

# EFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE CULTIVO SOBRE LA REGENERACIÓN IN VITRO DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) DE LA VARIEDAD COMERCIAL CHIEFTAIN

✉ Gil A Enríquez-Obregón, Alejandro D Fuentes, Guillermo Selman-Housein, Pilar Téllez, Natacha Soto, Marlene Pérez y Pedro Oramas

División de Plantas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162, CP 10600, La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 8070. E-mail: cttl@igb.edu.cu

## ABSTRACT

The regeneration capacity of different explants of in vitro grown plantlets of potato commercial variety Chieftain was evaluated using two approaches: A, the same culture medium from callus to shoot formation and B, transfer the callus to free auxin culture medium before the shoot formation. The best regeneration frequency for this cultivar was obtained from tuber discs in the medium (MRT-6) with 3.28 shoots per explant (approach A), followed by 2.5 shoots for stem segments (MRE-4 and MRE-6 media, approach B) and 0.8 shoots in leaf discs (medium MRH-3, approach A). The combination of 1 mg/L silver nitrate with 5 g/L activated charcoal, during the micro-propagation, showed an enhancement of the leaves number per plant and its quality.

Key words: regeneration, potato, *Solanum tuberosum* L., in vitro culture

*Biotecnología Aplicada* 1997;14:181-184

## RESUMEN

Se evaluó la capacidad de regeneración en explantes de hoja, tubérculos y segmentos de tallo de la variedad comercial Chieftain, utilizando dos métodos: A, el mismo medio de cultivo desde la iniciación de los callos hasta la formación de los brotes y B, transferencia de los callos a un medio de cultivo libre de auxinas antes de la formación de los brotes. La mayor frecuencia de regeneración se obtuvo de discos de tubérculo en el medio (MRT-6) (método A) con 3,28 brotes por explante, seguido por 2,5 brotes en segmentos de tallo (medios MRE-4 y MRE-6, método B) y 0,8 brotes a partir de discos de hoja (medio MRH-3, método A). La combinación de 1 mg/L de nitrato de plata con 5 g/L de carbón activado, durante la propagación *in vitro*, mostró diferencias significativas tanto en el número de hojas por planta como en su calidad.

Palabras claves: regeneración, papa, *Solanum tuberosum* L., cultivo *in vitro*

## Introducción

Por su alta productividad y contenido en carbohidratos, proteínas, vitaminas y sales minerales, la papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos de mayor relevancia para la dieta humana (1). Por esta razón es muy importante el constante mejoramiento de los parámetros agrícolas de las variedades de este tubérculo.

Los programas clásicos de mejoramiento genético de la papa resultan ineficientes debido a las características tetraploide de su genoma, y al largo período de tiempo que se necesita para ellos. Sin embargo, con las técnicas del ADN recombinante es posible la modificación de caracteres fenotípicos y la obtención de nuevas variedades en poco tiempo. No obstante, los bajos niveles de regeneración de muchas de estas variedades limitan el empleo extensivo de la ingeniería genética aplicada al cultivo de la papa (2); por tanto, este evento es la clave para el éxito en la transformación genética y la obtención de plantas transgénicas.

La regeneración en explantes de papa se ha dividido en 3 fases: 1) iniciación del callo, 2) formación

de brotes derivados de callos y 3) desarrollo y definición de los brotes. Estas etapas se han logrado empleando 2 métodos: en un paso (3), donde la iniciación del callo, los brotes y el desarrollo de éstos tienen lugar en el mismo medio de cultivo, y en 2 pasos (4), que consiste en la transferencia de los callos, con los brotes iniciados, a un medio libre de auxinas hasta la formación definitiva de éstos.

Actualmente, la var. Chieftain cubre más del 15 % del área total cultivada de papa en Cuba. Su extensión no supera este valor, por la alta susceptibilidad que presenta esta variedad a enfermedades virales y fungosas, las cuales disminuyen considerablemente los rendimientos (MINAGRI-1996, F. Manzo (comunicación personal)).

