

REGENERACION DE PLANTAS DE PAPA

(*Solanum tuberosum* L.)

A PARTIR DE TEJIDO FOLIAR EN LAS VARIEDADES

DIACOL CAPIRO Y PARDA PASTUSA¹

Lina Marcela Gómez G. Y. A.²
Edgar Jaramillo O. I.A.²
Sonia Jaramillo I.A. Ms.²
Rodrigo Hoyos Siol. Ph O.²

INTRODUCCION

Las variedades de papa Diacol Capiro y Parda Pastusa son las más cultivadas en Colombia debido a sus excelentes cualidades para el consumo. La primera tiene además muy buenas propiedades para la industria (Morales, 1994, Alvarado, 1990). Sin embargo este cultivo se ve sometido a una fuerte presión por plagas y enfermedades, siendo la Gota enfermedad causada por el hongo *Phytophthora infestans*, la más limitante, dado que estas variedades se han vuelto susceptibles, por la siembra de una sola variedad en grandes áreas (monocultivo). Mediante la manipulación genética "in vitro" es posible introducir genes de resistencia más rápida y eficientemente.

El éxito de técnicas celulares y moleculares en el mejoramiento de plantas depende de la capacidad regenerativa de éstas a partir de tejido o células somáticas. Antes o a la par de adelantar trabajos de biología molecular tendientes a la caracterización, aislamiento e introducción de genes de resistencia, desde una variedad y/o especie tolerante hacia otra susceptible, es necesario establecer un sistema eficiente de regeneración.

A pesar de que a nivel mundial en papa se han realizado numerosos trabajos de este tipo, se ha demostrado una gran dependencia del genotipo en la capacidad y eficiencia de regeneración (Hulme et al, 1992, Paketal, 1995).

La regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos es la manifestación de la totipotencia celular; la cual puede ocurrir de manera parcial siguiendo la ruta organogénica (caulogénesis o rizogénesis) o en forma completa siguiendo la ruta

¹ Revista Papa. Colombia. N° 17. 1997.

² Grupo de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. A.A. 568

embriogénica. Ambos fenómenos pueden ocurrir directa o indirectamente, es decir sin la presencia de fase callosa previa a la regeneración o con ella respectivamente, aunque en la práctica no siempre es posible distinguir estos dos modelos de desarrollo (Montoya, 1991, Segura, 1993; Lítz y Jarret, 1991; George and Sherrington, 1984).

Aunque los sistemas actuales de micropropagación y transformación están basados casi exclusivamente en la organogénesis de brotes, la embriogénesis somática contribuye a mejorar los métodos de aplicación biotecnológica, ofreciendo un gran potencial para la propagación masiva a gran escala y para la producción eficiente de clones o variedades de plantas transgénicas ya futuros para la producción de semilla artificial (Parrot et al, 1991).

La papa ha mostrado una gran plasticidad en su desarrollo haciendo posible la regeneración de plantas enteras a partir de diferentes fuentes de explantes (Dodds, 1984). Así por ejemplo se ha logrado regenerar plantas de ***Solanum tuberosum*** L. a partir de discos de tubérculo (Lam, 1975; Jarret et al. 1980), secciones nodales de tallo (De García y Martínez, 1995; Wang and Huang citados por Flick et al, 1983, Hoque et al, 1996), anteras (Johanson, 1988), raíces (Dodds, 1984) y actualmente de manera más rutinaria a partir de hojas (Webb et al citado por Dodds, 1984; Jadav and Sticklen, 1995; Wenzler et al, 1989; Hulme et al, 1992; Park et al, 1995).

El factor más importante para que la regeneración sea posible es el balance adecuado de reguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citoquininas. El ácido indolacético (AIA) y la bencilaminopurina (BAP), son efectivos para inducir la regeneración de brotes (Park et al, 1995; Hulme et al, 1992; Lam, 1975; Hoque et al, 1996), aunque se ha demostrado que no siempre es necesaria la adición de auxinas al medio para obtener regeneración y el uso de otras fuentes de citoquininas como el Ribósido de zeatina pueden mejorar significativamente la eficiencia de esta regeneración (Yadav, 1995; Park et al, 1995).

Otros factores que pueden afectar de manera considerable la respuesta morfogénica son la fuente del explante y su estado fisiológico (Perl et al, 1988), condiciones de luz y temperatura (Lam, 1975), tratamiento inicial de oscuridad (Park et al, 1995) y la acumulación de etileno en la atmósfera del frasco (Perl et al, 1988; Hulme et al, 1992; Economou, 1991) entre otros.

