

# REGENERACIÓN DE LA PLANTA DE PAPA (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) *IN VITRO* A PARTIR DEL ESTOLÓN

NORMA A. CORIA GIL\*, ANTONIO PÉREZ PACHECO\*, JORGE I. SARQUÍS RAMÍREZ\*,  
ISRAEL CANTÚ SILVA\*\*, HUMBERTO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ\*\*, MARCO V. GÓMEZ MEZA\*\*

**E**n México se cultiva papa en casi todos los estados, excepto en Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. La principal región productora de papa en el país es el norte, incluyendo todos los estados fronterizos y los del Bajío. En esta región el cultivo es altamente tecnificado y se practica bajo riego; los rendimientos promedio se aproximan a las 30 ton/ha y los costos de producción a los \$60,000/ha. Otra zona de producción de papa es la temporalera, constituida por los estados del centro, particularmente los de México, Puebla, Tlaxcala y Veracruz; los rendimientos en estos estados no alcanzan las 15 ton/ha y los costos superan los \$35,000/ha, lo cual implica ganancias marginales.<sup>1</sup>

El principal problema en la producción de papa en el país es la disponibilidad de semilla certificada de alta calidad. La industria semillera nacional no abastece más que el 20% de la demanda actual; por lo cual, el precio de la semilla y el costo del cultivo por unidad de superficie son muy elevados para los agricultores de escasos y medianos recursos.<sup>2</sup> Esta carencia es particularmente grave en los estados donde la papa se cultiva bajo condiciones de temporal.

Veracruz tiene una zona tradicionalmente papeira que incluye el Valle de Perote, así como las zonas de las faldas del Pico de Orizaba y del Cofre de Perote donde, desgraciadamente, la carencia de semilla certificada obliga al uso continuo de semilla degenerada que encarece el cuidado sanitario de las siembras, dando como resultado una baja producción, además, de mala calidad. El resultado es que muchos agricultores de estas zonas ya no siem-

bran papa, y muchos que quisieran no pueden hacerlo. En este sentido, es claro que existe la necesidad regional urgente de implementar una operación de producción de tubérculo semilla de papa de alta calidad para el rescate de las zonas papeiras del oriente del país.<sup>1</sup>

Una de las estrategias más usadas para la multiplicación rápida de semilla de alta calidad es la obtención de esquejes a partir de la planta madre libre de virus. Con esta técnica se pueden regenerar aproximadamente doce plantas nuevas por cada planta.<sup>3,4</sup> La planta madre de papa, como donadora de esquejes para la multiplicación rápida, podría aumentar su eficiencia hasta en un 50%, si además de tallos pudiéramos usar estolones. Si una planta genera siete estolones, podría generar el mismo número de nuevas plantas, además de las que se obtienen mediante los esquemas convencionales de multiplicación rápida.<sup>3</sup>

El estolón es un tallo subterráneo de crecimiento diageotrópico que crece sobre un eje longitudinal. Bajo las condiciones inductivas adecuadas, deja de alargarse para crecer radialmente y formar un tubérculo. Muchos clones de papa forman estolones entre los 45 y 50 días después de la siembra del tubérculo brotado. Sin embargo, no se sabe si el estolón puede regenerar a la planta completa, aunque por la experiencia con otras partes de la planta,

\*Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Carretera Peñuela-Amatlán de los Reyes Km 1, Veracruz. E-mail:jsarquis@uv.mx

\*\* Facultad de Ciencias Forestales y Economía, UANL, Carretera Nacional Núm 85, km 145, Linares, N.L.

usadas como esquejes, se presume que sí es posible; el problema radica en definir experimentalmente las condiciones ambientales y de cultivo *in vitro* que lo permitan.<sup>5,6</sup>

