro* de los explantes fue evaluada en cuatro tratamientos, se usó el medio de cultivo basal propuesto por Murashige y Skoog (MS) con ácido  $\alpha$ -naftalénacético (ANA) y 6-bencil aminopurina (BAP) en diferentes combinaciones. El mayor porcentaje (30%) en la inducción de brotes se logró con 0.1 mg l<sup>-1</sup> de ANA y 1mg l<sup>-1</sup> de BAP. La presencia de callos y raíces se pudo observar a partir de los 7 días de iniciado el cultivo en el tratamiento con la combinación 1mg l<sup>-1</sup> de ANA y 0.1 mg l<sup>-1</sup> de BAP. Los callos presentaron de 1 a 2 brotes adventicios por explante después de 30 días de cultivo y de 3 a 6 brotes a los 70 días después de esta. Además, se observó la presencia de plántulas adventicias completamente formadas (tallo y raíz) a partir de la quinta semana de iniciado el cultivo. Se concluye que la mejor combinación para la regeneración *in vitro* fue 0.1 mg l<sup>-1</sup> de ANA y 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP.

Palabras clave: organogénesis indirecta, auxina, citoquinina

### ABSTRACT

Tomato is a species of agricultural importance. Besides, it is a source of vitamins, minerals and antioxidant compounds. Therefore it is essential to obtain varieties resistant to diseases. *Solanum pimpinellifolium* L. 'Tomatillo wild', one of the wild relatives of tomato, is considered multipurpose reservoir of genes. This characteristic must be exploited. *In vitro* plantlets from leaves of 'wild tomatillo' were regenerated with this objective. A system for *in vitro* germination of seeds obtained from *ex vitro* sources was created. The use of seed allowed obtaining adequate seedlings in a short time to start regeneration. The *in vitro* response of explants was evaluated in four treatments. The Murashige and Skoog (MS) basal culture medium supplemented with  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzyl aminopurine (BAP) was used in different combinations. The higher percentage (30%) of shoot induction was achieved with 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA / 1 mg l<sup>-1</sup> BAP. The presence of callus and roots was observed after seven days of culture in the combination treatment with 1 mg l<sup>-1</sup> NAA / 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP. Callus showed 1 or 2 adventitious shoots per explant after 30 days of culture and 3 to 6 shoots after seventy days. Furthermore, the presence of fully formed adventitious plantlets (shoot and root) was observed after the fifth week of culture. Therefore, the best combination for *in vitro* regeneration is NAA 0.1 mg l<sup>-1</sup> / 1 mg l<sup>-1</sup> BAP.

Keywords: auxin, cytokinins, indirect organogenesis

### INTRODUCCION

El género *Solanum* (*Solanaceae*), comprende unas 2 500 especies las cuales están difundidas, particularmente, en América del Sur. Su versatilidad para consumo en fresco o en conserva y su adaptabilidad han jugado un papel fundamental en su rápida y extensa utilización (Jones *et al.*, 2001). La significativa diversidad

del tomate y su potencial para la mejora futura de las variedades cultivadas, han sido revisadas recientemente desde varias perspectivas (Bretó *et al.*, 2003; Ball *et al.*, 2007; Zuriaga *et al.*, 2009). Los esfuerzos en su mejora genética, han dado lugar a cultivares adaptados a una diversidad de ambientes, métodos de producción y usos alimentarios, siendo uno de los objetivos principales el desarrollo de cultivares resistentes

a enfermedades. Los parientes silvestres del tomate cultivado son los que con frecuencia han proporcionado la única fuente inicial de genes de resistencia a factores bióticos y abióticos. Este grupo incluye a *S. hirsutum* (tolerancia al frío), *S. pennellii* (tolerancia a sequía), *S. peruvianum* (resistencia a insectos), *S. chilense* (resistencia a nemátodos) y *S. pimpinellifolium* (resistencia a hongos y virus) (Jones *et al.*, 2001).

*S. pimpinellifolium* L. 'tomatillo silvestre' (*Solanaceae*) es una planta herbácea común en la costa de Perú y Ecuador (Rick *et al.*, 1997; Caicedo y Schall, 2004) es fuente de minerales, vitaminas y compuestos antioxidantes, además de su resistencia a enfermedades fúngicas y virales (Bretó *et al.*, 1993).

La propagación vegetativa *in vitro* permite obtener en corto tiempo, en condiciones bien establecidas, un gran número de individuos, en un espacio reducido y se puede iniciar a partir de nudos y yemas. Además, existen técnicas de propagación de plantas *in vitro*; como la organogénesis y embriogénesis, mediante regeneración de plantas en los cuales se pueden regenerar nuevos brotes o embriones adventicios y de ellos plantas. Este es un importante procedimiento para la selección, producción y la investigación en biología vegetal.

Durante muchos años se han conocido sistemas *in vitro*, mediante los cuales se pueden formar brotes directamente de una parte de la planta, sin la formación de un callo. A este proceso se le denomina organogénesis directa (Bhojwani y Razdan, 1983; Arellano *et al.*, 2009). Sin embargo, existe también la organogénesis indirecta, la cual forma brotes o raíces adventicias con la previa aparición de un callo (Serrano y Piñol, 1991).

La formación *in vitro* de raíces o brotes depende de la adecuada proporción de auxinas y citoquininas añadidas en el medio de cultivo. Un balance hormonal endógeno es favorable para la morfogénesis y en algunos casos, esto puede ser producido por diversos tratamientos exógenos o por procesos del mismo explanto (Peres *et al.*, 1999; Peres y Kerbauy, 1999).

