

Técnica de laboratorio para el diagnóstico precoz de grados de resistencia al calor y a la sequía en variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.)*

Ramón ORTA CRUZ**, Jorge A. SÁNCHEZ RENDÓN**, Bárbara MUÑOZ GARCÍA**, Eric CALVO** y Avelino G. SUÁREZ RODRÍGUEZ**

ABSTRACT. It is checked the effectiveness of the technique for the precocious diagnosis of resistance degrees to the heat and drought for tomato varieties. The theoretical performance of this technique is based on the correlation that exists between the degree of resistance of the plants and speed of amilostatoliths hydrolysis low extreme environmental conditions. The effectiveness was proven with ten varieties of tomato of very well-known agronomic behavior in Cuba. The methodological value allows its use in investigations about the genetic improvement of this cultivation, as via of saving of material resources for the introduction of new varieties with unknown agronomic behavior.

KEY WORDS. *Lycopersicon esculentum*, tomato, precocious diagnosis, heat and drought.

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético de las plantas cultivadas ha permitido el incremento acelerado de la producción en la agricultura moderna. Cada día surgen nuevas variedades, adaptadas para producir en las más variadas condiciones ecológicas.

El tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) y otras hortalizas de amplio consumo en nuestro país son ejemplos clásicos de un fuerte trabajo de mejoramiento y obtención de nuevas variedades resistentes a las condiciones ambientales desfavorables para los cultivos (Muñoz y Sardiñas, 1989; Domíní *et al.*, 1993, 1994; Gómez y Laterrot, 1997). Por otra parte, la introducción de nuevas variedades confronta una limitante fundamental; la imposibilidad de probarlas todas a la vez, en condiciones experimentales, debido a obvias limitaciones materiales y humanas para ello.

Henckel *et al.* (1970, 1972, 1974) describieron una técnica de laboratorio para el diagnóstico precoz de grados de resistencia de las plantas al calor y a la sequía, que constituyen una herramienta útil para el propósito de seleccionar y descartar potencialidades de resistencia de muchas variedades a la vez, sin necesidad de su evaluación en condiciones de campo. La adaptación de esta técnica en el cultivo del tomate es el propósito de nuestra investigación.

La técnica se basa en la correlación existente entre el grado de resistencia a cualquier factor estresante del ambiente y la velocidad de hidrólisis de los amilostatolitos (granos de almidón) en el ápice de las raíces. Esta correlación es inversa en la generalidad de las especies y variedades cultivadas. A mayor grado de resistencia, menor velocidad de hidrólisis de amilostatolitos bajo condiciones de estrés (Henckel, 1982). Aún cuando los principios básicos del método descrito por Henckel *et al.* (1970, 1972, 1974) se mantienen en esta, se realizaron algunas modificaciones imprescindibles para su adaptación al cultivo del tomate.

A continuación se describen los pormenores del procedimiento en semillas frescas de diez variedades de tomate cosechadas en nuestro país y suministradas todas por el Laboratorio Central de Certificación de Semillas del Ministerio de la Agricultura.

MATERIALES Y MÉTODOS

I-Germinación. Las semillas de cada variedad a probar deben sembrarse en placas de Petri sobre papel de filtro humedecido, e incubarlas a 25°C, hasta lograr la existencia de suficientes semillas germinadas con raíces de 1-2 cm de largo (200 a 300 semillas).

II-Tinción. Las raíces se cortan por su extremo basal y se depositan en un recipiente que contenga una solución 7:4 (agua:lugol v/v) durante un tiempo de 15 a 30 segundos. El tiempo de exposición a la solución colorante depende de la variedad ensayada, debe determinarse empíricamente, y está dado por el tiempo mínimo indispensable para colorear correctamente los amilostatolitos agrupados en la zona del ápice de la raíz inmediata a la caliptra. Las raíces teñidas deben enjuagarse con agua antes de observarse al microscopio.

III-Evaluación. Las raíces teñidas se montan en agua destilada sobre portaobjetos en grupos discretos, se deposita sobre ellas un cubreobjetos, y se presionan ligeramente hasta lograr el "squash" de los tejidos vegetales. Deben disponerse en hilera para facilitar la observación de cada una al microscopio. El aumento óptimo a utilizar es 100x.

