

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN PAPA CVS. ATLANTIC Y FRITOLAY-1867

M. C. Sánchez-Enciso^{1¶}; J. L. Rodríguez-de la O.¹; G. P. Zárate-de Lara²;
A. López-Herrera¹; S. Barrales-Domínguez¹; G. González-de la Cruz³.

¹Posgrado en Horticultura, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Km 36.5
Carretera México-Texcoco. Chapingo, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230.
Correo-e: chelozasa@Yahoo.com.mx (¶Autor responsable).

²Sabritas S. A. de C. V. Palmas 735 Col. Lomas de Chapultepec C. P. 11000. D. F., MÉXICO.

³Departamento de Física. CINVESTAV Instituto Politécnico Nacional., D. F., MÉXICO.

RESUMEN

El empleo del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales para la obtención de embriones somáticos, se considera como un método eficiente para la propagación de un número de especies de importancia agronómica y hortícola, entre las que se encuentra la papa *Solanum tuberosum* L. El objetivo del presente estudio fue la obtención de células embriogénicas a partir de explantes de mesófilo de hoja de papa cultivares Fritolay-1867 y Atlantic. La formación de embriones somáticos de papa 'Fritolay-1867' se promovió cuando en el medio de cultivo se utilizó thidiazuron a una concentración de 1.0 mg·litro⁻¹ como regulador del crecimiento, los cuales se cultivaron en medio que contenía sales de Murashige y Skoog complementados con vitaminas, carbohidratos y antioxidantes, incubándose inicialmente durante ocho semanas en oscuridad y posteriormente durante fotoperíodos de 16 h luz a una intensidad de 44 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ y a una temperatura de 26 \pm 1 °C durante 60 días. A las nueve semanas se obtuvieron los primeros inicios de germinación de los embriones con un 5 %, desarrollando en plantas completas.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Solanum tuberosum* L., thidiazuron, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, cultivo *in vitro*.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN POTATO CVS. ATLANTIC AND FRITOLAY-1867

ABSTRACT

The use of *in vitro* cultivation of vegetable cells and tissue to obtain somatic embryos is considered to be an efficient propagation method for a number of important agronomical and horticulture species. Among these is *Solanum tuberosum* L. The main objective of this study was to obtain embryogenetic cells from explants from potato leaf mesophyll, cultivars Fritolay-1867 and Atlantic. Formation of somatic embryos of Fritolay-1867 was promoted when, in the culture medium, thidiazuron was used at a concentration of 1.0 mg·liter⁻¹ was used as a growth regulator. The embryos were cultivated in a Murashige and Skoog medium complemented with vitamins, carbohydrates, and antioxidants, and initially incubated during eight weeks of darkness and later with photoperiods of 16 h using 44 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ light intensity at a temperature of 26 \pm 1 °C for 60 days. At nine weeks, the first indication of embryonic germination was obtained with 5 % and development of complete plants.

ADDITIONAL KEY WORDS: *Solanum tuberosum* L., thidiazuron, 2,4-dichlorophenoxy acetic, *in vitro* cultures.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo importante en todo el mundo, y constituye en la actualidad el cuarto cultivo más importante después del trigo, maíz y arroz (FAO, 1999 citado por Moré *et al.*, 2000). En México el consumo anual *per capita* de papa es de 12.3 kg y ocupa el sexto lugar en importancia (Hernández *et al.*, 2001).

El cultivo es de gran valor alimenticio debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, lo cual no es común en las proteínas de otras plantas (Estrada, 2000). Este cultivo provee al menos 12 vitaminas esenciales, incluyendo altas cantidades de vitamina C, minerales y también proporciona cantidades significativas de hierro y carbohidratos (Miller y Lipschutz, 1984).

La utilización de tubérculos como semilla, presenta una serie de desventajas entre las que se encuentran: la necesidad de utilizar grandes áreas para su producción, insuficiencia de semillas de buena calidad, la transferencia de virus, elevados costos de importación de semilla élite, transporte, almacenamiento y refrigeración (Cárdenas, 1989).