Unas de las condiciones de los cultivos *in vitro* son las concentraciones adecuadas de reguladores del crecimiento. Las citoquininas son clásicas hormonas estimuladoras de la división y diferenciación celular que afectan una amplia

gama de procesos de desarrollo de las plantas, entre los que cabe citar la iniciación del desarrollo del cloroplasto, el retraso de la senescencia, la movilización de nutrientes, la estimulación de la expansión de los cotiledones, así como la inducción de la formación de brotes en cultivos de tejidos vegetales (Cejudo, 2002).

La auxina es la principal hormona en el control del desarrollo de la raíz. Por ejemplo, la adición exógena de ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) a raíces primarias de maíz (*Zea mays*) inhibe la elongación y estimula el crecimiento radial (Kerk y Feldman, 1995). Muchas especies requieren las auxinas más fuertes como ácido indol-3-butírico (IBA) o ANA para estimular la formación de la raíz (Salisbury y Ross, 1994).

Se conoce un gran número de especies en las cuales se puede fomentar la proliferación de brotes en los explantes, mediante la adición de una o varias citoquininas y auxinas al medio de cultivo basal; en consecuencia, se puede inducir a formación de brotes o raíces ajustando la relación auxina: citoquinina exógena (Bhojwani, 1990; Krikorian, 1991).

Las especies de *Solanum* que se han regenerado a partir de explantes foliares incluyen *S. ducamara*, *S. khasianum*, *S. laciniatum*, *S. nigrum* y *S. tuberosum* (Zenktele, 1972; Bhatt *et al.*, 1979; Whalen *et al.*, 1981; Roest y Bokelmann, 1976; Evans y Sharp, 1986). Estos estudios indicaron que la regeneración de brotes depende de una relación de altas concentraciones de citoquininas y baja en auxinas.

En *S. lycopersicoides*, se ha informado rizogénesis a partir de callos con la adición de ANA (15 mg l<sup>-1</sup>) o ácido 2,4-D diclorofenoxiacético (2,4-D) (1 mg l<sup>-1</sup>) (Burza *et al.*, 2003) o también, en la misma especie, utilizando raíces para obtener brotes adventicios con benciladenina (BA) (5 mg l<sup>-1</sup>) (Tylicki, 2008).

Por otra parte en *S. melongena*, en otra experiencia también se obtuvieron brotes adventicios a partir de raíces utilizando tiazurón (TDZ) (0.45  $\mu$ M) y 6-BAP (13.3  $\mu$ M) (Mukherjee *et al.*, 1991; Franklin *et al.*, 2004).

En la historia de la tecnología del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, las razones del fracaso

en la inducción de nuevos tejidos u órganos en los tejidos vegetales son aún desconocidas.

Hasta ahora no se conoce de un protocolo de regeneración *in vitro* de tomate general, debido a que ello depende del cultivar, de la concentración y tipo de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, de las condiciones fisiológicas del donante y del tipo de explante utilizado, etc. (Xiang *et al.*, 2008).

Con lo expuesto, el interés de este trabajo fue regenerar *in vitro* plantas de *Solanum pimpinellifolium* a partir de explantes foliares.

## MATERIALES Y METODOS

### Obtención del material biológico

Se utilizaron hojas de *Solanum pimpinellifolium* L. «tomatillo silvestre» a partir de semillas germinadas *in vitro*, de 20 días de cultivo. Las semillas fueron recolectadas del campus universitario de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT), y fueron identificadas taxonómicamente en el Herbarium Truxillense (HUT). La experiencia se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales (UNT).

### Germinación de semillas

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con etanol al 70% (v/v) por 1 minuto o hipoclorito de sodio (lejía) 3% (v/v) por 4 minutos, seguido de cuatro enjuagues en agua destilada estéril en cada proceso. Se colocaron 20 semillas por frasco de vidrio, éstos contenían medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962). Las semillas se acondicionaron a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y fotoperiodo de 16

horas de luz y 8 horas de oscuridad ( $46 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) mediante lámparas de luz fluorescentes blanca (Fig. 1a).

### Regeneración de plántulas

#### - Medio de cultivo basal y tratamientos

Se utilizó el medio de cultivo basal MS completo con diferentes combinaciones de ácido  $\alpha$ -naftalénacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP), vitaminas de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968), 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y agar agar al 1% (m/v). Se ajustó el pH entre 5.5 a 6.5. Luego se esterizaron en una autoclave durante 30 minutos con 15 libras de presión y 121°C.

#### - Establecimiento del explante

El establecimiento de los explantes foliares se realizó bajo condiciones de asepsia. Para ello, se utilizó una cámara estéril previamente acondicionada (Fig. 1b). Los explantes procedentes de plantas de 20 días de cultivo fueron introducidos en frascos con 2 ml de medio de cultivo semisólido (Fig. 1c), de modo que siempre el envés estuvo en contacto con el medio de cultivo, además se subcultivaron cada treinta días. Los explantes se incubaron a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , con un fotoperiodo de 16:8 (Fig. 1d).

### Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Para establecer el efecto de los reguladores de crecimiento sobre los explantes, se formularon cuatro tratamientos (Tabla 1) cada uno con tres repeticiones. Cada tratamiento consistió de treinta unidades experimentales las cuales se evaluaron cada treinta días de cultivo.

Tabla 1. Combinaciones de reguladores de crecimiento ANA-BAP (cuatro tratamientos) que se utilizaron para la regeneración de plántulas a partir de explantes foliares de *S. pimpinellifolium* L.

Tratamiento	Regulador de crecimiento (mg l <sup>-1</sup> )	
	ANA	BAP
T1	0.1	1.0
T2	1.0	0.1
T3	0.1	0.1
T4	1.0	1.0

### Evaluación

Con los datos recolectados, se determinó: número de brotes por callo, número de callos, masa seca y fresca de callo (g).