La evaluación del contenido de amilostatolitos en cada raíz se realiza, asignándole valores convencionales según la siguiente escala:

- 1-ninguno o muy pocos
- 2-contenido medio
- 3-contenido máximo.

Estas evaluaciones deben ser realizadas por dos observadores diferentes y promediados los valores asignados a cada raíz como única vía para minimizar el efecto subjetivo.

El método inicial creado por Henckel *et al.* (1970, 1972, 1974) proponen la valoración del contenido inicial de amilostatolitos en cada raíz utilizando una escala de 0-5. Sin embargo, la amplitud de dicha escala podría hacer más subjetiva la evaluación; por tanto, se propone utilizar la escala anteriormente señalada.

Para descartar falsos positivos en nuestras determinaciones (contenidos amilostatolíticos elevados en la radícula de variedades susceptibles, provocados por la pérdida de la actividad de las enzimas correspondientes y no por la resistencia de ésta a los tratamientos) debe comprobarse la vitalidad de las células radicales tratadas mediante el método topográfico de Tetrazolium (International Seed Testing Association, 1985). Para ello las plántulas tratadas se sumergieron en solución acuosa de cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolium al 0.1 % durante 24 hr a 30°C. La valoración se realiza de la siguiente forma: 1) plántulas viables aquellas que presentan la radícula completamente teñida y 2) plántulas muertas aquellas donde la radícula no se tiñe o la tinción no es uniforme.

*Manuscrito aprobado en mayo de 1999.

**Instituto de Ecología y Sistemática, A.P. 8029, C.P. 10800, La Habana, Cuba.

Por su parte, Henckel *et al.* (1974) proponen comprobar la vitalidad de las células de las raíces mediante la prueba de plamólisis; sin embargo, la complejidad de éste ensayo con respecto a la facilidad y precisión del método de Tetrazolium nos hizo seleccionar este último.

IV-Tamaño mínimo de la muestra. El tamaño mínimo estadísticamente válido para el número de raíces a observar se calcula por la siguiente fórmula;

$$N = U_p^2 / E^2 \cdot (DE / X \cdot 100)^2, \text{ donde:}$$

N, número mínimo necesario de observaciones;

P, probabilidad de certeza;

U_p , razón de la distribución normal, $U_{95} = 1,96$

E, magnitud de la exactitud relativa;

X, media aritmética de todas las determinaciones;

DE, desviación estándar de las determinaciones.

$$\text{Para } P = 95 \% \text{ y } E = 10 \% : N = (1.96 / 10)^2 \cdot (DE / X \cdot 100)^2$$

V-Determinación de grados de resistencia de las variedades al calor. Las semillas germinadas de cada variedad a probar (I), deben separarse en dos grupos. El primero de ellos se mantendrá en las condiciones descritas en I (control) mientras el otro será sometido a inmersión en agua durante una hora a 36°C (tratadas). Ambos grupos deben pasar por el resto de los pasos de la operatoria descritos (II, III, IV); para ser comparados estadísticamente (tratamiento vs. control).

VI-Determinación de grados de resistencia de las variedades a la sequía. Las semillas germinadas de cada variedad a probar (I) deben separarse en dos grupos. El primero se mantendrá en las condiciones descritas en I (control), mientras el otro será sometido a la exposición de un ambiente seco, logrado dentro de una desecadora con solución de NaCl al 3.85 % durante una hora, en la oscuridad, a 20 ± 2 °C. Al retirarse la placa de Petri de la desecadora debe añadirsele agua para facilitar su posterior manipulación. Ambos grupos deben pasar por el resto de los pasos de la operatoria descritos (II, III, IV), para ser comparados estadísticamente (tratamiento vs control).

VII-Análisis estadístico. Si para una variedad determinada se desea evaluar simultáneamente su grado de resistencia al calor (V) y a la sequía (VI), basta con evaluar un valor del control para la comparación con ambos tratamientos (V, VI). La evaluación estadística se realiza a partir del cálculo de la media aritmética de todas las determinaciones de las semillas tratadas (V, VI) con relación a la media aritmética del control, aplicando una prueba "t" de Student.