Varias técnicas para la propagación *in vitro* rápida de papas libres de patógenos han sido desarrolladas a partir de meristemos. Otros métodos de propagación *in vitro* utilizan brotes axilares desarrollados de puntas meristemáticas, puntas de ápices y de brotes para producir plantas idénticas a los progenitores, subsecuentemente originados a través de la organogénesis o embriogénesis somática (Hu y Wang, 1983).

Debido a que la respuesta morfogénica puede variar de un genotipo a otro, Gómez *et al.* (1997), exploraron las posibilidades de inducir embriogénesis somática u organogénesis en los cultivares de papa 'Diacol Capiro' y 'Parda Pastusa' a partir de explantes de hoja, estudios que son el inicio a las posibilidades de aplicar nuevas técnicas de mejoramiento genético, como es el caso de la producción de plantas transgénicas y/o semillas sintéticas.

Seabrook *et al.* (2001) señalaron que la regeneración de embriones somáticos a partir de tejido creciendo bajo condiciones *in vitro* han sido logrados para muchas plantas, pero que son relativamente pocos los reportados para el cultivo de papa. Las diferencias considerables en el número de embriones somáticos obtenidos de tejido en diferentes cultivares de papa, fueron observadas y condujeron a la conclusión de que tal regeneración puede tener un control estrictamente genético; de tal forma que dichos genes responsables de la regeneración vía embriogénesis somática, pueden ser caracterizados e incluso transferidos a genotipos seleccionados de papa.

En 1975, Lam indicó la inducción de cuerpos embrionarios y brotes de callos de tubérculos de papa, creciendo en un medio conteniendo sales de Murashige y Skoog (1962) (MS), complejos orgánicos de Nitsch, sacarosa, caseína hidrolizada (CH), ácido indolacético (AIA), ácido giberélico (AG_3), kinetina (KIN) y 6-benzylaminopurina (BA). La adición de BA a estos medios fue esencial para la inducción de brotes de embriones somáticos, sin embargo, los brotes producidos fueron anormales, y el medio fue subsecuentemente refinado para permitir la producción de plantas normales. Las primeras modificaciones involucraron a los reguladores de crecimiento, así las concentraciones de AIA y KIN fueron incrementadas, añadiéndose ácido naftalenacético (ANA) y zeatina (ZEA). La adición de AG_3 , a los medios de cultivo fue requerida para el alargamiento de brotes, y su ausencia estimula la producción de estructuras parecidas a nódulos

que usualmente no desarrollan más que en la superficie de los callos (Miller y Lipschutz, 1984).

El empleo del cultivo de células y tejidos vegetales para producción de planta libre de patógenos, y el desarrollo de la embriogénesis somática a partir de cultivos certificados, como una alternativa para la producción masiva de semilla somática y plantas con calidad fitosanitaria, son razones que motivaron el llevar a cabo la presente investigación con el siguiente objetivo: Establecer las condiciones *in vitro* que permitan la embriogénesis somática en explantes de mesófilo de hojas de papa cvs. Atlantic y Fritolay-1867.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en la Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo Estado de México, México.