En este trabajo se evalúa la capacidad de regeneración de 3 tipos de explantes: hojas, tubérculos y segmentos de tallos, de plantas *in vitro* de esta variedad, teniendo como proyección la transformación genética para la obtención de clones resistentes a estas enfermedades. Para ello, se utilizaron ambos métodos debido a la

1. Sasson AL. La alimentación del hombre del mañana. UNESCO/EDITORIAL REVERTÉ, S.A. 1993;3:563-565.

2. Hulme JS, Higgins ES, Shields R. An efficient genotype-independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1992;31:161-167.

3. Keil M, Sánchez-Serrano JJ, Willmitzer L. Both wound-inducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of a single member of the protease inhibitor 11 gene family. *EMBO Journal* 1989;8:1323-1330.

4. Wenzler H, Mignery G, May G, Park W. A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. *Plant Sci* 1989;63:79-85.

✉ Autor de correspondencia

pobre respuesta que presenta a protocolos previamente publicados.

**Materiales y Métodos**

El material vegetal fue tomado de plantas *in vitro* de la var. Chieftain, a las 4 semanas de cultivo, excepto los microtubérculos que fueron seleccionados a partir de las 6 semanas.

Para la formación de microtubérculos se emplearon 0,5 g/L de cloruro de clorina y 5 mg/L de bencilamino purina (BAP) sobre un medio MS (5), durante un mes de cultivo en la oscuridad. Las hojas y segmentos de tallo fueron obtenidos mediante la propagación de yemas axilares en 4 medios de cultivo con tiosulfato de sodio mas nitrato de plata (STS) (6) y/o carbón activado (Tabla 1). El pH en los medios de cultivo fue ajustado a 5,8 antes de autoclavar. Las plántulas *in vitro* se mantuvieron en cuartos iluminados, con un régimen de 16 h luz por 8 h de oscuridad y una temperatura de 25 °C.

Se realizaron análisis de varianza de clasificación simple y las medias fueron comparadas a través de la prueba de rangos múltiples de Duncan (7).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo para la propagación *in vitro*.

P <sub>1</sub>	MSP, 5 g/L de carbón activado
P <sub>2</sub>	MSP, 1,0 mg/L STS (referido a 1 mg/L de nitrato de plata)
P <sub>3</sub>	MSP, 5 g/L carbón activado, 1 mg/L STS
P <sub>4</sub>	MSP (sales del medio MS, pantotenoato de calcio 2 mg/L, tiamina 0,4 mg/L, myo-inositol 100 mg/L, sacarosa 30 g/L)

**Regeneración**

Para los experimentos en hojas se tomó la parte media, descartando ambos extremos, y se cultivó por el método A (de un paso) en medio basal MS con 0,01 mg/L de ácido 3-indol acético (AIA) y 2,5 mg/L de BAP, suplementado con 2,5; 5,0 y 7,5 mg/L de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). Se probó además el medio CD3Z (8) (Tabla 2).

Los segmentos de tallo se cortaron en secciones de 5-10 mm de longitud, descartando las yemas axilares, y fueron cultivados en una variante del

medio descrito por Newell y colaboradores (9) durante 15 días. Posteriormente fueron transferidos a 32 combinaciones hormonales con GA<sub>3</sub> y BAP (0; 0,3; 1,0; 3,0 mg/L), suplementado o no con 1 mg/L de STS según el método B (de 2 pasos) (Tabla 3).

Se tomaron discos de tubérculo de 0,3 a 0,5 mm de grosor y de 1 cm de diámetro. Éstos se transfirieron a un medio MS con diferentes reguladores del crecimiento y se evaluó la regeneración utilizando ambos métodos (A y B). Para el A, se emplearon los medios descritos por Sheerman y colaboradores (10), combinados con diferentes concentraciones de zeatina (Tabla 4). En ambas etapas del método

5. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 1962;15:473-497.