VIII-Clasificación de las variedades. Las variedades pueden clasificarse como:

- ◆ Resistentes al calor y/o la sequía, cuando la actividad hidrolítica resulta no significativa (NS).
- ◆ Medianamente resistente al calor y/o la sequía, cuando la actividad hidrolítica resulta significativa (* ó **).
- ◆ Susceptibles al calor y/o la sequía, cuando la actividad hidrolítica resulta altamente significativa (***)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se aprecia el alto número de observaciones que debe realizarse en cada variedad de tomate evaluada. Similares resultados se han reportados en otros cultivos (Capote y Suárez, 1977; Capote y Casal, 1978) y se debe fundamentalmente a la amplia variabilidad genética que presenta el tomate, tanto a nivel intravarietal, como intervarietal (Rick, 1983). Este resultado podría parecer un inconveniente del método de diagnóstico aplicado; sin embargo, el corto tiempo empleado (un mes) en obtener la información que se reporta, supera esta aparente dificultad.

El mayor porcentaje de hidrólisis de los amilostatolitos se produjo en las variedades susceptibles al calor y a la sequía HC-38-80, HC-78-80, 8/6/2 y 8/6/M2 (en general más del 30% respecto a sus controles), que se corresponde con las mayores diferencias estadísticas obtenidas (Tabla 2). En las variedades reportadas como resistentes INCA-17, L-3-16, L-10-3 y Criollo Quivián, no existe diferencias significativas para la cantidad de amilostatolitos presentes en las raíces antes y después del estrés (la hidrólisis fue solamente del 7.1-13.3%). Por último, las variedades Campbell-28 e INCA-15, en general, presentaron valores intermedios de hidrólisis y de significación estadística, por lo que pueden considerarse como de mediana resistencia al calor y sequía.

La correspondencia casi exacta entre nuestros resultados y la experiencia agronómica adquirida en nuestro país con dichos cultivares (Gómez *et al.*, 1988; Domini, *et al.*, 1993, 1994; Simón, *et al.*, 1994) indican, que el método de hidrólisis de los amilostatolitos puede ser efectivo para el diagnóstico precoz de grado de resistencia al calor y a la sequía de variedades de tomate útiles a nuestra economía, máxime si se toma en consideración su sencillez, bajo costo y sobre todo el corto tiempo que se necesita para obtener los resultados.

Finalmente, se observó que el porcentaje de hidrólisis de los amilostatolitos, en cualquiera de las variedades evaluadas, siempre fue superior en las condiciones de sequía que en las de calor. Esto podría deberse a una menor resistencia o tolerancia de los cultivos a dicho estrés o la falta de ajuste de la técnica en cuanto a factores tales como: concentración de NaCl y tiempo de exposición de las plántulas. Por consiguiente, el ajuste de la técnica no sólo permitiría discriminar entre variedades resistentes y susceptibles, sino también el grado de resistencia o susceptibilidad dentro de cada grupo.

REFERENCIAS

- Capote, S. y A. G. Suárez. 1977. Diagnóstico precoz de la resistencia a la sequía, en raíces de semilla agámica, por el método de hidrólisis de los amilostatolitos. *Cien. Biol.*, 1: 154-158.
- Capote, S. y L. Casal. 1978. Resistencia a la sequía en cuatro variedades de *Cenchrus ciliaris*. *Cien. Biol.*, 2: 130-134.
- Domini, M. E., M. A. Pino y M. Bertoli. 1993. Nuevas variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) para la época no óptima. *Cultivos Tropicales*, 14 (2-3): 94-97.
- 1994. Comportamiento de variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) para siembras de primavera. *Cultivos Tropicales*, 15 (2): 57-59.