El material vegetal inicial se obtuvo a partir de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) de los cvs. Fritolay-1867 y Atlantic, pertenecientes al laboratorio de Biotecnología de Sabritas®, certificadas libres de patógenos. Así mismo cada uno de los genotipos fueron sometidos a pruebas de calidad industrial, que permiten establecer indicadores de materia seca y azúcares reductores. Adicional a esto se cuenta además con información del comportamiento agronómico (rendimientos y productividad). Los minitubérculos se sembraron en suelo y posteriormente de ellos se tomaron yemas para sembrarse en un medio de multiplicación *in vitro* y obtener las nuevas plantas. Cuando contaban con un mes de edad se tomaron segmentos de hoja de aproximadamente 5 mm de lado como explantes, esto se llevó a cabo dentro de una cámara de flujo laminar y con la ayuda de bisturí y agujas estériles. Dichos segmentos se colocaron por el envés dentro de los frascos con medio de cultivo. Se emplearon como medio básico las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (MS) (1962), complementándose con tiamina ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), mio-inositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), ácido nicotínico ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), piridoxina ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), ácido cítrico ($125 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), ácido ascórbico ($125 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), cisteína ($25 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$), agar ($8 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$) y thidiazuron ($0.1, 1.0$ y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$). Los explantes se incubaron a una temperatura de 26 ± 1 °C y en oscuridad durante ocho semanas, para posteriormente pasarlos a fotoperíodo de 16 horas luz a una intensidad de $44 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ durante ocho días.

El diseño experimental es un completamente al azar con 50 repeticiones donde la unidad experimental la constituyó un explante y la variable respuesta es el número

de embriones por explante. En cada una de las unidades experimentales se registró el número de explantes que formaron embriones, el tiempo de formación del embrión así como forma e uniformidad de los mismos. Posteriormente se ajustó un modelo de regresión cuadrático entre las variables número de embriones y semanas de desarrollo.

Los embriones somáticos obtenidos se pasaron a un nuevo medio que contenía: sales inorgánicas de Murashige y Skoog 100 %, tiamina ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), mio-inositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$), agar ($8 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$) y ácido giberélico ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$) bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo que en el caso anterior, hasta la formación de las plantas de papa. Estas se sembraron en vasos de unisel del # 10 con una mezcla de suelo y agrolita en una relación 3:1 (volumen:volumen), humedeciéndose con agua más Agrimicín 500 (estreptomicina $17.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, oxitetraciclina $1.76 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y sulfato tribásico de cobre $424 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a una concentración de $3.0 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$ y cubriéndose con una bolsa de plástico durante 3 días.

RESULTADOS

La formación de embriones somáticos de papa del cv. Fritolay-1867, se obtuvieron a partir de secciones de mesófilo de 5 mm de lado, cuando se colocaron en medio de cultivo donde se utilizó thidiazuron a una concentración de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ como regulador del crecimiento. Por otra parte se obtuvo 0 % de contaminación de los explantes. Los explantes del cv. Fritolay-1867 a la tercer semana presentaron pequeños agregados celulares de consistencia compacta, algunos de forma globular y de una coloración verde intenso (Figura 1); a la quinta semana estos se tornaron de un color verde claro brillante, en donde se empezó a notar con claridad la formación de embriones en la etapa morfológica globular (Figura 2); a la sexta semana las estructuras embrionarias cambiaron a una coloración verde amarillento de acuerdo al tamaño y la forma, en donde se observó claramente una prolongación o extensión longitudinal del embrión globular a un embrión de forma "oblonga" (Figura 3).



FIGURA 1. Agregados celulares de color verde en el mesófilo de hoja de papa cv. Fritolay-1867.

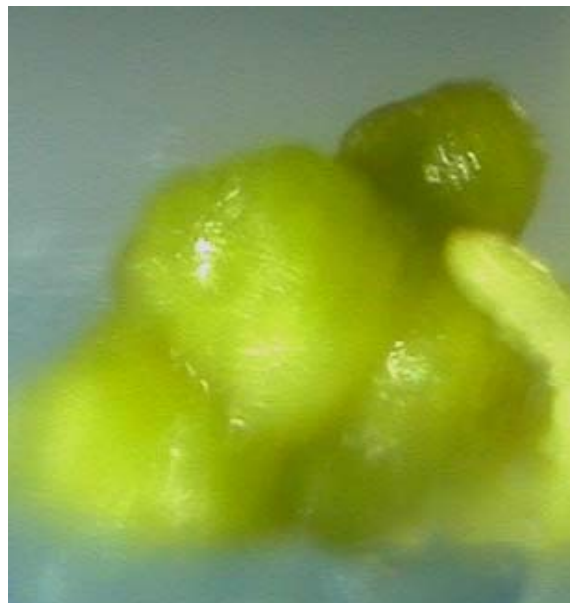


FIGURA 2. Estructuras embrionarias globulares de color verde brillante a los 35 días de incubación, de papa cv. Fritolay-1867.