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se propone como objetivo definir las condiciones que permitan la regeneración de la planta de papa a partir del estolón, y evaluar la posibilidad de regeneración de la planta a partir del estolón inducido *in vitro*. Adicionalmente, se planteó utilizar marcadores proteicos de desarrollo de tallo o tubérculo, incluyendo a la proteína Sm18.1 de choque térmico, pues se ha visto que se acumula significativamente en tubérculos maduros, como indicadores de la diferenciación, ya sea de un tallo aéreo, o bien, de un nuevo tubérculo. Los objetivos específicos son: a) determinar la composición del medio de cultivo para la inducción de estolones *in vitro*, a partir de meristemos de plántulas *in vitro*; b) determinar la composición del medio de cultivo para la inducción de estolones *in vitro*, a partir de plántulas de invernadero; c) determinar la viabilidad de las plántulas regeneradas mediante su cultivo bajo condiciones de invernadero hasta la cosecha. Las hipótesis planteadas son: a) los estolones representan estructuras viables para la regeneración exitosa de plantas de papa; b) la concentración de sacarosa y de nitratos en el medio de cultivo es esencial para determinar si un estolón cultivado *in vitro* da lugar a la formación de un microtubérculo o a la formación de un tallo aéreo.

## Material y métodos

### Material biológico

Los tecnotubers y las plántulas *in vitro* del clon Atlantic (*Solanum tuberosum* L.) utilizados en el presente trabajo fueron donados por el Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola (ClyDA), Sabritas, en el Valle de Toluca, estado de México. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas y Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana.

### Multiplicación del material original (Microtubérculos)

Los tecnotubers se sembraron en bolsas de polietileno (40 cm x 40 cm) con una mezcla de peatmoss y

agrolita (1:1; p/p) como sustrato. Las bolsas se mantuvieron en invernadero hasta que las plantas alcanzaron el desarrollo requerido (cuatro meses) (figura 1). Durante este tiempo, las plantas se regaron diariamente con solución fertilizante Peter's (11-45-15; N-P-K) a razón de 4.5 g/L. Durante el desarrollo de las plántulas se practicó control preventivo de plagas y enfermedades con base en aplicaciones semanales de mezclas de insecticidas (Talstar, Diazinón y Lannate) y fungicidas (Flonex, Ridomil y Captam). Comúnmente se usaron dos insecticidas y dos fungicidas en cada aplicación, siguiendo las instrucciones del fabricante.



Fig. 1. Planta de papa generada en condiciones de invernadero para obtener esquejes.

### Cultivo de plántulas *in vitro*

El medio de cultivo utilizado para la micropropagación de plántulas *in vitro* fue el reportado por Murashige-Skoog<sup>7</sup> con 30 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar a pH 5.8, con modificaciones.<sup>8</sup> Para la micropropagación se usaron plántulas de 12 cm de altura, aproximadamente. Bajo condiciones estériles (campana de flujo laminar horizontal, Industrias Figursa, modelo CFH-120), las plántulas se esquejaron para obtener fragmentos de tallo de 2 cm, cada uno con un entrenudo a la mitad de éste, se sembraron en tubos de ensayo (Kimax, 10 cm x 2 cm) y se incubaron para su desarrollo bajo condiciones *in vitro* que posteriormente se describirán (figura 2).

### Muestras

En plantas de invernadero provenientes de microtu-



Fig. 2. Plántula de papa generada en condiciones *in vitro* para obtener esquejes.

bérculos se realizaron tres muestreos en diferentes etapas de desarrollo: a) 1.5 meses de edad para la obtención de meristemos laterales, b) dos meses de edad para los estolones, c) cuatro meses de edad para cosechar los tubérculos. Los estolones y los meristemos axilares fueron removidos de la planta con un bisturí. Los estolones se cortaron de una longitud de 0.5 cm y los entrenudos, en donde se observaron meristemos axilares, se cortó 1 cm por arriba y por debajo de éstos. Antes de sembrar *in vitro* el tejido vegetal se esterilizó superficialmente; primero, lavando con detergente y agua corriente, posteriormente se enjuagó con agua destilada y, finalmente, bajo condiciones estériles, se desinfectó con etanol al 70% (v/v) durante 30 s, hipoclorito de sodio al 3% (v/v) durante 10 min, y se enjuagó con agua estéril. Se sembró un esqueje por tubo de ensayo (Pyrex No. 9820), ya fueran esquejes provenientes de plantas de invernadero o de plántulas *in vitro*.

