

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE REGENERACION EN *SOLANUM TUBEROSUM* L.

M. M'HAMDI
E. CEBALLOS
E. RITTER

J. I. RUIZ DE GALARRETA

Centro de Investigación y Mejora Agraria. Apdo. 46. 01080 Vitoria

RESUMEN

Se ha analizado la capacidad de regeneración *in vitro* de tres cultivares de patata, Nagore, Désirée y Superior, con el fin de utilizarlos en transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Para incrementar la eficacia del método de transformación se han probado diferentes tipos de explantes como hojas, discos de tubérculo y discos de microtubérculo, junto con medios de regeneración que diferían en su composición hormonal. Se han determinado los parámetros: número de callos inducidos, número de brotes y plántulas regeneradas para cada tipo de explante, medio de regeneración y cultivar. De los tres tipos de explante utilizados, las hojas proporcionaron las mayores tasas de regeneración, empleando un medio de cultivo con las sales de MS, glucosa (30 g/l), ácido naftalen acético (0,02 mg/l), ribósido de zeatina (2 mg/l) y ácido giberélico (0,02 mg/l). Con explantes de tubérculo y microtubérculo se obtuvieron las mayores tasas de regeneración en un medio MS con sacarosa (30 g/l), ácido indolacético (0,5 mg/l) y ribósido de zeatina (3,5 mg/l). De los resultados obtenidos se recomienda el uso de explantes de hoja como material de partida para experimentos de transformación con estos cultivares de *Solanum tuberosum* L.

PALABRAS CLAVE: *Solanum tuberosum*

Regeneración
Explante
Patata

INTRODUCCION

Una de las vías posibles para aumentar la eficacia de los métodos de transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* es la optimización de la capacidad de regeneración de plántulas normales. Aunque las células vegetales son totipotentes y poseen la capacidad de diferenciarse, algunos tejidos celulares son más fácilmente inducidos a formar nuevas plantas. Las condiciones necesarias para una regeneración eficiente varían entre células de la planta y tejidos así como entre especies y cultivares. La formación de brotes y raíces depende de la planta y del tipo de tejido así como de la composición del medio de cultivo incluyendo las hormonas presentes en el mismo (Hoekema *et al.*, 1989). Por otra parte, durante el cultivo del tejido, las células pueden acumular aberraciones cro-

Recibido: 23-6-97

Aceptado para su publicación: 7-11-97

mosómicas como variaciones en el número de cromosomas, translocaciones y mutaciones (Lee, Philips, 1988). Estas variaciones genotípicas pueden producir cambios fenotípicos englobados dentro de lo que se denomina variación somaclonal.

Se han regenerado plantas de patata (*Solanum tuberosum* L.) de cultivares comerciales, a partir de diferentes explantes: segmentos de tallo y hojas desarrolladas *in vitro* (Visser *et al.*, 1989), discos de tubérculo (Sheerman, Bevan, 1988, Ishige *et al.*, 1991) y discos de microtubérculo (Snyder, Belknap, 1993). La regeneración a partir de estos dos últimos tipos de explante evitan la fase intermedia de callo lo que posibilita disminuir el riesgo de variación somaclonal. No obstante, otro factor determinante es la obtención de un gran número de regenerantes en un tiempo reducido, optimizando el medio de cultivo para cada explante, así como la determinación del tipo de explante que mejor responde a un amplio rango de cultivares. De esta forma, se incrementará la eficiencia del proceso.

Dentro de este contexto, el objetivo de este trabajo ha sido la elección del tipo de explante y medio de regeneración más adecuado en tres cultivares de patata susceptibles de ser transformados genéticamente mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

MATERIAL Y METODOS

Material vegetal y medios de cultivo

Se utilizaron tres cultivares de patata (*Solanum tuberosum* L.): Nagore, Désirée y Superior, y tres tipos de explantes: discos de tubérculo, discos de microtubérculo y hojas enteras procedente de material *in vitro*.

Para la producción de microplántulas, los brotes de patata se cultivaron rutinariamente cada 3-4 semanas, por subcultivo continuado de nodos caulinareos con una yema axilar y una hoja en 10 ml de medio de propagación (Tabla 1). Al cabo de este tiempo a 23° C, 16 h de fotoperíodo y 34 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ de flujo fotónico, se obtuvieron plántulas de al menos siete nudos y hojas adecuadas para la regeneración.