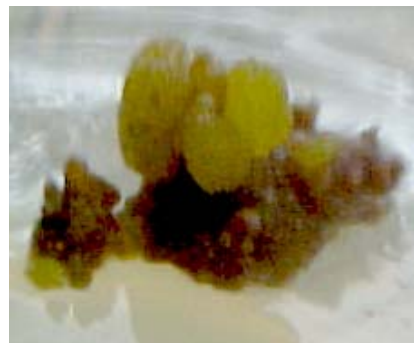


FIGURA 3. Embriones oblongos de color verde amarillento a los 45 días de incubación, de papa cv. Fritolay-1867.

Para la octava semana cuando fueron sacados de la oscuridad e incubados en luz, las estructuras habían alcanzado diferentes tamaños los cuales variaron dependiendo de la madurez alcanzada por cada embrión, así como la coloración de estos ya que cambiaron a un color entre verde blanquecino hasta un color café claro, en donde se observaba con claridad una mayor cantidad de embriones por explante con excelentes características morfogénéticas, los cuales variaron de número obteniéndose de 15 a 52 embriones por explante (Figuras 4 y 5). Estos embriones nunca pasaron por la etapa de corazón, ni llegaron a la etapa de torpedo.

El análisis de varianza se llevó a cabo con los explantes que formaron embriones y se compararon los promedios del número de embriones formados durante las semanas de desarrollo de los mismos (Cuadro 1 y 2).



FIGURA 4. Embriones maduros de diferentes tamaños de color verde oscuro y café claro a los 60 días de incubación, de papa cv. Fritolay-1867.

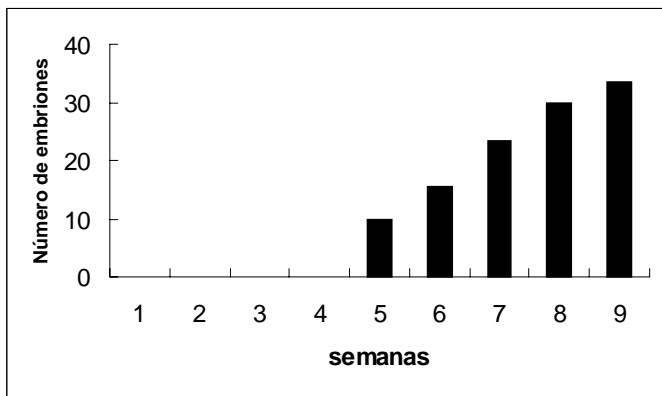


FIGURA 5. Promedio de embriones obtenidos de la quinta a la novena semanas posteriores a la siembra de explantes de mesófilo de hojas de papa cv. Fritolay-1867.

Del análisis de la varianza y los intervalos de confianza para las medias se deduce que existe diferencia significativa ($P < 0.046$) entre el promedio de embriones de la quinta a la novena semanas. Esto quiere decir que el número de embriones que se formaron durante la quinta, sexta y séptima semanas fueron incrementando considerablemente, pero a partir de la octava semana este incremento se mantuvo en forma más o menos constante, ya que una vez que los embriones se sacaron de la oscuridad iniciaron un proceso de maduración, disminuyendo el número de embriones formados. La tendencia de crecimiento en el periodo comprendido entre la quinta y la novena semanas está explicada por una ecuación de regresión cuadrática (Figura 6).

La ecuación explica en un 98.4 % el comportamiento del número de embriones promedio a través de la quinta y la novena semanas, y muestra que la razón de crecimiento, dada por la ecuación:

$$\frac{dy}{dx} = -1.88x + 19.36$$

disminuye a partir de la séptima semana.