## Tratamientos del tejido vegetal *in vitro*

### Fase I: Obtención de estolones y microtubérculos *in vitro*

Los meristemos axilares desarrollados a partir de plantas de invernadero o de plántulas *in vitro* se sembraron y sometieron a diferentes condiciones de cultivo (tabla I), con el fin de encontrar el medio óptimo para el desarrollo de estolones.

Para cada tratamiento se emplearon cinco (repeticiones) tubos de ensayo con un explante cada uno de ellos. Los tubos fueron expuestos a 3,000

Tabla I. Tratamientos de medio de cultivo empleados para promover la inducción y desarrollo de estolones en plántulas *in vitro*. GA<sub>3</sub>, ácido giberélico 3.

Tratamiento	MS-basal	Sacarosa (% p/v)	GA <sub>3</sub> (mM)
1	100	0	0
2	100	0.5	0
3	100	1	0
4	100	3	0
5	100	8	0
6	1/10 NO <sub>3</sub>	0	0
7	1/10 NO <sub>3</sub>	1	0
8	1/10 NO <sub>3</sub>	1	0.5
9	1/10 NO <sub>3</sub>	3	0
10	1/10 NO <sub>3</sub>	3	0.5
11	1/10 NO <sub>3</sub>	8	0
12	1/10 NO <sub>3</sub>	8	0.5

luxes con un fotoperiodo de 12:12 h (luz:oscuridad) a 25°C.

### Fase II: Regeneración de la plántula a partir de estolones

Los estolones desarrollados de plantas mantenidas *in vitro* o en invernadero se transfirieron a tubos con los medios de cultivo descritos anteriormente (tabla I). Los tubos fueron expuestos a las condiciones lumínicas ya mencionadas, y se incubaron durante 30 días. Al final de este periodo se evaluó la longitud del estolón (cm).

### Fase III: Cultivo de plantas regeneradas a partir de plántulas *in vitro*

Las plántulas y los microtubérculos obtenidos en los experimentos anteriores se transplantaron a maceta junto con un testigo (o control), que consistió en sembrar tubérculo-semilla obtenida en campo del ClyDA en el Valle de Toluca.

### Obtención de tubérculos en invernadero

Para comprobar que no existen diferencias en las dimensiones, independientemente del origen de la planta madre, se sembraron tubérculos-semilla en campo para obtener plantas adultas, se produjeron y sembraron tubérculos bajo dos condiciones:

a) tubérculos brotados y b) brotes inducidos con luz.

### **Análisis de proteínas**

Con la finalidad de iniciar una línea de investigación relacionada con los cambios en los perfiles proteicos asociados al desarrollo de los diferentes tejidos de la planta, se realizaron extracciones de proteínas de hoja, tallo, estolón y tubérculos en diferentes estadios de desarrollo. El análisis se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y por Western Blot.<sup>9</sup>

### **Extracción de proteínas**

Se tomaron muestras de 0.5 g de tejido, mismo que se congeló en nitrógeno líquido y se homogeneizó en 1 mL de amortiguador de extracción, el cual se preparó según la técnica de Woodson y Handa<sup>10</sup> con algunas modificaciones (Tris-HCl 65 mM a pH 6.8, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM). Se eliminó la SBA y se adicionaron los inhibidores de proteasas: ditiotestrol (DTT), pepstatina y leupeptina. El homogeneizado se centrifugó a 12,000 rpm (centrífuga Sigma modelo 3K15) durante 15 min y el sobrenadante se incubó a 90°C durante 5 min. La concentración de proteínas en el extracto crudo se determinó usando el kit coomassie dye binding assay (catálogo 500-0006 Bio-Rad).