Con estos datos se procedió aplicar las siguientes fórmulas:

- Porcentaje de regeneración de brotes (explantos desdiferenciados en brotes, con presencia de tallo y raíz): número de explantes que se desdiferencian en brotes x 100 / número total de explantes de cada tratamiento.
- Porcentaje de regeneración de raíces (explantos desdiferenciados en raíces, con presencia de callo y raíz): número de explantes que se desdiferencian en raíces x 100 / número total de explantes de cada tratamiento.
- Porcentaje de callos (explantos no desdiferenciados, solo con presencia de callo): número de explantes que solo produjeron callos x 100 / total de número de explantes de cada tratamiento.
- Evaluación cualitativa de brotes, utilizando una escala de 1 a 5.

5: hojas y tallos verde oscuro, no hay etiolación, 4: hojas y tallo verde oscuro, poca etiolación, 3: brotes apicales y hojas superiores verdes, etiolación presente, 2: brote apical verde, hojas y tallo marrón, 1: todas las plántulas marrones, brote apical no verde, plántulas muertas.

Tasa de crecimiento del callo: se pesaron los callos cada 30 días y se utilizó la siguiente fórmula:  $T_c = W_2 - W_1 \times 100 / t_2 - t_1$

Donde:  $W_2$ : peso final  
 $W_1$ : peso inicial  
 $t_2$ : tiempo final  
 $t_1$ : tiempo inicial

Análisis estadístico: a los datos obtenidos se les calculó el promedio y se sometieron a un análisis de varianza (ANAV) con una significancia de ( $p < 0.05$ ) y la prueba de Tukey (5% de probabilidad) (Steel y Torrie, 1988).

Análisis histológico: para el análisis del proceso de des-diferenciación se tomó un explante de cada tratamiento. Este fue colectado al primer y quinto día de iniciado el cultivo y luego cada 30 días. Los explantes a analizar se conservaron en solución FAA y luego de procesarlas se procedió al corte histológico (secciones de 8-10  $\mu$ M) utilizando un micrótopo. Para la coloración de los tejidos se utilizó safranina (1%, m/v) en 50% (v/v) de etanol y hematoxilina al 2% (v/v). Las observaciones y las microfotografías se realizaron con un microscopio NIKON con un aumento de 400x con cámara digital Olympus (5.1 megapixel), respectivamente.

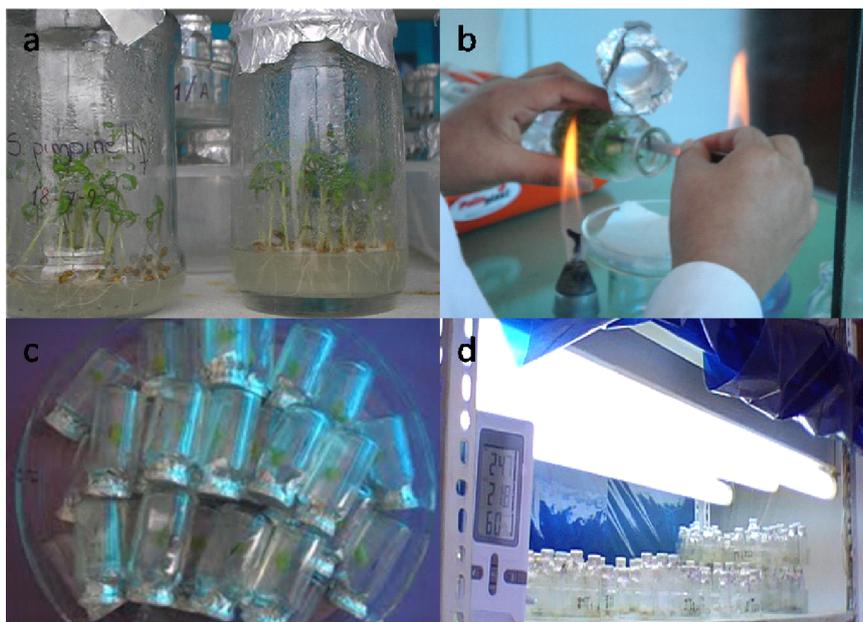


Figura 1. Procedimiento de introducción de los explantes foliares de *S. pimpinellifolium*: a) Plántulas de *in vitro* de donde se obtuvieron los explantes foliares, b) Preparación del explante, c) Explantes foliares en el medio inductor y d) Tratamientos en la sala de incubación.

## RESULTADOS

Se logró la formación de brotes, raíces y callos de *S. pimpinellifolium* L. a partir de explantes foliares.

En el tratamiento 1: (0.1 mg l<sup>-1</sup> ANA + 1 mg l<sup>-1</sup> BAP) se obtuvo el mayor porcentaje de brotes inducidos (30%). La presencia de callos se observó a partir de la segunda semana de iniciado el cultivo, mientras que las raíces (en número de dos) emergieron aproximadamente a partir de los 30 días en este tratamiento. Los callos verdes y prominentes presentaron de uno a dos brotes adventicios por explante después de 30 días de cultivo y de tres a seis brotes a los 70 días (Tabla 2).

En el tratamiento 3: (0.1 mg l<sup>-1</sup> el ANA + 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP), se observaron callos de tamaño similar al tratamiento 1, sin embargo, las raíces fueron más abundantes (en número de cuatro), a partir de la tercera semana, en este tratamiento se regeneraron de tres a cinco brotes después de 60 días de cultivo (Tabla 2).