La producción de microtubérculos comprendió una primera fase de elongación similar a la de obtención de microplántulas salvo que se utilizaron tarros de 0,5 l con 30 ml de medio de propagación y una densidad de 15 esquejes por tarro. Después de tres semanas, los cultivos se transfirieron a 50 ml de medio líquido de tuberización (Tabla 1) sin agitación y en oscuridad total. Al término de esta fase que duró en torno a los 30 días, las microplántulas portaban en las axilas de las hojas los microtubérculos.

Regeneración de plantas

Los explantes de hojas se transfirieron a los medios de regeneración M1 (Keil *et al.*, 1989) modificado con 30 g/l de glucosa y M2 (Tabla 1), preparados en placas Petri y solidificados con agar al 0,8 p. 100 (p/v) a razón de 10 explantes por placa. Estos fueron sellados y subcultivados cada 10 días.

Los tubérculos se pelaron y esterilizaron en hipoclorito de sodio al 15 p. 100 durante 15 min cortándolos en discos de aproximadamente 10 mm de diámetro y 1 mm de grosor. Se dispusieron en placas Petri con los medios M1 y M2 a razón de 10 discos por placa con

la misma frecuencia de subcultivo que los explantes de hoja. Los brotes obtenidos en los diferentes medios se transfirieron separadamente para su enraizamiento al medio de propagación.

TABLA 1
COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LA PROPAGACION, PRODUCCION DE MICROTUBERCULOS Y REGENERACION
Composition of the culture medium utilized in the propagation, microtuber production and regeneration

Composición	Propagación (mg/l)	Microtuberización (mg/l)	Regeneración (mg/l)	
			M1	M2
Sales	MS	MS/2	MS	MS
Glucosa	—	—	30.000	—
Sacarosa	30.000	80.000	—	30.000
Inositol	200	100	100	100
Tiamina	0,2	0,2	0,1	2,5
Piridoxina	1	1	0,5	12,5
Acido nicotínico	1	1	0,5	12,5
Acido fólico	—	—	—	0,5
Biotina	—	—	—	0,05
Biotina	—	—	—	50
Glicina	2	2	2	50
AIA	0,5	—	—	0,5
NAA	—	—	0,02	—
ZR	—	—	2	3,5
AG3	—	—	0,02	—
Kinetina	0,2	2,5	—	—
pH 5,6; 0,8% agar				

AIA: ácido indol acético; NAA: ácido α -naftalenacético; ZR: ribósido de zeatina; AG3: ácido giberélico. MS (Murashige y Skoog, 1962).

Se analizó la capacidad de regeneración de cultivo de los tres cultivares de patata a partir de la cuarta semana según un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones de 10 explantes cada una. Los tratamientos aplicados fueron los medios de regeneración —M1 y M2— y los tres tipos de explante —hojas *in vitro*, tubérculos y microtubérculos—. La separación de medias se realizó mediante el test Waller-Duncan, empleando para el análisis de los datos el paquete estadístico SAS (SAS, 1988). Previamente, éstos fueron transformados si su distribución no se ajustaba a una normal.

RESULTADOS Y DISCUSION

La aparición de callos comenzó un mes después de la puesta en cultivo de los explantes de hoja. Estos se iniciaron en la base del peciolo y fueron avanzando hacia el limbo de

las hojas. El número medio de callos por explante obtenido con cada medio y cultivar se indica en la Figura 1. Se observa que el medio M1 fue más favorable a la inducción de callos en los tres genotipos, destacando el cv. Désirée. El análisis de varianza relativo a este parámetro sólo se realizó para el explante de hoja ya que los discos de tubérculo y microtubérculo no pasan por el estadio de callo. Los resultados de este análisis mostraron un efecto altamente significativo del medio de cultivo (Tabla 2). Asimismo, se observó que la interacción medio-cultivar no fue significativa.