6. Perl LA, Aviv D, 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. *Plant Cell Rep* 1988;7:403-406.

7. Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 1955;11:1.

8. De Block M, Botterman J, Vanderwiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO Journal* 1987;6:2513-2518.

Tabla 3. Formulación de los medios de cultivo usados para la regeneración en segmentos de tallo var. Chieftain, que provocaron una respuesta positiva.

<b>Etapa I</b>	
MSP (Tabla 1); 3,0 mg/L BAP; 0,01 mg/L NAA; 1 mg/L de nitrato de plata.	
<b>Etapa II (medio de formación de brotes)</b>	
MRE-1	MSP; 0,3 mg/L GA <sub>3</sub>
MRE-2	MSP; 1 mg/L GA <sub>3</sub>
MRE-3	MSP; 1 mg/L GA <sub>3</sub> ; 1 mg/L BAP
MRE-4	MSP; 1 mg/L GA <sub>3</sub> ; 3 mg/L BAP
MRE-5	MSP; 3 mg/L GA <sub>3</sub>
MRE-6	MSP; 3 mg/L GA <sub>3</sub> ; 3 mg/L BAP

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo que fueron usados para la regeneración de tubérculos var. Chieftain.

<b>A: Método de un paso</b>						
Reguladores (mg/L)	MRT-1	MRT-2	MRT-3	MRT-4	MRT-5	MRT-6
Zeatina	0,25	0,50	0,75	0,50	1,00	1,50
NAA	0,30	0,30	0,30	-	-	-
BAP	1,00	1,00	1,00	-	-	-
AIA	-	-	-	0,50	0,50	0,50
<b>B: Método de 2 pasos</b>						
Reguladores (mg/L)	MRT-7-1		MRT-7-2		MRT-7-3	
	Etapa I	Etapa II	Etapa I	Etapa II	Etapa I	Etapa II
NAA	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0
BAP	3,0	0	3,0	1	3,0	1
GA <sub>3</sub>	0	0,1	0,001	0,1	0,01	0,3

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo empleados para la regeneración de hojas var. Chieftain.

Reguladores (mg/L)	CD3Z	MRH-2	MRH-3	MRH-4
Zeatina	3,0	-	-	-
AIA	0,1	0,01	0,01	0,01
GA <sub>3</sub>	3,0	2,5	5,0	7,5
BAP	-	2,5	2,5	2,5

B, los medios se suplementaron con bajas concentraciones de GA<sub>3</sub> (MRT-7), según resultados obtenidos por Jain y colaboradores (11).

### Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestran los resultados al comparar 4 medios de cultivo sobre el número y desarrollo de las hojas durante la propagación *in vitro* de la var. Chieftain. La mejor variante resultó la combinación de carbón activado con STS (P<sub>3</sub>), que produjo 7,5 hojas por planta y 2,5 cm<sup>2</sup> de área promedio por cada hoja. Las variantes que contienen estos compuestos por separado (P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>) también mejoraron estos parámetros en relación con el control sin tratar (P<sub>4</sub>). Los resultados con STS coinciden con los presentados por Perl y colaboradores (6), quienes encontraron un aumento en el área de las hojas de las variedades Pito, Bintje y Rekord, al crecer las plantas a bajas concentraciones de nitrato de plata.

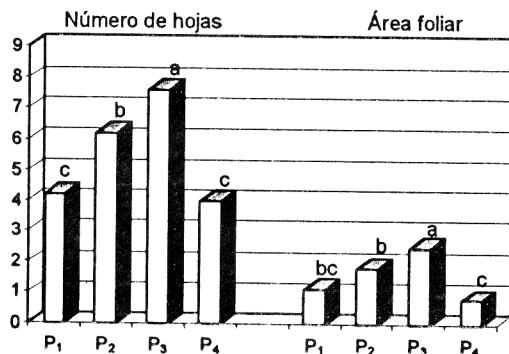


Figura 1. Efecto del STS y el carbón activado sobre el desarrollo de las hojas var. Chieftain. (Tabla 1). Los valores con igual letra significan que no existen diferencias para  $p < 0,05$  según el test de Duncan (7).

