

OBTENCIÓN DE CALLOS DE PEPINO (*CUCUMIS SATIVUS* L) CV. HATUEY-1 A PARTIR DE COTILEDONES MADUROS.

Amelia Capote y Odalys Llorente.

**Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.
Email: acapote@inifat.co.cu**

RESUMEN

Se estudió el efecto de diferentes medios de cultivo y condiciones de fotoperíodo sobre la formación de callos de pepino cv. Hatuey-1 a partir de cotiledones maduros. Se utilizó el medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6- furfuril amino purina (KIN) y dos condiciones ambientales diferentes, un fotoperíodo de 14 horas luz y oscuridad continua. Los resultados obtenidos mostraron un mayor crecimiento de los callos en el medio suplementado con 0,5 mg.L⁻¹ 2,4-D y 0,5 mg.L⁻¹ KIN. La variable masa fresca, no mostró interacción significativa entre los medios de cultivo y las condiciones ambientales estudiadas, ya que independientemente de dichos factores, se produjo división celular y por consiguiente crecimiento de los callos.

OBTAINING OF CUCUMBER TRIPES (*CUCUMIS SATIVUS* L) CV. HATUEY-1 STARTING FROM MATURE COTYLEDONS.

ABSTRACT

It was studied the effect of different cultivation means and fotoperíodo conditions on the formation of tripes of cucumber cv. Hatuey-1 starting from mature cotyledons. The means MS suplementado was used with different acid concentrations 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) and 6 - furfuril amino purina (KIN) and two different environmental conditions, a fotoperíodo of 14 hours light and continuous darkness. The obtained results showed a bigger growth of the tripes in the means suplementado with 0,5 mg.L⁻¹ 2,4-D and 0,5 mg.L⁻¹ KIN. The variable fresh mass, didn't show significant interaction between the cultivation means and the studied environmental conditions, since independently of this factors, cellular division took place and consequently growth of the tripes.

INTRODUCCION

La recuperación de variedades de hortalizas con riesgo de erosión genética, cuando por diversas razones no ha sido posible la multiplicación y producción de la semilla básica de las mismas, constituye un aspecto importante para la diversificación de las variedades de estas especies en nuestro país.

Este es el caso de la variedad de pepino Hatuey-1, la cual se obtuvo mediante selección a partir de materiales introducidos. Entre sus características más importantes se encuentra la tolerancia al hongo *Pseudoperonospora cubensis*, causante de la enfermedad conocida como "Mildiú vellosa", y su resistencia al calor, lo cual hace que se pueda sembrar fuera de época óptima (Simanca y Díaz, 1980).

Las técnicas de cultivo de tejidos contribuyen en gran medida a la propagación de variedades hortícolas, y específicamente. la regeneración *in vitro* de las Cucurbitáceas ha sido objeto de considerable interés, por lo que han sido usados varios explantes para desarrollar callos y regenerar plantas. En este caso el establecimiento de un sistema de cultivo de tejidos posibilitaría la exitosa regeneración, cuando el número de semillas disponible sea limitado (Msikita *et al.*, 1990).

La callogénesis constituye el proceso más generalizado para el inicio de los cultivos en condiciones *in vitro*, ya que su inducción y establecimiento aseguran el desarrollo morfológico posterior. Sin embargo, muchos son los factores que influyen en el establecimiento y crecimiento de los mismos, entre ellos el tipo de explante, los medios de cultivo y las condiciones ambientales en las cuales se desarrollan los cultivos.

El presente trabajo tiene como objetivos establecer un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de los callos a partir de cotiledones de pepino cv. Hatuey-1 y determinar el efecto de diferentes fotoperíodos en la respuesta obtenida, como una etapa previa para la regeneración de plantas *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal.

Se utilizaron semillas de pepino (*Cucumis sativus* L) cv. Hatuey-1, las cuales fueron lavadas con agua corriente y detergente comercial con la adición de dos gotas de Tween-80. Para su desinfección se sumergieron en una solución de Bicloruro de Mercurio ($HgCl_2$) 0,1% por espacio de 15 minutos y lavadas con agua estéril por tres veces.

Posteriormente se colocaron, de forma individual, en tubos de ensayos que contenían 15 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962 (MS), sin suministro hormonal y la adición de 30 g.L^{-1} de sacarosa (azúcar refino comercial).

Los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de 14 horas luz, a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}C$ hasta que las plántulas germinadas desarrollaron su primer par de folíolos.

Medios de cultivo.

En condiciones asépticas se aislaron como explantes los cotiledones, los cuales se segmentaron en tres secciones y se sembraron en el medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6- furfuril amino purina (KIN) para un total de 9 tratamientos (Tabla 1). Cada tratamiento estuvo representado por 12 réplicas y se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales antes descritas durante 30 días.