- Gómez, O., T. Depestre y J. C. Hernández. 1988. Obtención de una variedad de tomate adaptada a las condiciones de calor y humedad. *Agrotecnia de Cuba*, 20(2): 11-13.
- Gómez, O. y H. Laterrot. 1997. La lucha genética como parte de la lucha integrada en el concepto de sostenibilidad. En *III Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica*, (Universidad Central de las Villas), *Resúmenes*, pp. 45-49.
- Henckel, P. A. 1982. Diagnóstico de la resistencia al calor y la sequía en plantas cultivadas. Cap. VIII. En *Fisiología de la resistencia de las plantas al calor y la sequía*. [en ruso]. *Nauka* (Moscú), 280 pp.
- Henckel, P. A., K. A. Badanov y V.V. Levin. 1970. Acerca de un nuevo método de laboratorio para el diagnóstico de la resistencia al calor y a la sequía con fines de selección [en ruso]. *Fisiol. Veg.*, (Moscú) 17(2): 431-439.
- 1972. Instrucciones para la utilización de un método directo de laboratorio para el diagnóstico de la resistencia al calor y a la sequía de las plantas con fines de selección, mediante la hidrólisis del almidón estatolítico [en ruso]. *Kolos*, (Moscú), 24 pp.
- 1974. Utilización de métodos fisiológicos para el diagnóstico de la resistencia a la sequía en la selección de plantas [en ruso]. En *Fisiología vegetal en ayuda de la selección* (A. N. Pavlov, ed.), *Nauka*, (Moscú), 5-19.
- International Seed Testing Association. 1985: International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.*, 13: 327-328.
- Muñoz, L, y J. Sardiñas. 1989. Mejoramiento y producción del pepino para diferentes épocas. *Reporte de Investigación de Instituto de Investigaciones Fundamentales en la Agricultura Tropical*, 19 pp.
- Rick, C. M. 1983. Genetic Resource. *Plant Molecular Biology Report*, 1(2): 81-87.
- Simón, M., C. Moya y N. Fonseca. 1994. Comportamiento de variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) en condiciones de primavera. *Cultivos Tropicales*, 15 (1): 69-72.

Tabla 1. Desviación estándar (DE), número mínimo de observaciones calculado (N), y número real de observaciones realizadas (n), para las distintas variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) en la determinación de la resistencia al calor y a la sequía.

Variedades	Tratamientos								
	Control			Calor			Sequía		
	DE	N	n	DE	N	n	DE	N	n
HC-38-80	0.67	31	45	0.71	54	65	0.51	42	51
HC-78-80	0.65	30	50	0.61	45	50	0.67	51	62
8/6/2	0.49	16	19	0.48	50	54	0.61	55	50
8/6 M2	0.71	48	50	0.51	48	50	0.51	48	50
Campbell-28	0.68	48	50	0.58	49	50	0.59	51	58
INCA-15	0.41	20	31	0.69	57	60	0.59	70	80
INCA-17	0.68	43	50	0.60	33	40	0.68	43	89
L-3-16	0.56	27	40	0.64	44	50	0.61	45	50
L-10-3	0.67	30	51	0.68	48	50	0.65	30	49
Criollo Quivicán	0.64	36	40	0.65	31	52	0.58	24	36

Tabla 2. Hidrólisis de los amilostatolitos en las células del ápice de las raíces para las distintas variedades tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.).

Variedades	Medias aritméticas		Diferencias entre medias	% respecto al control	t
	Control	Tratamiento			
HC-38-80	2.46	1.87	0.59	23.48 (calor)	***
		1.41	1.05	42.68 (sequía)	***
HC-78-80	2.52	1.74	0.78	30.95 (calor)	***
		1.62	0.90	35.71 (sequía)	***
8/6/2	2.36	1.48	0.88	37.28 (calor)	***
		1.62	0.74	31.25 (sequía)	***
8/6 M2	2.33	1.58	0.75	32.18 (calor)	***
		1.42	0.91	39.5 (sequía)	***
Campbell-28	1.80	1.54	0.26	14.44 (calor)	*
		1.32	0.48	26.66 (sequía)	***
INCA-15	2.22	1.89	0.33	14.86 (calor)	*
		1.45	0.77	34.68 (sequía)	**
INCA-17	1.80	1.62	0.19	10.35 (calor)	N.S
		1.45	0.24	13.33 (sequía)	N.S
L-3-16	2.04	1.89	0.15	7.35 (calor)	N.S
		1.82	0.22	10.78 (sequía)	N.S
L-10-3	2.13	1.98	0.15	7.4 (calor)	N.S
		1.87	0.25	11.85 (sequía)	N.S
Criollo Quivicán	2.51	2.32	0.19	7.50 (calor)	N.S
		2.28	0.23	9.16 (sequía)	N.S

N.S. no significativo: resistentes

* Significativo para $P < 0.05$: resistencia media

** Significativo para $P < 0.01$: resistencia media

*** Altamente significativo para $P < 0.001$: sensibles