### **Electroforesis**

La separación de polipéptidos se realizó por el método electroforético<sup>11</sup> (Mini protean 3 Cell, catálogo 165-3301, Bio-Rad), utilizando gel de poliacrilamida con dodecyl sulfato sódico (SDS-PAGE). Se usó un gel apilador al 5% y un gel separador al 12%. Los estándares de peso molecular comerciales se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA). La electroforesis se corrió a 200 voltios durante 45 min. Los polipéptidos separados fueron teñidos con azul de coomassie.

### **Western blot**

Los polipéptidos separados por electroforesis fueron transferidos a papel de nitrocelulosa Whatman (catálogo 3030-866). La transferencia se realizó con un mini protean 3 Cell, a 15 voltios durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, la nitrocelulosa se incubó en amortiguador bajo en sales (LSB; NaCl 0.9% y Tris-HCl 1 mM a pH 7.5) más leche

descremada al 5% (LSBM) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante; se descartó el amortiguador y se lavó con LSB. Posteriormente, se adicionó el primer anticuerpo (Ab-18.1, 1:2,000, donado por la Dra. Elizabeth Vierling, del Departamento de Bioquímica, Universidad de Arizona, USA) en LSBM a un volumen final de 25 mL, y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h con agitación constante. Se lavó y se adicionó el segundo anticuerpo (Ab-Rabbit, conjugada a peroxidasa, Amersham, Arlington Heights, IL, USA) a una dilución 1:2,500 en un volumen final de 25 mL en LSB durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Transcurrido este tiempo se eliminó el amortiguador, se lavó y los polipéptidos se visualizaron por quimioluminiscencia con el sistema de detección ECL (Amersham Life Science).<sup>9</sup>

### **Análisis estadísticos**

Para la variable longitud del tallo, se emplearon metodologías estadísticas no paramétricas, debido a que la hipótesis nula de distribución normal en esta variable fue rechazada al utilizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0.05$ ). Además, para la variable respuesta, la hipótesis de homogeneidad de varianzas de tratamientos también se rechazó al efectuar el contraste con la prueba de Levene ( $p < 0.05$ ). Con el propósito de detectar diferencias significativas entre tratamientos (tabla I) para la longitud del tallo en plantas provenientes de los estolones (fase II) desarrollados de plantas *in vitro* o en invernadero, los datos fueron analizados de acuerdo a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.<sup>12</sup> La significancia de la comparación de parámetros de centralidad entre dos tratamientos, para cada tipo de regeneración de planta (*in vitro* o de invernadero), fueron validadas mediante el uso de la prueba no paramétrica basada en rangos de Wilcoxon-Mann-Whitney,<sup>12,13</sup> y fueron consideradas estadísticamente significantes con un nivel de 0.05.<sup>13</sup> Para realizar el análisis estadístico de los datos, se utilizó el paquete computacional SPSS (por sus siglas en inglés: Statistical Package for Social Sciences) versión estándar número 9 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

## **Resultados**

### **Explantes**

De acuerdo al análisis estadístico de los datos de

longitud del tallo obtenidos a partir de estolones regenerados de plántulas provenientes de condiciones *in vitro* y de invernadero, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre los tratamientos o condiciones de cultivo en que se desarrollaron los estolones para ambas fuentes de regeneración de plántulas (tabla II). El efecto del tratamiento o medio de cultivo en la longitud del tallo fue muy similar entre los estolones regenerados de plántulas provenientes de condiciones *in vitro* o de invernadero, sin embargo, se detectaron diferencias entre tratamientos para una procedencia dada (figura 3).

Para los estolones regenerados de plantas en condiciones *in vitro*, la prueba de comparación de medias (tabla III) reveló que la longitud del tallo del tratamiento 4 ( $5.74 \pm 1.22$  cm) fue significativamente superior ( $p \leq 0.05$ ) que la del tratamiento 11 ( $0.74 \pm 0.28$  cm). Similarmente, para los estolones regenerados de plantas provenientes de invernadero, se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la longitud del tallo, donde el valor más alto fue registrado en el tratamiento 4 ( $5.72 \pm 1.41$  cm); en cambio, las plántulas del tratamiento 11 ( $0.58 \pm 0.26$  cm) fueron las que mostraron menor desarrollo (tabla IV).