Tabla 1. Medios de cultivo para la inducción de callos de pepino cv. Hatuey-1.

Tratamientos	2,4-D (mg.L ⁻¹)	KIN (mg.L ⁻¹)
1	0,5	0
2	0,5	0,5
3	0,5	1,0
4	1,0	0
5	1,0	0,5
6	1,0	1,0
7	2,0	0
8	2,0	0,5
9	2,0	1,0

Condiciones ambientales.

Los segmentos de cotiledones se cultivaron en los tratamientos seleccionados en el experimento anterior (2, 5 y 8) y se cultivaron en dos condiciones ambientales diferentes: fotoperíodo de 14 horas luz y oscuridad continua, durante un período de 30 días.

En ambos experimentos (medios de cultivo y condiciones ambientales) se evaluó el porcentaje de formación de callos y crecimiento de los mismos expresados en masa fresca (g) y masa seca (mg).

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente a través de un ANOVA factorial y la correspondiente prueba de Duncan para la comparación múltiple de medias.

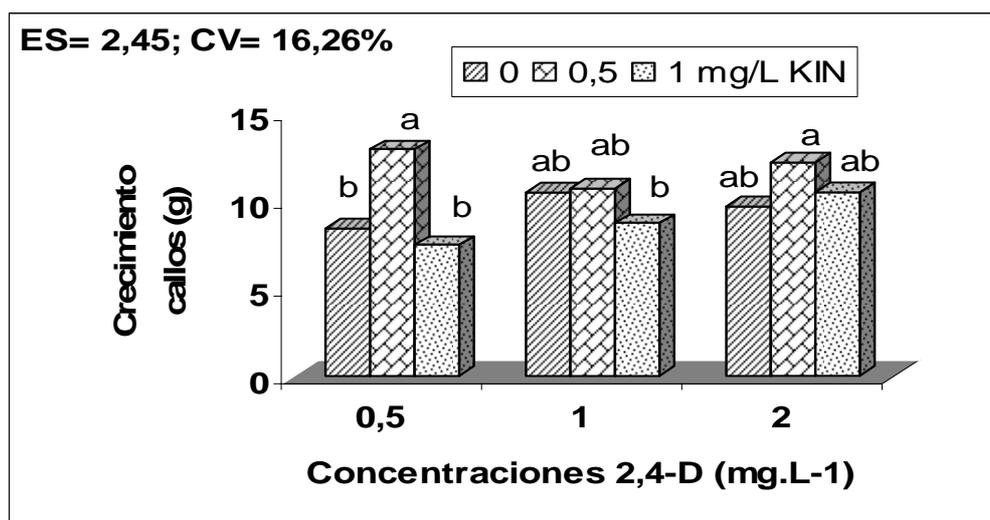
RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran que en todos los tratamientos evaluados se obtuvo la inducción y posterior crecimiento de los callos.

Los callos presentaron una consistencia friable, de coloración crema- carmelitoso y se observó la presencia de zonas verdes en la superficie de los mismos.

Al analizar la variable masa fresca se observaron diferencias significativas entre la concentración de citoquinina (KIN) utilizada y su interacción con la concentración de auxina (2,4-D) (Fig. 1).

Figura 1.- Interacción auxina- citoquinina en la biomasa fresca de callos de pepino cv. Hatuey-1.