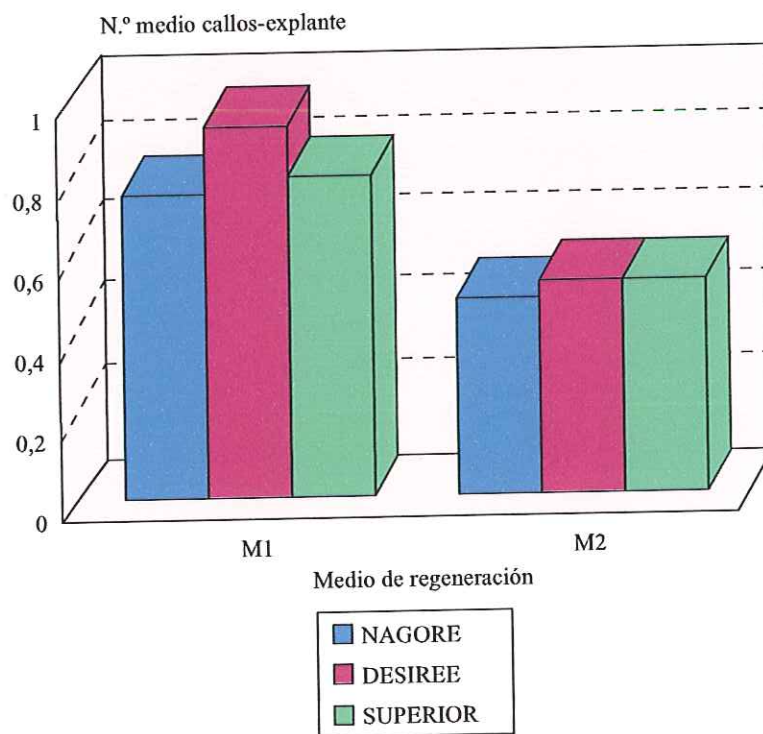


Fig. 1.—Número medio de callos por explante obtenidos por cultivar y medio de regeneración
Average number of callus obtained per cultivar and regeneration medium

En el explante de hoja la aparición de brotes tuvo lugar en torno a la semana sexta de cultivo. En los discos de tubérculos y microtubérculos su aparición se produjo hacia la cuarta semana. La evolución en la aparición de brotes en función del tiempo para los tres tipos de explante y los tres cultivares mostró siguió una curva con tres fases independientes del tipo de explante y del medio de cultivo. Una primera fase que se extendió hasta las dos o tres semanas desde la aparición del primer brote, alcanzando un máximo hacia la tercera y cuarta semanas, tras las cuales se inició una fase de reducción de brotes hasta la

semana séptima. El cv. Superior no indujo a brotes en ningún medio de regeneración a partir de discos de tubérculo y microtubérculo.

TABLA 2
ANOVA DEL NUMERO DE CALLOS POR EXPLANTE OBTENIDOS EN CADA CULTIVAR Y MEDIO DE REGENERACION

ANOVA of the callus number by explant obtained in each cultivar and regeneration medium

Fte. de variación	gl	CM
Total	23	
Cultivar	2	0,0082n.s.
Medio	1	0,2900**
Cultivar x medio	2	0,0007n.s.
Error	18	0,0780

** Significativo al nivel de probabilidad del 0,01; n.s.: no significativo.

De esta forma, y con el explante hoja se obtuvieron los primeros brotes, para el cv. Désirée, a las seis semanas de su puesta en cultivo. Los resultados del análisis de varianza bifactorial relativos al número medio de brotes y plántulas mostraron un efecto significativo para los medios de regeneración y tipos de explante en los tres cultivares (Tabla 3). La Tabla 4 muestra la separación de medias del número de brotes y plántulas obtenidas en los tres cultivares y tres explantes con los dos medios de regeneración empleados. Se observan unos valores más altos para ambos parámetros en M1 con hojas, no existiendo diferencias significativas en el número de plántulas enraizadas entre este explante y discos de tubérculo para el cv. Nagore en el medio de regeneración M2.

TABLA 3
ANOVA DEL NUMERO DE BROTES Y PLANTULAS PRODUCIDOS POR EXPLANTE Y MEDIO DE CULTIVO

ANOVA of shoots number and plantlets produced by explant and culture medium

Fuente de variación	Nagore		Désirée		Superior	
	N.º de brotes	N.º de plántulas	N.º de brotes	N.º de plántulas	N.º de brotes	N.º de plántulas
Medio	**	**	***	***	***	***
Explante	***	**	***	***	***	***
M X E	**	*	**	**	**	**

* Nivel de significación del 0,05.