En los tratamientos donde ANA se añadió a las concentraciones de (1.0 mg l<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP, tratamiento 2 y 1.0 mg l<sup>-1</sup> ANA + 1.0 mg l<sup>-1</sup> BAP, tratamiento 4), no se observó formación de brotes pero sí la presencia de callos (poco visibles) y gran cantidad de raíces; en un número mayor a 10; todo ello a partir de los 10 días de iniciado el cultivo (Tabla 2).

De los promedios estimados (%) del número de callos y número de explantes foliares que regeneraron raíces y brotes adventicios

(Tabla 2), se observó que el tratamiento 2 y el tratamiento 4 indujeron en su totalidad (100%) raíces adventicias, con un número promedio de nueve raíces regeneradas. Los brotes regenerados en los tratamientos 1 y 3 (combinaciones de ANA 0.1 mg l<sup>-1</sup> y BAP 0.1 y 1.0 mg l<sup>-1</sup>) se les describió con hojas y tallos verde oscuro, y sin etiolación por lo que fueron ubicados en la escala de 5, según la evaluación de brotes.

Para la tasa de crecimiento de los callos (Tabla 3), la masa fresca (relacionado con la presencia de agua en los tejidos) a los 30 días fue mayor el tratamiento 1 (0.75), a los 60 días el tratamiento 2 (0.39) y a los 90 días en el tratamiento 1 (1.97), mientras que, la masa fresca (relacionado a la cantidad de materia orgánica e inorgánica sintetizada) presentó la misma tendencia. En cambio cuando se analizó la proporción de crecimiento del callo por tratamiento, fue el tratamiento 1 el que destacó en masa fresca y masa seca. También se debe anotar que el tratamiento 1 fue el que mayor número de brotes produjo (30%) lo cual coincidió con el mayor porcentaje de crecimiento de los callos.

En el proceso de regeneración (Fig. 2), que se inició a partir de un explante foliar (Fig. 2a) se observó la formación de callos (Fig. 2b) antes de la emergencia de las raíces adventicias (Fig. 2c) a los 15 días de cultivo. Se consideró un brote adventicio regenerado (Fig. 2d, Fig. 2e) desde que se hizo visible a simple vista. Esto ocurrió aproximadamente a los 40 días de cultivo. Se esperó su máximo desarrollo *in vitro* (Fig. 2f) para aclimatizarlos (Fig. 2g).

Tabla 2. Porcentajes (%) de callos y regeneración de raíz y brote obtenidos a partir de explantes foliares de *S. pimpinellifolium* 'tomatillo silvestre' a los 90 días de cultivo.

Tratamientos	callos	raíz	brotes <sup>a</sup>	N° de raíces por explante
T1	6	65	30	2
T2	0	100	0	>10
T3	15	70	15	4
T4	0	100	0	7

Donde: T1: (0.1 mg l<sup>-1</sup> ANA + 1 mg l<sup>-1</sup> BAP), T2: (1.0 mg l<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP), T3: (0.1 mg l<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP) y T4: (1.0 mg l<sup>-1</sup> ANA + 1.0 mg l<sup>-1</sup> BAP)

<sup>a</sup>: Según la escala de evaluación de brotes, todos los brotes están en la escala de 5.

Tabla 3. Crecimiento relativo de los callos (%) a los 30, 60 y 90 días de cultivo en los cuatro tratamientos diseñados para la regeneración *in vitro* de *S. pimpinellifolium* 'tomatillo silvestre'.

Días	Masa Fresca (g)			Masa Seca (g)		
	30	60	90	30	60	90
Tratamientos						
T1	0.75	0.27	1.97	0.08	0.001	0.26
T2	0.26	0.39	0.27	0.04	0.015	0.006
T3	0.07	0.07	0.82	0.01	0	0.1
T4	0.58	0.15	0.95	0.06	0.66	0.06

Donde: T1: (0.1 mg l<sup>-1</sup> ANA + 1 mg l<sup>-1</sup> BAP), T2: (1.0 mg l<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP), T3: (0.1 mg l<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP) y T4: (1.0 mg l<sup>-1</sup> ANA + 1.0 mg l<sup>-1</sup> BAP)