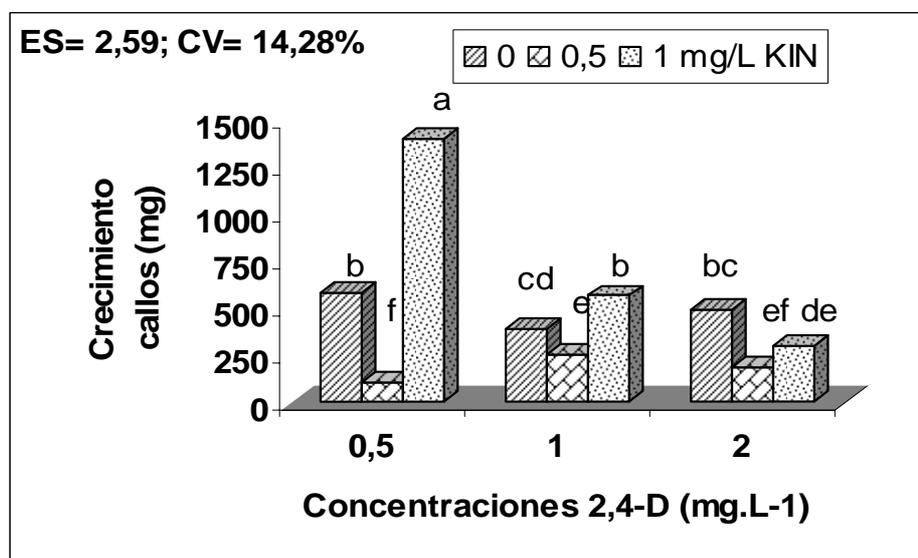


El mayor crecimiento de los callos correspondió al medio 2 (MS + 0,5 mg.L⁻¹ 2,4-D y 0,5 mg.L⁻¹ KIN), sin diferencias significativas con el medio 5 (MS + 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D y 0,5 mg.L⁻¹ KIN) y el medio 8 (MS + 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D y 0,5 mg.L⁻¹ KIN), con 13,0; 12,50 y 12,25 g de masa fresca respectivamente.

Se plantea que la adición de 2,4-D es generalmente suficiente para inducir la proliferación celular, relacionándola con el desarrollo de la embriogénesis somática (Jain y Ishii, 1997). Sin embargo, se observó en todos los casos un incremento del crecimiento de los callos cuando el 2,4-D, independiente de la concentración empleada, se combinó con 0,5 mg.L⁻¹ de KIN. En este sentido se plantea que las citoquininas actúan junto con las auxinas para estimular la división celular de los callos (Zhu *et al.*, 1996).

Para la variable masa seca también se observó diferencias significativas para la interacción de ambos reguladores del crecimiento (Fig. 2). Los mayores valores se observan en el medio 3 (MS + 0,5 mg.L⁻¹ 2,4-D y 1,0 mg.L⁻¹ KIN) con un crecimiento de 1 409 mg, el cual difiere significativamente del resto de los tratamientos.

Figura 2.- Interacción auxina- citoquinina en la biomasa seca de callos de pepino cv. Hatuey-1.



De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron los medios 2, 5 y 8 por presentar los mayores valores de masa fresca en el crecimiento de los callos, para determinar el efecto de dos condiciones ambientales en la respuesta.

Los resultados obtenidos mostraron que para la variable masa fresca, no existe interacción significativa entre los medios de cultivo y las condiciones ambientales estudiadas (Fig. 3), ya que independientemente de dichos factores, se produjo división celular y por consiguiente crecimiento de los callos.

Los tratamientos empleados difieren significativamente entre sí al analizar la variable masa seca, indicando en este caso, la influencia de ambos factores sobre el crecimiento de los callos (Fig.4). Excepto en el medio 2, se observó un incremento de la biomasa bajo condiciones de fotoperíodo de 14 horas luz y la mejor respuesta (256 mg de masa seca) se obtuvo en el medio MS suplementado con 1 mg/L de 2,4 D y 0,5 mg/L de KIN.

El mantenimiento de explantes en condiciones de oscuridad para la regeneración de brotes a partir de cotiledones de pepino ha sido reportada con anterioridad por Cade *et al.* (1987).

La utilización de segmentos de cotiledones, ya sean aislados a partir de semillas maduras o a partir de plántulas jóvenes, ha sido muy empleada para la regeneración de plantas de especies de Cucurbitáceas (Kim *et al.*, 1988, Lange y Juvik, 1986; Gray *et al.*, 1993; Valecillos *et al.*, 1998), debido a su fácil accesibilidad, rápida respuesta y alta capacidad para la morfogénesis, el cultivo de protoplastos y estudios de transformación genética (Tabei *et al.*, 1997).

Figura 3.- Interacción medios de cultivo- condiciones ambientales en la biomasa fresca de callos de pepino cv. Hatuey-1.