Independientemente de la fuente de regeneración de estolones, los valores de la longitud del tallo en el resto de los tratamientos se encontraron entre los valores anteriormente descritos (tablas III y IV). Es importante hacer notar que, aun cuando se observaron diferencias significativas en el desarrollo de las plántulas por efecto de la composición del medio, no se logró inducir la formación de estolones en ninguno de los tratamientos.

Tabla II. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para detectar diferencias entre tratamientos en la longitud del tallo de plántulas de papa regeneradas, a partir de estolones provenientes de condiciones *in vitro* y de invernadero.

Estadístico	Fuente de regeneración de plántulas	
	<i>in vitro</i>	invernadero
	53.464	48.612
Grados de libertad	11	11
Valor de <i>p</i>	<0.001	<0.001

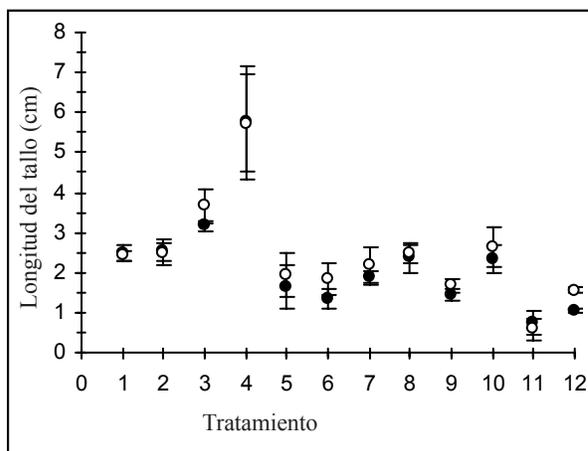


Fig. 3. Efecto del medio cultivo (tratamiento) en la longitud del tallo de estolones regenerados de plantas provenientes de condiciones *in vitro* (●) o de invernadero (○). Las especificaciones de cada tratamiento están descritas en la tabla I. Cada valor representa la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=5$ ).

### Tubérculos

Con la finalidad de documentar si las dimensiones de los tubérculos no se alteran, si se usan plántulas regeneradas *in vitro* (figura 4), éstos se sembraron en bolsas de polietileno (40 cm x 40 cm) con una mezcla de peat-moss y agrolita (1:1; p/p) como sustrato, y se mantuvieron en invernadero hasta com-



Fig. 4. Minitubérculos obtenidos a partir de plántulas *in vitro* provenientes de plantas de invernadero.



Fig. 5. Minitubérculos obtenidos a partir de plántulas *in vitro* con raíz desarrollada.

Tabla III. Significancia y valores  $p$  de la comparación de medias entre tratamientos (prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney) para la longitud del tallo de plántulas de papa regeneradas a partir de estolones provenientes de plantas *in vitro*. Los valores de la media y mediana para cada tratamiento están especificados en paréntesis. El nivel de significancia de la comparación de medias entre tratamientos, representados en la parte superior de la línea diagonal con doble asterisco (\*\*), un asterisco (\*) y ns (no significativo) se denotan para un nivel de probabilidad de  $p \leq 0.01$ ,  $p \leq 0.05$  y  $p > 0.05$ , respectivamente. El valor  $p$  calculado de la comparación de medias entre tratamientos está denotado por debajo de la línea diagonal.

Tratamiento (Media, mediana)	Tratamiento											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 (2.48, 2.40)		ns	**	**	*	**	**	ns	**	ns	**	**
2 (2.52, 2.40)	0.547		**	**	**	**	**	ns	**	ns	**	**
3 (3.16, 3.10)	0.007	0.008		**	**	**	**	**	**	**	**	**
4 (5.74, 5.80)	0.008	0.008	0.008		**	**	**	**	**	**	**	**
5 (1.64, 1.60)	0.016	0.008	0.008	0.008		ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
6 (1.34, 1.30)	0.008	0.008	0.008	0.008	0.548		**	**	ns	**	*	ns
7 (1.88, 2.00)	0.008	0.008	0.008	0.008	0.690	0.008		*	*	ns	**	**
8 (2.38, 2.30)	0.548	0.421	0.008	0.008	0.095	0.008	0.016		**	ns	**	**
9 (1.46, 1.40)	0.008	0.008	0.008	0.008	0.841	0.421	0.016	0.008		**	**	**
10 (2.32, 2.30)	0.421	0.310	0.008	0.008	0.095	0.008	0.056	0.690	0.008		**	**
11 (0.74, 0.80)	0.008	0.008	0.008	0.008	0.016	0.016	0.008	0.008	0.008	0.008		ns
12 (1.04, 1.00)	0.008	0.008	0.008	0.008	0.056	0.056	0.008	0.008	0.008	0.008	0.056	