Debido a que la respuesta morfogénica puede variar de un genotipo a otro, en este trabajo se exploraron las posibilidades de inducir embriogénesis somática u organogénesis en las variedades "de papa Diacol Capiro y Parda Pastusa a partir de explantes de hoja, estudios que abrirán las posibilidades de aplicar nuevas técnicas de mejoramiento genético en nuestras variedades, como es el caso de la producción de plantas transgénicas.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Se estableció el cultivo "In vitro" a partir de meristemas de plantas de papa de las variedades Diacol Capiro y Parda Pastusa, de acuerdo a la metodología recomendada por Espinoza (1984), los cuales se multiplicaron cada 2-3 semanas usando fragmentos de tallo con un nudo por lo menos, colocados en el medio basal MS (Murashige and Skoog, 1962), el cual contiene 0.4 mg/l de inositol, suplementado con 20 g/l de sacarosa, 2 mg/l de pantotenato de Calcio y tiosulfato de plata (STS) cuya concentración varió desde 0 hasta 2 mg/l. Estos se incubaron a una temperatura promedio de 25°C, una humedad relativa del 70% y una intensidad lumínica de aproximadamente 2500 lux durante 16 horas diarias.

Para la fase de regeneración se tomaron hojas de las plantas crecidas "in vitro" con 3 a 4 semanas de edad, a las cuales se les descartó su base y fueron colocadas con el haz en contacto con el medio de cultivo. Los medios usados consistieron en la combinación de diferentes concentraciones de 2,4-D (de 0 a 1 mg/l) y BAP (de 0 a 4 mg/l), BAP y AgNO' (de 0 a 5 mg/l), BAP y STS (de 0 a 4 mg/l), los cuales fueron adicionados a los medios MI, Mil y Mili respectivamente (ver Tabla 1). Además fueron sometidas a un período inicial de oscuridad de 2 semanas.

M	=	Medio basal MS+30 g/l sacarosa+8 g/l agar
MI	=	MI+2 mg/l glicina+0.5 mg/l ac. nicotínico+0.5 mg/l piridoxina
MII	=	MI+10 mg/l tiamina+ 1 mg/l ac. nicotínico+1 mg/l piridoxina+60 mg/l caseína hidrolizada+ 0.38 mg/l GA ³ +0.05 mg/l 2,4-D
GA ³	=	Acido giberélico

TABLA I MEDIOS UTILIZADOS PARA INDUCIR REGENERACIÓN A PARTIR DE HOJAS DE PAPA VARIEDAD DIACOL CAPIRO Y PARDA PASTUSA

Los medios de cultivo se autoclavearon por espacio de 20 minutos a una presión de 20 lb ya 110°C de temperatura.

Adicionalmente se evaluó en la variedad Diacol Capiro la regeneración a partir de explantes tomados de diferente posición en plantas crecidas en presencia de varias concentraciones de STS, para lo cual se utilizó el medio Mili suplementado con 2 mg/l de BAP y 2 mg/l de STS, debido a que previamente se dió una rápida y vigorosa regeneración en este medio (a los 30 días fué posible contar alrededor de 17 tallos).

RESULTADOS Y DISCUSION

En las dos variedades se obtuvo regeneración, observándose inicialmente una proliferación de callo en el borde de las hojas y luego la emisión de brotes caulinares sin necesidad de transferir los explantes a un medio fresco de diferente composición. Aparentemente los brotes se originaron del tejido calloso. La presencia de auxina no fué indispensable para que ocurriera la respuesta morfogénica esperada, corroborándose lo encontrado por Yadav (1995) y Park et al. (1995) en cultivares Europeos y Norte Americanos de papa. Sin embargo se dió una mayor proliferación de tallos en presencia de ésta a una concentración de 0.05 mg/l, combinada con 4 mg/l de BAP.

La presencia de citoquinina fue necesaria para la inducción de plantas, lográndose obtener las regeneraciones mas eficientes con concentraciones de 2 y 2.5 mg/l. Además se obtuvo mayor número de plantas por explante y fueron mas vigorosas cuando se colocaron hojas tomadas de plantas crecidas en presencia de STS en un medio mas completo como el MIII.

En la variedad Diacol Capiro se produjeron estructuras que podrían ser consideradas producto de embriogénesis somática (fig. 1) a partir de hojas tomadas de las posiciones 2 y 3 de plantas crecidas en presencia de STS a una concentración de 0.87 mg/l, considerando que la posición 1 es la hoja que emerge del ápice, colocadas en el medio Mili + 2 mg/l de BAP + 2 mg/l de STS. El 75% de los explantes sembrados fueron embriogénicos.