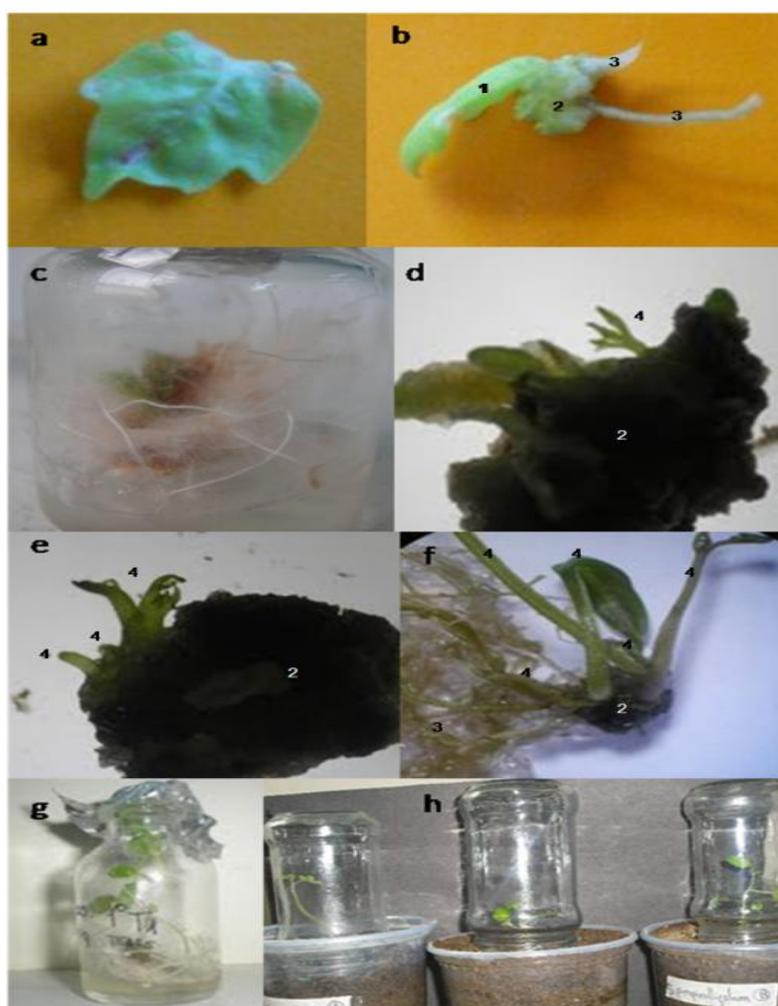


Figura 2. Proceso de regeneración de brotes a partir de explantes foliares de *S. pimpinellifolium*. a) Explante foliar introducido en el medio inductor, b) Explante foliar de 15 días de cultivo con raíces adventicias, c) Explante foliar de 40 días de cultivo, con numerosas raíces, d) Regeneración del explante foliar con varios brotes adventicios después de 45 días de cultivo, e) Regeneración de explantes foliares con varios brotes adventicios de 60 días de cultivo, f) Regeneración del explante foliar con varios brotes adventicios de 80 días de edad, g - h) Aclimatación del brote de *S. pimpinellifolium*. Aumento 40x, barra (I) 3 mm. 1. Explante, 2. Callo, 3. Raíz, 4. Brote

Con respecto a la histología de las células del mesófilo diferenciadas (Fig. 3a), éstas iniciaron un crecimiento desordenado a partir de las 48 horas de iniciada la siembra (Fig. 3b, 3c, 3d), dando lugar a formación de 'masas celulares' (células pequeñas en división y agrupadas, delimitadas en el tejido del callo) a los 15 días

(Fig. 3e, 3f) y agrupaciones más consistentes a los 30 días de las cuales se empezó a diferenciar el tejido meristemático (Fig. 3g, 3h). El tejido vascular se diferenció a los 60 días (Fig. 3i, 3j) y se observó la presencia de gran cantidad de vasos escalariformes a los 90 días de cultivo (Fig. 3l).

