ANALIZADO

Reg 42652

Establecimiento de estructuras callosas y suspensiones celulares en Tomate de árbol (*Solanum betaceum)*

[1] Rodrigo Hoyos
[2] Giraldo A
[3] Martínez D.

Resumen

Explantes provenientes de hojas de plántulas de tomate de árbol crecidas *in vitro* en medio desarrollado por Hoyos (1996), fueron inducidos a la formación de callos friables en medio MS completo suplementado con 0.1 mg/L de 2,4-D y 0.05 mg/L de BAP. El crecimiento de los callos se cuantificó mediante la determinación del peso fresco, transplantándose posteriormente cuando su morfología era de callo friable, a medios líquidos con diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D, cada tratamiento fue sometido a agitación constante de 120 rpm, y luz moderada. Luego se determinaron las curvas de crecimiento respectivas mediante la cuantificación de los volúmenes celulares. Los medios de cultivo de las suspensiones celulares ya establecidas fueron renovados cada 10 días. Se realizaron varios tratamientos con diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D con el fin de inducir la formación de suspensiones embriogénicas necesarias para la obtención de material con resistencia a la acción de las toxinas producidas por *Colletotrichum gloeoesporoides* (causante de la Antracnosis). Los materiales resistentes a la toxina producto de una presión de selección podrán luego ser regenerados a plántulas, ser adaptados *ex vitro* y analizados y probados en el campo.

Introducción

El establecimiento de estructuras callosas friables y su posterior cultivo en medios líquidos facilita y permite una gran variedad de trabajos entre los cuales se cuenta la búsqueda de resistencia a estrés salino, drogas, enfermedades y herbicidas (Conner & Meredith, 1989) que demuestran el potencial que poseen las técnicas de cultivo de tejidos para la selección de materiales.

Las suspensiones celulares constituyen sistemas adecuados para el aislamiento y selección de mutantes. Con métodos similares a los utilizados en microbiología, se pueden tratar, manipular, plaquear y seleccionar un gran número de células (Szbados, Mroginski, 1991) características estas que facilitan el encontrar resistencias para un determinado factor, pues los cultivos de células en suspensión por si solos generan variabilidad genética (Meins, 1983).

En este trabajo describimos la inducción de estructuras callosas a partir de explantes foliares de tomate de árbol, el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos friables y posteriormente el desarrollo de suspensiones con estructuras embriogénicas.

[1] M. Sc. Ph. D. Profesor Universidad Nacional de Colombia (Medellín)
[2] Estudiantes de Biología Universidad de Antioquia (Medellín)
[3] Estudiantes de Biología Universidad de Antioquia (Medellín)

Materiales y Métodos

Material vegetal: Hojas jóvenes de plántulas crecidas *in vitro* de 3 a 4 semanas en medio de cultivo desarrollado por Hoyos, 1998 (en proceso para publicación) proveidas por el Laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de las Plantas de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellin fueron seccionadas en fragmentos de 0,5 cm^2 y utilizados como explante.

Establecimiento de cultivos de callos friables: Los cultivos fueron iniciados en medio MS (Murashige and Skoog, 1962) con 0,5 mg/l de Piridoxina, 0,5 mg/l de ácido nicotínico, 2 mg/l de glicina, 2% (w/v) de sacarosa, y diferentes concentraciones de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) y BAP (benzilaminopurina), solidificado con 0,8% (w/v) de agar y un pH de 7,6. Los explantes sembrados en estos medios fueron sometidos a condiciones de luz y oscuridad.

Determinación del crecimiento de callo: El crecimiento relativo (CR)del callo fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$CR = \frac{Pf - Pi}{Pi} \times 100$$

(Pf =peso final, Pi = Peso inoculo inicial)

Establecimiento de cultivos celulares: Callos friables de 8 a 11 semanas de edad fueron seccionados en partes de 0,5 ml de volumen aprox. (0,6gramos aprox) y luego inoculados a erlenmeyers de125 ml conteniendo 25 ml de medio líquido y mantenidos bajo agitación constante en un shaker giratorio a 120 rpm luz moderada y una temperatura de 25 $\pm$ 2°C.

Las suspensiones de células fueron filtradas a través de una malla de acero de 500 um de poro, removiéndose los agregados celulares mayores y permitiendo una suspensión de células individuales y agregados pequeños de no más de 4 a 6 células. La cuantificación de células se realizó mediante la determinación del volumen celular.