La obtención de medios de cultivo con metodologías apropiadas para la regeneración de nuestras variedades de papa es de gran importancia, ya que abre las posibilidades de obtener a partir de éstas, plantas transgénicas utilizando sistemas de transformación genética como aquellos mediados por *Agrobacterium tumefaciens*, biobarística y otros tal como lo anota Parrott et al. (1993).

BIBLIOGRAFIA

- ALVARADO, L.F. Problemática de la producción de semilla de papa en Colombia. p. 60 -65. En: FEDEPAPA. Seminario semillas y actualización tecnológica del cultivo de la papa. Oriente Antioqueño. agosto 1990. 71 pp.
- DE GARCÍA, E. and MARTÍNEZ. S. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desireé from stem nodal sections. En: J. Plant Physiol. Vol. 145, 1-995. p. 526 -530.
- DODDS, J.H. Tissue culture propagation of potatoes: Advantages and disadvantages. p. 295 -303. En: CIP. Innovative methods for propagating potatoes. Report of the XXVIII Planning conference. Lima, Perú. Dic. '0- '4. '984 - 342 pp.
- ECONOMOU, A.S. Ethylene and shoot formation 'In vitro". En: Acta horticulturae 300, 1991, p. 35 -43.
- ESPINOZA, N. et al. Tissue culture micropropagation, conservation and exportation of potato germoplasm. Lima, Perú, International Potato Center. 20 pp. 1984.
- FLICK, C.E.; EVANS, D.A. and SHARP, W.R. Organogenesis. p.13-81. En: EVANS, D.A.; AMMITATO, P.V. and YAMADA, Y. (eds). Handbook of plant cell culture. New York: Mac Millan Publishing. Vol. 1, 1983.
- GEORGE, E.F. and SHERRINGTON, P.D. Plantpropagation by tissue culture. Eversly, England: Eastern Press. p. 29 - 38. 1984.
- HOQUE, M.I.; MILA, N.B.; KHAN, M.S.; SARKER, R.H. Shoot regeneration and microtuber formation in potato (*Solanum tuberosum* L.). En: Bangladesh Journal of Botany. Vol. 25: 1. p. 87 -93. 1996.
- HULME. J.S.; HIGGINS. E.S. and SHIELDS. R. An Efficient genotype independent method for regeneration of potato from leaf tissue. En: Plant Cell. Tissue and Organ culture. Vol. 3'. p. '6' -'67. '992.
- JARRET, R.I.; HASEGAWA, P.M. and ERICKSON, H.T. Factors affecting shoot initiation from tuber disc of potato (*Solanum tuberosum* L.). En: Physiol. Plant. Vol. 47, 1980. p. 177- 184.

- IAM, S.I. Shaat farmatian in patata tuber disc in tissue culture. En: American Patata Journal. Val. 52: 4 p. 103 -106. 1975.
- LITZ, R.E. y JARRET, R.I. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. p. 142 -172. En: Roca, W. y Mroginski, I.A. (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones, Cali, CIAT, 1991. 969 pp.
- MONTOYA, H., L.M. Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía. Medellín, 77 pp. 1991.
- MORALES, M. El mercadeo de la papa en la plaza mayorista de Corabastos, Bogotá. En: Rev. Papa No.11. p. 29 -30. Junio, 1994.
- PARK, Y.D.; RONIS. D.H.; BOE, A.A. and CHENG, Z.M. Plant regeneration from leaf tissues of folJ.r North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). En: American Potato Journal. Vol. 72. 1995. p. 329 -335.
- PARROT. W.A.; MERKLE;S.A.and WILLIAMS. E.G. Somatic embryogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer systems. p. 158- 200. En: Murray, D.R. (de). Advanced methods in plant breeding and biotechnology. CAB International. Wallingford, U.K. 1991. 365 pp.
- PERL, A.; AVIV. D. and GALUN, E. Ethylene and in vitro culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. En: Plant Cell Reports (1988), 7: 403 -406.
- SEGURA, J. Morfogénesis in vitro. p. 381 -392. En: AZCON- BIETO, J. y TALON, M. (eds) Fisiología y Bioquímica Vegetal. Mac Graw Hill. Madrid, España. 1 a. de. 1993. 276 pp.
- WENZLER, H.; MIGNERY, G.; MAY. G. and PARK, W. A rapid efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. En: Plant Science. 63 (1989). p. 79 -85.
- YADAV, N.R. and STICKLEN, M.B. Direct and efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. Bintje. En: Plant Cell Reports. Vol. 14, 1995. p. 645 -647.