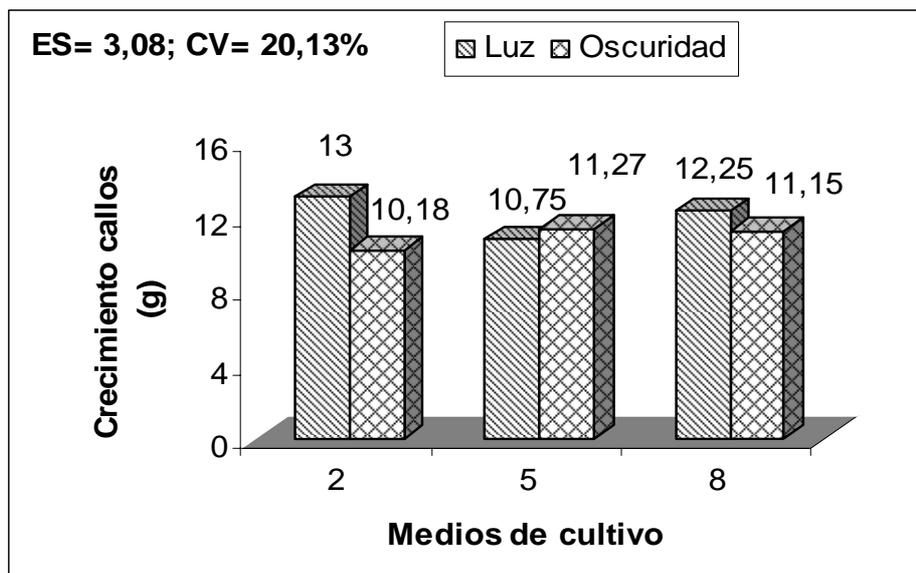
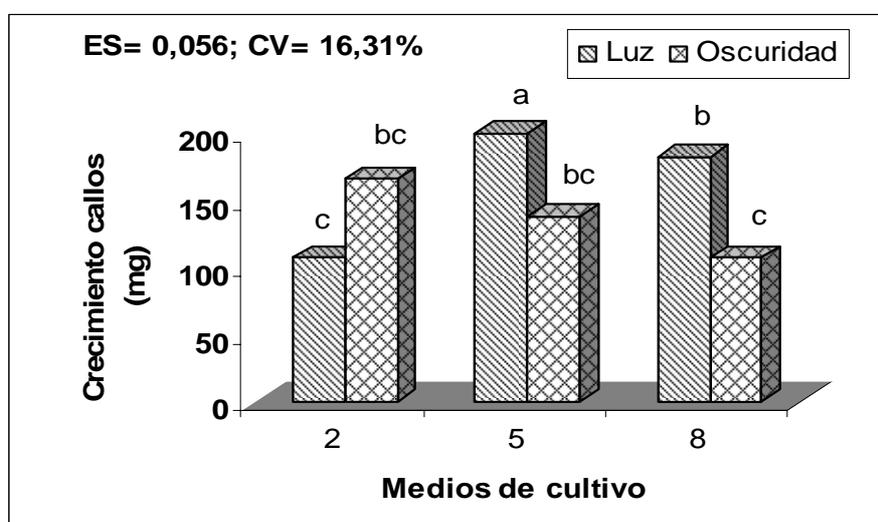


Figura 4.- Interacción medios de cultivo- condiciones ambientales en la biomasa seca de callos de pepino cv. Hatuey-1.



CONCLUSIONES

- El mejor medio para la inducción y crecimiento de callos de pepino cv. Hatuey-1 fue el medio MS + 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D y 0,5 mg.L⁻¹ KIN.
- No se observó interacción significativa entre los medios de cultivo y las condiciones ambientales estudiadas al evaluar la biomasa fresca de los callos obtenidos; sin embargo, un fotoperíodo de 14 horas luz estimuló el crecimiento en la mayoría de los medios estudiados.

REFERENCIAS

- Cade RM, Wehner TC y Blazich FA (1987):** Organogenesis and embryogenesis from cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledon-derived callus. HortScience, 22: 1130.
- Gray DJ, McColley DW y Compton ME (1993):** High- frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. J. Am. Soc. Hort. Sci., 118: 425- 432.
- Jain SM y Ishii K (1997):** Recent advances in somatic embryogenesis in forest. Proceeding IFS Workshop on Recent Advances in Biotechnology for tree conservation and management. Sept 15-19, Florianópolis, Brasil: 214- 231.
- Kim SG, Chang JR, Cha HC y Lee KW (1988):** Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). plant Cell Tissue and Organ Cult., 12: 67- 74.
- Lange NE y Juvik JA (1986):** Organogenesis from explants of mature seed cotyledons of 20 accesions from the genera *Curcubita*, *Cucumis* and *Citrullus*. HortScience, 21: 687.
- Msikita W, Skirvin RM, Juvik JA, Splittstoesser WE y Ali N (1990):** Regeneration and flowering in vitro of "Burpless Hybrid" cucumber cultured from excised seed. HortScience, 25(4): 474-477.
- Murashige T y Skoog F (1962):** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 474- 497.
- Simanca, AO, Pivovarov VF y Díaz H (1980):** Nueva variedad de pepino *Cucumis sativus* L. Heiva HS-1 (Hatuey-1) para siembras de primavera y verano. Ciencias de la Agricultura, 6: 154-156.
- Tabei Y (1997):** Study on breeding of cucurbitaceae using biotechnology. Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resources, No. 11: 1- 107.
- Valecillos C, Vielma M y Mora A (1998):** Factores que afectan la regeneración de vástagos a partir de cotiledón de *Cucumis melo* L. En: Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, Junio 1-5, La Habana, 326.
- Zhu Y, Ouyang W, Li Y and Chen Z (1996):** The effects 2, ip and 2,4D on rice calli differentiation. Plant Growth Regulators, 19: 19- 24.