Volumen celular: Los volúmenes celulares fueron determinados utilizando como método centrifugación de las suspensiones celulares en tubos volumétricos a 5000 rpm por 10 minutos. El crecimiento se cuantificó a intervalos de 7 días durante 6 semanas consecutivas.

Resultados

Desarrollo de callos: Los callos iniciados a partir de explantes de hojas de plántulas crecidas in vitro mostraron un desarrollo acelerado bajo condiciones de oscuridad. Comparativamente los explantes crecidos en condiciones de luminosidad presentaron fenolización en ocasiones considerablemente alta, seguida del desarrollo de callos con caracteristicas friables.

Los callos friables obtenidos presentan textura y apariencia cremosa, su color claro presenta tonos en amarillo (Foto 1).

En la tabla 1 se indica cómo la mayoria de tratamientos induce la formación de callo sin embargo, callos friables solo se formaron en medios con concentraciones de 0,05 y 0,1 mg/l de con 2,4-D (Foto 2), sugiriendo así la fuerte influencia de esta auxina en el crecimiento celular. Los datos indican las concentraciones de 2,4-D y BAP adecuadas para el desarrollo de callos friables los cuales fueron 0,1 mg/l de 2,4-D y 0,05 de BAP respectivamente; una respuesta similar se observó al utilizar 0,05 mg/l de 2,4-D y 0.05mg/l de BAP.

Tabla 1. Respuesta del desarrollo de callos y callos friables a partir de segmentos de hojas de *Solanum betaceum* en medio MS con diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP.

2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	Callo	Callo friable
0	0	—	—
0	0,01	—	—
0	0,05	—	—
0	0,1	—	—
0	1	—	—
0,01	0	—+	—
0,01	0,01	—+	—
0,01	0,05	+	—
0,01	0,1	+	—
0,01	1	+	—
0,05	0	+	+
0,05	0,01	+	+
0,05	0,05	+++	+++
0,05	0,1	++	+
0,05	1	++	+
0,1	0	+	+
0,1	0,01	++	++
0,1	0,05	++++	++++
0,1	0,1	++	+
0,1	1	++	+
0,5	0	+	—
0,5	0,01	++	—
0,5	0,05	+	—
0,5	0,1	+	—
0,5	1	+	—
1	0	+	—
1	0,01	+	—
1	0,05	+	—
1	0,1	+	—
1	1	+	—
2	0	—	—
2	0,01	—+	—
2	0,05	—+	—
2	0,1	+	—
2	1	+	—

— No respuesta; + Respuesta baja; ++ Respuesta moderada;
+++ Respuesta alta; ++++ Muy alta respuesta; —+ Respuesta esporádica

Iniciación de suspensiones celulares: Trozos de callos friables se sembraron en medio líquido con concentraciones de 0.05 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de 2,4-D, en este medio se observó una separación de las células de los callos obteniendo un cultivo de células heterogéneo (Foto 3), después del 2do y 3er subcultivo se lograron suspensiones más homogéneas morfológicamente y sincrónicas filtrando las suspensiones iniciales a través de mallas de 500 y 200 micras (Foto 4 y 5).

Varias concentraciones de BAP y 2,4-D fueron utilizadas con el fin de evaluar el crecimiento celular, obteniéndose las curvas de crecimiento respectivas (Figura 1). Para la determinación del crecimiento celular fueron inoculados aproximadamente 0,5 ml de volumen celular (ver materiales y métodos), observándose marcadas diferencias en los volúmenes y por consiguiente en el crecimiento.