A las nueve semanas se obtuvieron los primeros indi-

cios de la germinación de los embriones, la cual consistió en la aparición de las raíces para posteriormente dar origen al hipocótilo de tallo formado nuevas plantas completas de papa (Figura 7). La embriogénesis somática *in vitro* ensayada en los genotipos de papa, en los medios de cultivo y reguladores de crecimiento empleados, sólo aseguraron 5 % de embriones germinados, debido probablemente a que los reguladores pueden exhortar múltiples efectos en estos procesos, dependiendo de la concentración, del estado del embrión cuando se aplicaron o bien del cultivar de que se trate.

CUADRO 1. Análisis de la varianza para el número de embriones de papa provenientes de mesófilo de hoja.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Semana	4	1991.4	497.9	32.20	0.0001
Explante	4	3136.2	784.1	50.72	0.0001
Error	16	247.4	15.5		
Total	24	5375.0			

CUADRO 2. Intervalos de confianza al 95 % para la medias basados en la desviación estándar (Devstt) ponderada para el número de embriones de papa derivados de mesófilo de hoja.

Nivel	N	Media	DevSt	Intervalo de Confianza
5	5	12.80	6.98	(-----*-----)
6	5	23.80	13.77	(-----*-----)
7	5	30.00	13.55	(-----*-----)
8	5	33.00	13.77	(-----*-----)
9	5	39.00	15.31	(-----*-----)
DevSt Ponderada = 13.01				15 30 45

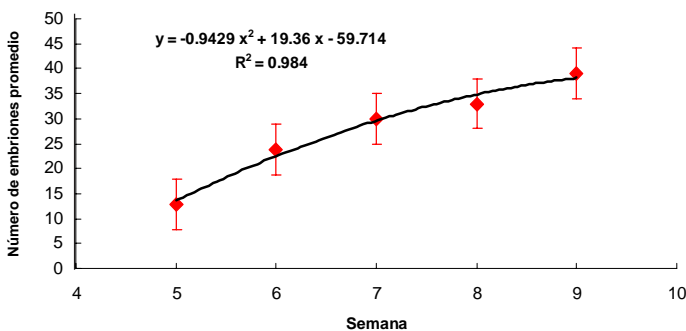


FIGURA 6. Regresión cuadrática e intervalos de confianza para la predicción para el número promedio de embriones obtenidos a partir de la quinta a la novena semanas de incubación de explantes de mesófilo de hoja de papa cv. Fritolay-1867.

En cuanto al cv. Atlantic, se presentaron varios niveles



FIGURA 7. Plantas de papa obtenidas a partir de embriones somáticos de explantes de mesófilo de hoja de papa cv. Fritolay-1867, a las nueve semanas.

de necrosamiento de tejido a partir de la tercera semana de incubación de los explantes.

DISCUSIÓN

El utilizar el thidiazuron como tratamiento inductivo de la embriogénesis en el cv. Fritolay-1867 de papa, muestra que es posible el uso de otras auxinas capaces de modular con eficacia este proceso, lo mismo se observó al utilizar el 2,4,5-T en alfalfa; sin embargo existen otras auxinas como el AIA e AIB que resultan ineficaces para la formación de embriones somáticos, por lo que McKersie y Bowley (1996), concluyeron que no se puede sustituir a este regulador del crecimiento ya que la respuesta de estos compuestos es absolutamente compleja.