** Nivel de significación del 0,01.

*** Nivel de significación del 0,001.

TABLA 4

NUMERO MEDIO DE BROTES Y PLANTULAS OBTENIDAS POR CULTIVAR, EXPLANTE Y MEDIO DE REGENERACION (M1 Y M2)

Average number of shoots and plantlets obtained by cultivar, explant and regeneration medium (M1 and M2)

Cultivar	Explante	Número medio de brotes-explante		Número medio de plántulas-explante	
		M1	M2	M1	M2
Désirée	hoja	6,85 a ¹ A ²	2,73 b B	6,25 a A	2,50 b B
	tubérculo	1,20 b B	2,92 a A	1,00 b B	2,80 a A
	microtubérculo	0,80 c B	1,70 c A	0,80 c B	1,50 c A
Nagore	hoja	6,80 a A	3,16 a B	6,50 a A	3,00 a B
	tubérculo	1,30 b B	2,90 b A	1,00 b B	2,80 a A
	microtubérculo	0,50 c B	1,20 c A	0,30 c B	1,00 b A
Superior	hoja	5,20 a A	3,20 a B	4,75 a A	3,00 a B
	tubérculo	0,00 b A	0,00 b A	0,00 b A	0,00 b A
	microtubérculo	0,00 b A	0,00 b A	0,00 b A	0,00 b A

¹ Separación de medias por Waller-Duncan (0,01) entre explantes (minúsculas).

² Separación de medias por Waller-Duncan (0,01) entre medios de cultivo M1 y M2 (mayúsculas).

La interacción explante-medio se refleja con la obtención de un mayor número medio de brotes en medio M1 para las hojas y en medio M2 para los discos de tubérculo y microtubérculo en los cvs. Désirée y Nagore. A partir de discos de tubérculo estos dos cvs. mostraron un comportamiento similar, siendo algo superior con microtubérculos para el primero. El cultivar Superior no produjo brotes con ninguno de estos dos tipos de explante. Dale, Hampson (1995) reflejan la influencia del genotipo en la regeneración dependiendo del explante, en 34 cultivares de patata de los que 17 no indujeron a brotes a partir de discos de tubérculo. Las eficiencias de regeneración para el cv. Désirée a partir de hoja fueron las más elevadas, al igual que las obtenidas en el presente trabajo.

En cuanto al número medio de plántulas enraizadas (Tabla 4) se observaron unos resultados similares con el explante hoja al obtenido con el número de brotes, con unas eficiencias mayores cuando se empleó el medio M1 de regeneración. Asimismo, el número de plántulas en medio M2 fue significativamente mayor que en M1 cuando se emplearon como explantes tubérculos y microtubérculos para los cvs. Désirée y Nagore.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden, para discos de tubérculo, con los de Stiekema *et al.* (1988), Snyder, Belknap (1993) al utilizar como fuente de citoquinina en el medio de regeneración ribósido de zeatina. Sin embargo, ellos añaden una capa de suspensiones celulares de los cultivares que emplean para facilitar la fase de inducción, lo que se traduce en un método más laborioso. Asimismo, Tavazza *et al.* (1988) a partir de discos foliares realizan una preincubación de dos días en una suspensión celular, antes de pasar al medio de regeneración. El tiempo desde la puesta en cultivo de los discos hasta la aparición de los primeros brotes se situó en nuestro caso en torno a las cuatro semanas, similar al descrito por estos autores.

La concentración de ribósido de zeatina empleada en este trabajo a partir de explantes de hoja fue menor (2 mg/l) a la de discos de tubérculo (3,5 mg/l). De Block (1988) utiliza una concentración inferior (1 mg/l) pero aumenta la de ácido naftalen acético (0,1 mg/l) frente a los 0,02 mg/l aquí descritos. Park *et al.* (1995) añade concentraciones más elevadas de ribósido de zeatina (4 mg/l) y emplea ácido indol acético en vez de ácido naftalén acético. Otros autores (Figueira-Filho *et al.*, 1994) utilizan un medio de inducción de callos previo al medio de inducción de brotes conteniendo 2 mg/l de benzil amino purina y 5 mg/l de ácido giberélico.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se desprende la ventaja de la utilización de hojas como explante primario para la regeneración, asociada a un único medio de cultivo M1. A partir de discos de tubérculo y microtubérculo el medio más favorable fue el M2 aunque se obtuvo un menor número de plántulas.