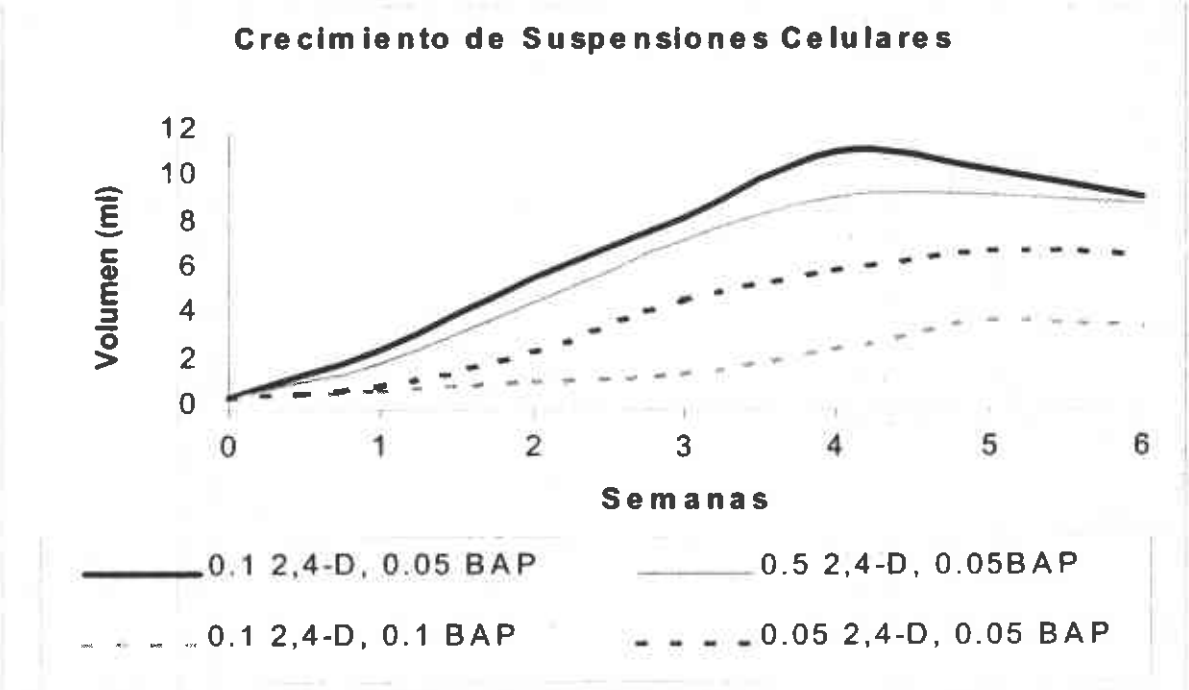

Figura 1. Curvas de crecimiento de las suspensiones celulares en MS suplementado con piridoxina, glicina, ácido nicotínico, sacarosa (Ver materiales y métodos) diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D, en el recuadro inferior se indican las concentraciones respectivas presentes.

Discusión

Los cultivos de células somáticas son ampliamente utilizados en trabajos de selección celular requieren generalmente extensos periodos para la estandarización de los medios ideales para su desarrollo y mantenimiento, sirviendo así de fuente de material vegetal para trabajos posteriores. La investigación en el presente trabajo describe el proceso de cultivo de células de *Solanum betaceum* cuya importancia radica en la posibilidad de seleccionar células por su resistencia al filtrado de fitotoxinas liberadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en medio liquido (Ortega,1996). Este hongo es el responsable de la Antracnosis del fruto, una de las principales enfermedades que afectan al tomate de árbol.

Uno de los puntos mas importantes en el establecimiento de las suspensiones celulares, es el desarrollo de material calloso, debido a las características de este con relación al crecimiento y consistencia permitiéndole liberar fácilmente las células al medio de cultivo, suministrando el material de inicio de las suspenciones celulares (Chen and Jonard,1994); además la posible variabilidad genética implicada en este proceso permitiría le selección de células con resistencia o tolerantes. Hemos observado como la adición de 0,1 mg/l de 2,4-D al medio de cultivo sólido

genera brotes callosos friables, en tanto que en medios líquidos favorece la proliferación celular. Sin embargo, otras concentraciones presentaron efectos similares, por ejemplo cuando se adicionaron 0.5 mg/l de 2,4-D, se logró una tasa más baja de crecimiento (Figura 1).

El crecimiento de las suspensiones celulares es posible determinarlo por diferentes métodos, entre los cuales se cuenta el peso fresco, peso seco, volumen celular; número de células y la utilización de medidas de turbidez entre otras. La importancia de conocer la tasa de crecimiento de las suspensiones, radica en la necesidad de establecer en el tiempo las diferentes etapas de crecimiento para determinar la periodicidad del subcultivo. Además, este conocimiento es fundamental para realizar trabajos de presión de selección; es de anotar, que en las diferentes etapas del crecimiento se pueden encontrar distintas formas de células, por tal motivo, es necesario identificar la morfología de las células mediante microscopía. Siendo ideales para un cultivo aquellas con formas esféricas, isodiamétricas y con núcleos grandes en relación con el citoplasma que son consideradas como células embriogénicas; varias metodologías de sincronización celular son ampliamente utilizadas siendo una de ellas la sincronización por tamizaje a través de una malla de acero u otro material inerte de acuerdo con el tamaño de las células. Este sistema de tamizaje fue utilizado para homogenizar los cultivos celulares dando paso al establecimiento e inducción de suspensiones con estructuras posiblemente embriogénicas que nos conduzcan a la regeneración de plántulas,