La etapa morfológica que presentaron los embriones somáticos del cv. Fritolay-1867, correspondiente a la sexta semana, coincide con lo reportado por Payne *et al.* (1992), donde sugieren un desarrollo intermedio entre el estado globular y el estado de corazón, mencionando que en la transición de la expansión isodiamétrica característica del embrión globular, a una extensión longitudinal resulta en un embrión "oblongo". La emergencia de cotiledones puede ser usada entonces para distinguir entre el estado oblongo y el de corazón.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por JayaSree *et al.* (2001), ya que ellos encontraron un procedimiento eficiente para inducir embriones somáticos a partir de hoja de plantas de papa del cv. Jyothi. Las secciones de hojas fueron incubadas en medio de cultivo que contenía conjuntamente el 2,4-D + benzyladenina (BA) y zeatina + BA en un medio con las sales de Murashige y Skoog (MS). Estos mismos autores mencionaron que la

transición de embriones de forma globular a polar es un paso crítico en la embriogénesis, de tal forma que para que se de un desarrollo normal de embriones somáticos se requiere de un tiempo preciso y una regulación espacial de la división, alargamiento y diferenciación celular. Los reguladores del crecimiento pueden tener múltiples efectos en estos procesos, dependiendo de la concentración o en el momento de aplicación en los diferentes estados en que se encuentren las estructuras embrionarias.

JayaSree *et al.* (2001), indicaron que la inducción de embriones somáticos a partir de mesófilo de hojas de papa no había sido estudiado con anterioridad; sin embargo, no indicaron si los embriones que obtuvieron fueron capaces de germinar.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron embriones somáticos a partir de explantes de mesófilo de hojas de papa del cv. Fritolay-1867, cuando se utilizó el thidiazuron a concentración de 1.0 mg-litro⁻¹ y se incubaron durante ocho semanas en oscuridad, y posteriormente en fotoperíodos de 16 horas luz.

Estos embriones obtenidos *in vitro* tuvieron la capacidad de germinar y formar nuevas plantas de papa del cv. Fritolay-1867.

LITERATURA CITADA

- CÁRDENAS D., L. M. 1989. Embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis de Maestro en Ciencias en Tecnología de Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 119 p.
- ESTRADA, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa., PROINPA-CID-Centro Internacional de la Papa. La Paz, Bolivia. 372 p.
- GÓMEZ G., L.; JARAMILLO O., E.; JARAMILLO, S.; HOYOS, R. 1997. Regeneración de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) a partir de tejido foliar en las variedades Diacol Capiro y Parda Pastusa. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 60 p.
- HERNÁNDEZ M., J.; OCHOA M., D.; SANDOVAL I., J. S. 2001. Evento de aprobación en certificación fitosanitaria de papa. Tomo I "Base Técnica". Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. pp. 1-11.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. 1983. Meristem, shoot-tip and bud cultures, pp. 177-227. *In: Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1: Techniques for Propagation and Breeding. EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (eds.) Macmillan. New York, USA.
- JAYASREE, T.; PAVAN, U.; RAMESH, M.; RAO, A. V.; JAGAN, M. R. K.; SADANANDAM, A. 2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 13-17.
- LAM, S. L. 1975. Shoot formation in potato tuber discs in tissue culture. *Am. Potato J.* 52: 103-106.

- McKERSIE, D. B.; BOWLEY, R. S. 1998. Somatic embryogenesis: forage improvement using synthetic seeds and plant transformation, pp. 117-134. *In: Molecular and Cellular Technologies for Forage Improvement*. Crop Science Society of America. Special Publication No. 26. Madison, USA.
- MILLER, S. A.; LIPSCHUTZ, L. 1984. Root and tuber crops, potato, pp.291-326. *In: Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. 3: Crop Species. AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; YAMADA, Y. (eds.). Macmillan, New York, USA.
- MORÉ H., O.; HERNÁNDEZ M., M.; NÚÑEZ, M.; GONZÁLEZ M., E.; VERDE, G. 2000. Formación de callos embriogénicos en papa con el empleo de análogos de brasinoesteroides. *Boletín de la Papa* 2(9): 8-15.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*. 15: 473-497.
- PAYNE, G. F.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULER, M. L.; 1992. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Hanser Publishers. Munich, Germany. 481 p.
- SEABROOK, J. E. A.; DOUGLASS, L. K.; TAI, G.C.C. 2001. Segregation for somatic embryogenesis on stem-internode explants from potato seedlings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 69-73.