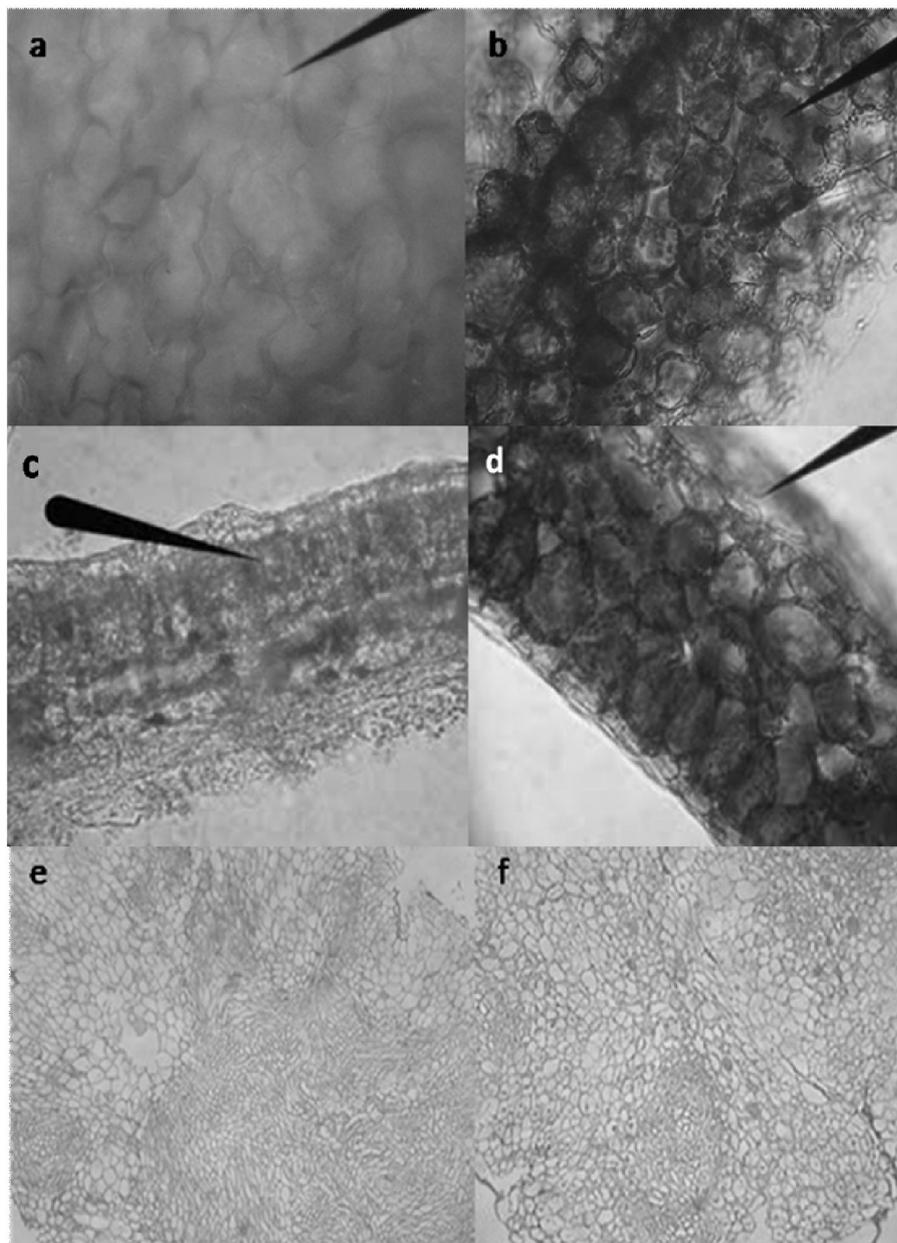


Figura 3. Etapas en la inducción de callos (callogénesis) en los explantes foliares de *S. pimpinellifolium*. a) Lámina foliar con células ordenadas, corte superficial (testigo), b) lámina foliar a las 48 horas con células alargadas por efecto de ANA/BAP, corte superficial c) Lámina foliar control, corte transversal, d) Células a los 5 días de siembra con un crecimiento desordenado, corte transversal, e) Células pequeñas en división (15 días), f) Células pequeñas formando 'masas' (15 días). Coloración con Wright (b, c, d), coloración con hematoxilina (e, f), Vista a 400x

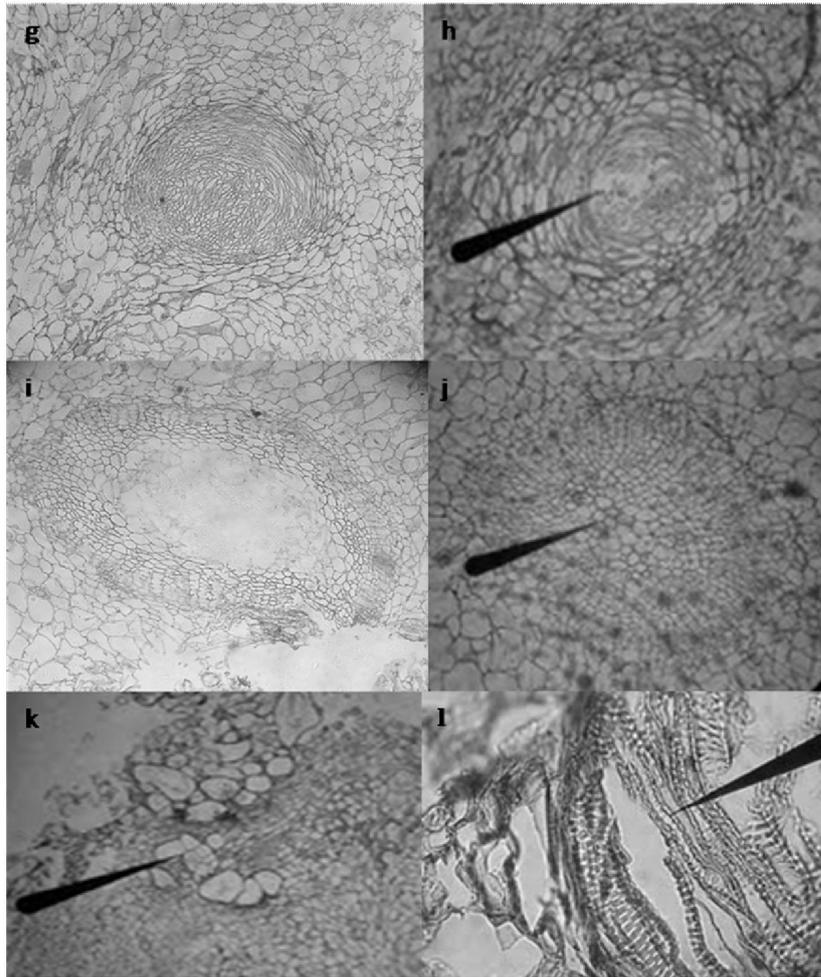


Figura 3. g) Células en división agrupadas dando la apariencia de un 'nido' (30 días), h) Diferenciación del tejido meristemático (30 días), Células pequeñas (al interior) y células más grandes (al exterior), i) Tejido meristemático dejando un espacio lisígeno (60 días), j) Diferenciación de tejido vascular (60 días), k) Presencia de vasos xilemáticos (60 días), corte trasversal, l) Presencia de vasos escalariformes en fase de transición (90 días), corte longitudinal. Coloración con hematoxilina, Vista a 400x.

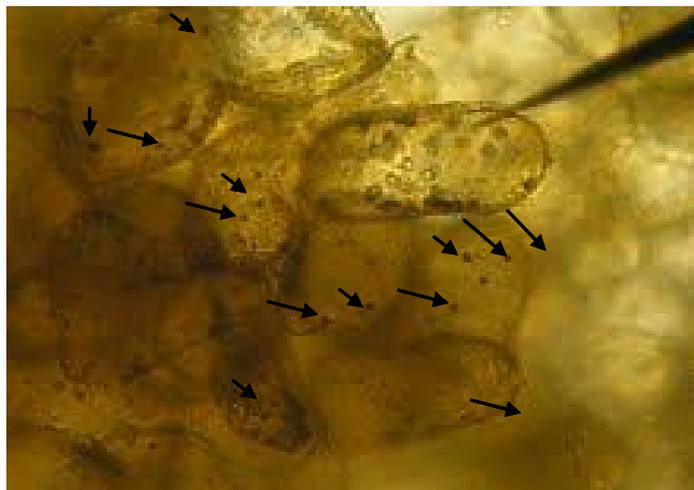


Figura 4. Granos de almidón al interior de las células que conforman un callo. Vista 400x. Tinción con lugol.