Bibliografía

Chen, C. S., and Jonard, R. 1994 Acquisition of friable calli from stem and establishment of the cell suspensions cultures of *Prunus armenica* L. cv Canino and Luizet J. *Plant Resources and Environment* **3:** 22-26

Conner, A.J., and Meredith,C.P.1989. Genetic manipulation of plants cells, In: the Biochemistry of plants: Acomprensive Treatise. Vol. 15 Molecular Biology. A Marcus De, Academic Press, Orlando.

Meins, F. Jr. 1983. Heritable variation in plant cell culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 34:327-406

Murashige,T, y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growthand bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Ortega,J. 1996 Pectolytic enzymes produced by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. Texas J. SSCI.48(2):123-128

Szabados, L.; Mroginski, L. A. y Roca, W. M. 1991, Cultivo de Tejidos en la Agricultura. CIAT: Cali, 969 p.

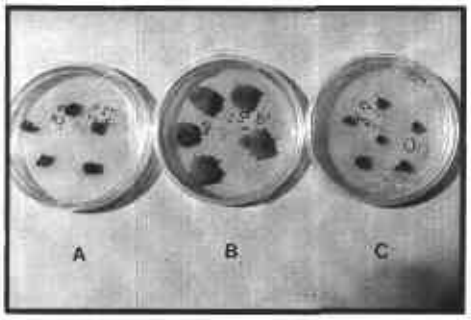

Foto 1. Callos friables creciendo bajo una concentración de 0.1 mg/l de 2,4-D y 0.05 mg/l de BAP.

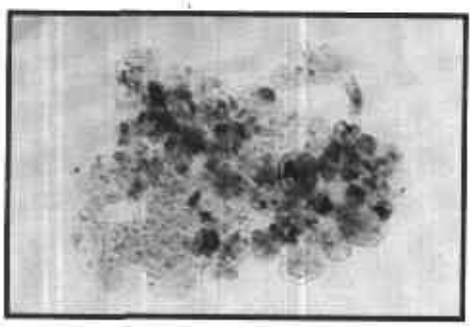

Foto2. Comparación del crecimiento y desarrollo de callos en medios con diferentes concentraciones 0,5 mg/l, B 0.1 mg/l, C 0 mg/l.

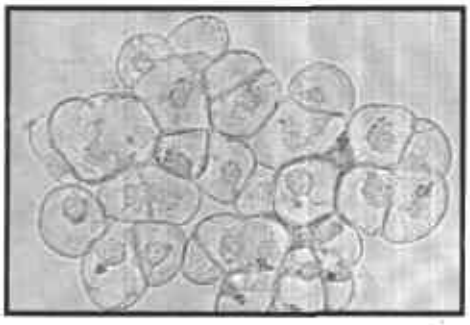

Foto 3. Agregados celulares heterogéneos agregado celular de un cultivo homogéneo. de un cultivo recien iniciado y con poca sincronización.

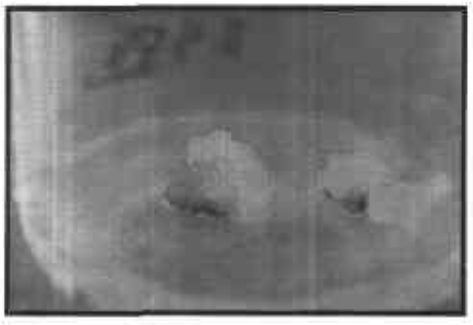

Foto 4. Célululas esféricas, sincrónicas en un agregado celular de un cultivo homogéno.

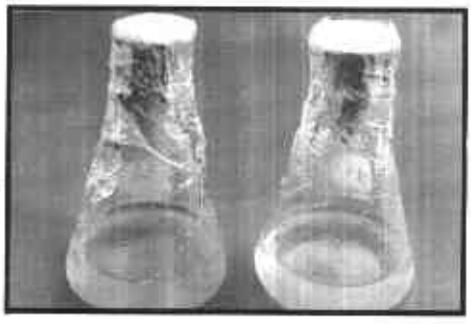

Foto 5. Cultivos celulares ya establecidos y homogéneos.