El uso del carbón activado y el STS durante la propagación *in vitro* de las plantas se justifica por la prolongación de los estados juveniles, expresados en una consistencia blanda de los tejidos y el color verde intenso de las hojas por largos periodos de tiempo. Sin embargo, las plantas de las variantes P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub> (ambas con la influencia de nitrato de plata) alcanzaron una altura promedio menor, y la adición consecutiva de STS en varios subcultivos provocó una drástica disminución del crecimiento (12), combinada con la aparición de manchas moradas en el envés de las hojas. El nitrato de plata se une a receptores de etileno (13), bloqueando la acción de este regulador sobre los tejidos de la planta, mientras que el carbón activado retiene los compuestos fenólicos en el medio de cultivo (14); ambos metabolitos (etileno y compuestos fenólicos), producen alteraciones en el desarrollo de las plantas crecidas *in vitro*. Los explantes de hojas, tomados de la

variante P<sub>3</sub>, mostraron un incremento en los niveles de regeneración de un 30 % en relación con las hojas provenientes de P<sub>4</sub> (datos no mostrados). Sin embargo, teniendo en cuenta la antes mencionada toxicidad, provocada por los iones de plata, recomendamos utilizar subcultivos alternos en ambos medios durante el cultivo *in vitro* de las plantas de papa.

Las hojas mostraron una baja frecuencia de regeneración (0,2 brotes por explante) en el medio CD3Z (Figura 2). Los mejores resultados en esta variedad fueron obtenidos en el medio MRH-3, aunque los mismos continuaron siendo muy moderados (0,8 brotes por explante).

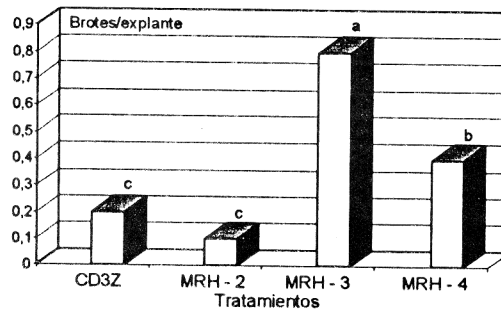


Figura 2. Determinación de la eficiencia de regeneración de hojas var. Chieftain. (Tabla 2). Los valores con igual letra significan que no existen diferencias para  $p < 0,05$  según el test de Duncan (7).

Los callos obtenidos de segmentos de tallo estaban parcialmente pigmentados, pero este hecho no imposibilitó la regeneración de plantas en algunas de las variantes evaluadas (Figura 3). Los mejores resultados en estos experimentos se correspondieron con los medios MRE-4 y MRE-6 con 2,5 brotes por explante, donde la combinación de 3 mg/L de BAP con 1 y 3 mg/L de GA<sub>3</sub>, respectivamente, constituyó un elemento fundamental para la regeneración de este tipo de explante. La presencia de STS produjo

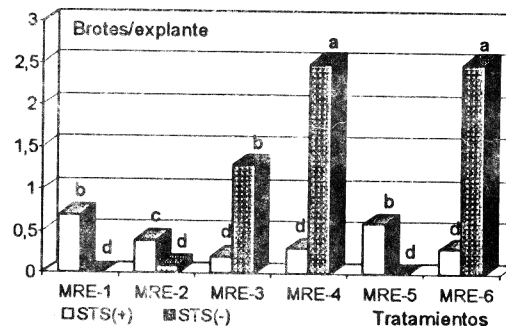


Figura 3. Regeneración de papa var. Chieftain a partir de segmentos de tallo (representación de las variantes que provocaron una respuesta positiva, de las 32 ensayadas) (Tabla 3). Los valores con igual letra significan que no existen diferencias para  $p < 0,05$  según el test de Duncan (7).