## DISCUSIÓN

En esta experiencia se utilizaron cuatro combinaciones de ANA/BAP (Tabla 1), en las cuales los explantes foliares reaccionaron ante el estímulo exógeno de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Tabla 2), así todos los tratamientos mostraron callos y raíces por efecto de la auxina y esto depende de su concentración y de su interacción con otro regulador de crecimiento para la inducción de embriones u órganos y esta relación debe ser igual o mayor en algunos casos (Andrango y Ortega, 1992). Además, los cambios se manifiestan debido a que la auxina promueve divisiones longitudinales y transversales para formar pequeñas células isodiamétricas (Wang y Cuming, 1996), que se alargaron para diferenciar las células en raíces. Tanto en el T2 (1.0 mg l<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP) como en el T4 (1.0 mg l<sup>-1</sup> ANA + 1.0 mg l<sup>-1</sup> BAP) presentaron 100% de rizogénesis a los 30 días de iniciada la siembra. Estos resultados concuerdan con la experiencia de Ocampo y Núñez (2007), quienes utilizaron ANA (0.25 mg l<sup>-1</sup>) para el enraizamiento *in vitro* de *Psidium guajaba*. Se obtuvo 100% de plántulas enraizadas entre los 15 y 30 días de iniciada la experiencia.

No hay duda que la relación citoquinina/auxina (mayor a 1) es efectiva para la formación de brotes, así se demostró en el tratamiento 1 (0.1 mg l<sup>-1</sup> ANA + 1 mg l<sup>-1</sup> BAP), el mayor número de brotes formado (30%). Según las referencias revisadas, la diferenciación de yemas se logra en un medio de cultivo que tenga la relación mencionada al inicio, mientras que para diferenciar raíces se requieren medios de cultivo con la relación inversa (Pedroza, 2008). Así lo demostraron Unda *et al.* (2007), quienes utilizando combinaciones de ANA/BAP hallaron organogénesis favorable para *Exaccum*, con gran número de brotes y de alta calidad. Ellos sustentaron que la formación de vástagos adventicios fue altamente dependiente de la proporción citoquinina/auxina.

Otra explicación para la formación de brotes en el tratamiento 1 (0.1 mg l<sup>-1</sup> ANA + 1 mg l<sup>-1</sup> BAP) fue la plasticidad y juvenilidad del explante. En esta experiencia los explantes fueron de 20 días de cultivo, lo que permitió una mejor división celular y por ende la iniciación de los brotes (Tiwari y Tuli, 2009). Esta hipótesis es similar

a la dada por Kyung *et al.* (2007) quienes confirmaron que los explantes jóvenes son menos informada y poseen un metabolismo alto y se registró una alta tasa de regeneración en este caso usando hojas jóvenes de manzana (*Malus domestica*) como explantes en su experiencia.

Algo que destacar es que todos los tratamientos indujeron el desarrollo de raíces y fue mayor en los tratamientos 2 (1.0 mg l<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP) y 4 (1.0 mg l<sup>-1</sup> ANA + 1.0 mg l<sup>-1</sup> BAP) (100%) porque la relación citoquinina: auxina fue menor a 1. Además, ambos tratamientos no indujeron la formación de brotes, por la actividad antagónica de ANA. En los cultivos *in vitro* la auxina exógena orienta diferentes vías de desarrollo a favor de la callogénesis o rizogénesis de acuerdo con su concentración (Kanmegne y Omokolo, 2003). Otras experiencias apoyan la hipótesis de que las células dan origen a callos como a primordios de raíces, utilizando 0.5-2.5 μM de ANA (D' Onofrio y Morini, 2006; Gueye *et al.*, 2009).

En el tratamiento 3 (0.1 mg l<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP) se observó el mayor porcentaje de callos (15%), 70% de raíces y baja producción de brotes (15%). Esto puede deberse a que la distribución de la citoquinina durante la organogénesis del vástago *in vitro* es dinámica y asimétrica, un patrón de distribución hormonal es esencial para el destino celular. Sin embargo, la respuesta de la auxina y citoquinina, durante la regeneración del órgano puede ser divergente en medios de cultivo donde se combinan bajas concentraciones de estos reguladores, por ello, puede ser probable que puedan inducir callos, raíces y brotes a la vez actuando sinérgicamente en pequeñas cantidades (Xiang *et al.*, 2008).

Sobre el crecimiento relativo de los callos (Tabla 3) parece haber una relación directa entre el crecimiento del callo, la formación de brotes y presencia de almidón (Tratamiento 1 de Tabla 2 y 3), debido a que la presencia de grandes cantidades de almidón se acumula en los callos, y esto se requiere para la formación de yemas (Fig. 4) (Pedroza, 2008).

En relación con la histología de los brotes, no hay duda que los reguladores del crecimiento

promueven la formación de nuevos tejidos meristemáticos y haces vasculares (vasos xilemáticos) (Fig. 3k, 3l) a los 15 días de cultivo, y esta respuesta también puede deberse a la posición del explante, así cuando la superficie adaxial está en contacto con el medio de cultivo ocurre un alto intercambio de oxígeno, porque el parénquima empalizado es capaz de transportar nutrientes y reguladores de crecimiento del medio al explante (Kyung-Moon *et al.*, 2007).

## CONCLUSIONES

Con la metodología aplicada fue posible la regeneración de brotes y raíces de *S. pimpinellifolium*. Además, esta investigación contribuye a incrementar los conocimientos de los efectos de los reguladores del crecimiento sobre la organogénesis en tomatillo silvestre.