Con la metodología empleada, los tiempos y tasas de regeneración son equiparables a los descritos por otros autores (Dale, Hampson, 1995) pero supone un avance en la simplificación del proceso, al reducir el número de manipulaciones, evitando la necesidad de cultivos nodriza o fases de preinducción y empleando, además un único medio de inducción de callos y regeneración. Esto constituye el primer paso en el conocimiento de la capacidad morfogenética de estos cultivares para ser empleados en procesos de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado es parte del Proyecto AGF93-0894 financiado por la CICYT. Los autores agradecen al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (CIHEAM) la financiación de una beca de Tesis Master para la realización de este trabajo.

SUMMARY

Evaluation of regeneration ability in *Solanum tuberosum* L.

In vitro regeneration of potato cvs. Nagore, Desirée and Superior was analyzed to be used for genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Different explants such as leaves, tubers and microtubers and different regeneration media differing in their hormonal composition were tested to increase the efficiency of the process. Callus induction rates, number of shoots and number of regenerated plants were determined for each explant, culture medium and cultivar. Leaves were the best explants according to the observed regeneration rate, using an MS media containing glucose (30 g/l), naftalen acetic acid (0.02 mg/l), zeatin riboside (2 mg/l) and gibberellic acid (0.02 mg/l). Tuber and microtuber explants reached higher regeneration rates in an MS medium with sucrose (30 g/l), indolacetic acid (0.5 mg/l) and zeatin riboside (3.5 mg/l). The obtained results suggest the use of leaf explants for transformation with the three cultivars tested.

KEY WORDS: *Solanum tuberosum*
Regeneration
Explant
Potato

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- DE BLOCK M., 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Theor. Appl. Genet. 76: 767-774.
DALE P.J., HANSON K.K., 1995. An assesment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.). Euphytica 85: 101-108.
FIGUEIRA-FILHO E.S., FIGUEIREDO L.F.A., MONTE-NESHICH D.C., 1994. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantequeira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. Plant Cell Rep. 13: 666-670.

- HOEKEMAA., HUISMAN M.J., MOLENDIJK L., VAN DEN ELZEN P.J.M., CORNELISSEN B.J.C., 1989. The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X. *Bio-Technology* 7: 273-278.
- ISHIGE T., MASAHIRO O., OHASHI Y., 1991. Transformation of Japanese potato cultivars with the β -glucuronidase gene fused with the promoter of the pathogenesis-related Ia protein gene of tobacco. *Plant Sci.* 73: 167-174.
- KEIL M., SANCHEZ-SERRANO J.J., WILLMITZER L., 1989. Both wound-inducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of a single member of the potato proteinase inhibitor II gene family. *EMBO J.* 8: 1923-1930.
- LEE M., PHILIPS R.L., 1988. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 413-437.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- PARK Y.D., RONIS D.H., LORENZEN H.J., 1995. Suppression of marker genes in sequentially transformed potato (*Solanum tuberosum*). *American Potato J.* 172: 599-604.
- SAS 1988. SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 Edition. Cary, NC, USA.
- SHEERMAN S., BEVAN M.W., 1988. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell Rep.*, 7: 13-16.
- STIEKEMA W.J., HEIDEKAMP F., LOUWERSE J.D., VERHOEVEN H.A., DIJKHUIS P., 1988. Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Désirée using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cell Rep.* 7: 47-50.
- SNYNDER G.W., BELKNAP, W.R., 1993. A modified method for routine *Agrobacterium* mediated transformation of *in vitro* grown potato microtubers. *Plant Cell Rep.* 12: 324-327.
- TAVAZZA R., TAVAZZA M., ORDAS R.J., ANCORA G., BENVENUTO E., 1988. Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*): an efficient method to obtain transgenic plants. *Plant Sci.* 59: 175-181.
- VISSEER R.G.F., JACOBSEN E., HESSELING-MEINDERS A., SCHANS M.J., WITHOLT B., FEENSTRA W.J., 1989. Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Mol. Biol.*, 12: 329-337.