9. Newell CA, Rozman R, Hichee MA, Lawson EC, Haley L, Sanders et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum tuberosum* L. cv. (Russet Burbank). *Plant Cell Rep* 1991;10:30-34.

10. Sheerman S, Bevan MW. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* L. using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell Rep* 1988;7:13-16.

11. Jain SM, Jokinen K, Virta U. Factors affecting on shoots regeneration in cultured of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber discs (in press).

12. Block MD. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *The Appl Genet* 1988; 76:767-774.

13. Aharoni N, Anderson JD, Lieberman M. Production and action of ethylene in senescing leaf discs. Effects of indoleacetic acid, kinetin, silver ion and carbon dioxide. *Plant Physiol* 1979;64: 805-809.

14. Vasil IK. Regulation of the phenolic compounds in plant tissue culture. *Cell culture and somatic cell genetics of plants* 1984;4:262-263.

un efecto sobre el número de brotes que fue dependiente del medio empleado para la regeneración; indicando un posible efecto sinérgico entre las hormonas adicionadas al cultivo y el etileno generado por las células vegetales. Para las variantes MRE-4 y MRE-6, el efecto del STS fue desfavorable (Figura 3); mientras que la adición de 1 mg/L de nitrato de plata, en las variantes sin BAP, provocó un aumento en el número de brotes por explante.

La mayor frecuencia de regeneración se produjo a partir de discos de tubérculo, con 3,28 brotes por explante, utilizando el método A (medio MRT-6) (Figura 4). Este valor difiere significativamente del resto de las variantes que aparecen en la Tabla 4.

En la Figura 4 se muestran otros resultados obtenidos después de cultivar discos de tubérculo mediante el método B, con la presencia de bajos niveles de GA<sub>3</sub> en ambas etapas (MRT-7). Los valores de 0,5 y 0,3 brotes por explante, logrados en las combinaciones MRT-7-2 y MRT-7-3, respectivamente, resultaron menores a las obtenidas en las variantes MRT-5 y MRT-6 (Tabla 4). Sin embargo Jain y colaboradores (11) reportaron 4 brotes por explante al cultivar discos de tubérculo en la variante MRT-7-2, a una temperatura de 19 °C y en un período de 4 semanas.

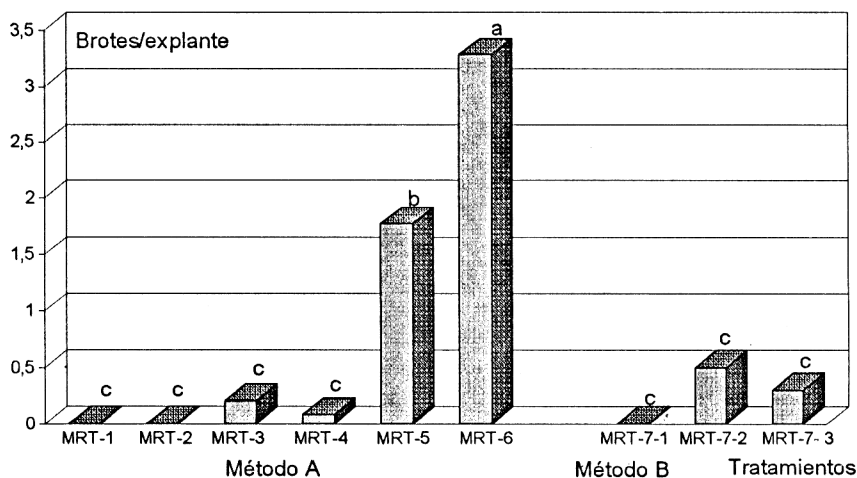


Figura 4. Influencia del método y los medios de cultivo sobre la regeneración de tubérculos *in vitro* de la var. Chieftain (brotos/explante), (Tabla 4). Los valores con igual letra significan que no existen diferencias para  $p < 0,05$  según el test de Duncan (7).

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Ing. Gerardo García Illera por su valiosa ayuda durante el procesamiento estadístico en los diferentes experimentos.