## REFERENCIAS

- Alarcón, J, Castaño L, Corrales G, Giménez G, Díaz C (2006) Evaluación de algunas combinaciones de reguladores de crecimiento inductoras de callos en achote (*Bixa orellana* L.), planta activa contra la mordedura de serpientes. Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica 13(1): 17-23
- Andrango, B, Ortega N (1992) Embriogénesis somática y metodología de desinfección en papa *Solanum tuberosum* L. var. 'María'. Rumipamba 1992; IX (2): 1-21
- Arellano, J, Fuentes S, Castillo-España P, Hernández G (2009) Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogénesis. Plant Cell Tiss Organ Cult 96: 11-18
- Ball, Y, Lindhout P (2007) Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? Annals of Botany 100: 1085–1094
- Bhatt, N, Bhatt D, Sussex M (1979) Organ regeneration from leaf discs of *Solanum nigrum*, *S. dulcamara* and *S. khasianum*. Z Pflanzenphysiol. 95: 355-62
- Bhojwani, SS (1990) Plant Tissue Culture. Applications and limitations. Elsevier Science Publisher. Amsterdam.
- Bhojwani, S, Razdan S (1983) Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier Science Publisher. Amsterdam
- Bretó, M, Asins J, Carbonell E (1993) Genetic variability in *Lycopersicon* species and their genetic relationships. Theor Appl Genet 86:113-120
- Burza, W, Dziadczyk L, Tylicki A, Kura M, Malepszy S (2003) Characterisation of *Solanum lycopersicoides* Dftn. root primordia cultura .with plant recovery. Physiologiae Plantarum 25 (4): 385-394
- Caicedo, A, Schall B (2004) Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. Mol Ecol 13: 1871-1882
- Jones, J, Stall R, Zitter, T (2001) Plagas y enfermedades del tomate. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona
- Cejudo Fernández, F J (2002) Metabolismo y modo de acción de fitohormonas. VIII Simposio. Junta de Andalucía: Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla, España
- D' Onofrio, C, Morini, S (2006) Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration *in vitro* grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. Sci Hortic 107: 194-199
- Evans, A, Sharp, W (1986) Somaclonal and gametoclonal variation. Handbook of plant cell culture. Vol. 4. pp. 97-132 MacMillan New York
- Franklin, G, Sheeba C, Sita L (2004) Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant 40: 188-191
- Gamborg, O, Miller, R, Ojima, K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Exp Cell Res 50: 151-158
- Kanmegne, G, Omokolo N (2003) Changes in phenol content and peroxidase activity during *in vitro* organogénesis in *Xanthosoma sagittifolium* L. Plant Growth Regul. 40: 53-57
- Kerk, N, Feldman, L (1995) A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. Development 121:2825-2833
- Krikorian, AD (1991) Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W M, Mroginski, LA (Eds) Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamento y Aplicaciones. CIAT Cali
- Kyung-Moon, K, Young Kim M, Yong Yun P, Chandrase Khar T, Hyo-Yeon L, Pill-Soon S (2007) Production of multiple shoots and plant regeneration from leaf segments of fig tree (*Ficus carica* L.). HortScience 38(6): 81-84
- Mukherjee, K, Rathinasabapathi, I, Gupta, N (1991) Low sugar and osmotic requirements for shoot

- regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25: 13-16
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Ocampo, F, Núñez, V (2007) Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogenesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8(1): 22-27
- Pedroza, M (2008) Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá
- Peres, P, Amar S, Kerbauy G, Salatino A, Zaffari R, Mercier H (1999) Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (*Orchidiaceae*) into buds. *J Plant Physiol* 155:551-555
- Peres, P, Kerbauy G (1999) High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin to cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (*Orchidiaceae*) *Plant cell Rep* 18:1002-1006
- Reed, BM (2002) Photoperiod improves long-term survival of *in vitro*-stored strawberry plantlets. *HortScience* 37(5):811-814
- Rick, M, Fobes F, Holle M (1977) Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*: evidence of evolutionary change in mating systems. *Plant Syst Evol* 127:139-170
- Roca, W, Mroginski L (1991) Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamento y Aplicaciones. CIAT. Cali
- Roest, S, Bokelmann G (1976) Vegetative propagation of *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. *Potato Res.* 19: 173-178
- Salisbury, F, Ross C (1994) *Fisiología Vegetal*. 4ª edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México
- Serrano, G, Piñol S (1991) *Biotecnología Vegetal*. Editorial Síntesis. Madrid
- Steel, R, Torrie J (1988) *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. 2da edic. Mcgraw Hill. México
- Tiwari, S, Tuli R (2009) Multiple Shoot regeneration in seed-derived immature leaflet explants of peanut (*Arachis hypogea* L.). *Scientia Horticulturae* 121:223-227
- Tylicki, A, Burza W, Kuras M, Malepszy S (2008) Shoot meristem differentiation in shoot primordia culture (SPC) obtained from root primordia culture (RPC) of *Solanum lycopersicoides* Dun. *Acta Physiol Plant* 30: 19-25
- Unda, F, Kalynyak P, Riseman A (2007) Organogenesis plant regeneration from leaf explant of *Exaccum*. *Styer Group* 20: 223-227
- Wang, T, Cuming A (1996) *Embryogenesis. The generation of a plant*. Oxford, UK: Bios Scientific Publish Lmt
- Whalen, M, Costich D, Heiser C (1981) Taxonomy of *Solanum* section lasiocarpa. *Gentes Herb.* 12: 41-129
- Xiang Yu, Z, Ying Hua S, Zhi Cheng J, Sheng Zhang X (2008) Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. *Plant Biology* 50 (7): 816-824
- Zenkter, M (1972) *In vitro* formation of plants from leaves of several species of the *Solanaceae* family. *Biochem Physiol Pflanzen.* 163: 509-12
- Zuriaga, E, Blanca J, Cordero L, Sifres A, Blas-Cerdán W, Morales R, Nuez, F (2009) Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 56:39–51