Tabla IV. Significancia y valores  $p$  de la comparación de medias entre tratamientos (prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney) para la longitud del tallo de plántulas de papa regeneradas a partir de estolones provenientes de plantas de invernadero. Los valores de la media y mediana para cada tratamiento están especificados en paréntesis. El nivel de significancia de la comparación de medias entre tratamientos, representados en la parte superior de la línea diagonal con doble asterisco (\*\*), un asterisco (\*) y ns (no significativo) se denotan para un nivel de probabilidad de  $p \leq 0.01$ ,  $p \leq 0.05$  y  $p > 0.05$ , respectivamente. El valor  $p$  calculado de la comparación de medias entre tratamientos está denotado por debajo de la línea diagonal.

Tratamiento (Media, mediana)	Tratamiento											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 (2.42, 2.50)		ns	**	**	ns	*	ns	ns	**	ns	**	**
2 (2.50, 2.45)	0.730		*	*	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	*
3 (3.66, 3.80)	0.008	0.016		**	**	**	**	**	**	ns	**	**
4 (5.72, 5.30)	0.008	0.016	0.008		**	**	**	**	**	**	**	**
5 (1.94, 1.80)	0.151	0.190	0.008	0.008		ns	ns	ns	ns	ns	**	ns
6 (1.84, 1.90)	0.016	0.063	0.008	0.008	0.841		ns	*	ns	*	**	ns
7 (2.20, 2.00)	0.151	0.190	0.008	0.008	0.421	0.151		ns	**	ns	**	**
8 (2.46, 2.40)	1.000	0.905	0.008	0.008	0.151	0.032	0.151		**	ns	**	**
9 (1.68, 1.70)	0.008	0.016	0.008	0.008	0.421	0.421	0.008	0.008		**	**	ns
10 (2.64, 2.90)	0.421	0.413	0.016	0.008	0.056	0.032	0.310	0.421	0.008		**	**
11 (0.58, 0.50)	0.008	0.016	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008		**
12 (1.56, 1.50)	0.008	0.016	0.008	0.008	0.151	0.151	0.008	0.008	0.310	0.008	0.008	

pletar su ciclo. Las condiciones de manejo fueron idénticas a las descritas previamente.

Los resultados indicaron que las dimensiones de los tubérculos desarrollados fluctuaron entre 2 y 4 cm y con raíz bien desarrollada (figura 5).

En resumen, el mejor desarrollo se observó en

plántulas mantenidas en el medio de cultivo MS con 3% de sacarosa, con 100% de la concentración normal de nitratos y sin GA<sub>3</sub>; mientras que para la inducción de microtubérculos el mejor tratamiento fue el medio MS con 8% de sacarosa y 1/10 de la concentración normal de nitratos y sin GA<sub>3</sub>.

## Electroforesis SDS-PAGE

El análisis de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE de extractos crudos de minitubérculos de diferentes estadios de desarrollo permitió dar seguimiento a los cambios ocurridos, tanto en la clase de proteínas como en la abundancia relativa de las proteínas de interés durante la inhibición del desarrollo de un tallo aéreo y la concomitante inducción de la formación de un minitubérculo sésil a partir de un meristemo lateral. En la figura 6 se observan las diferencias, tanto en la abundancia relativa como en la clase de péptidos encontrados en tubérculos y plántulas. En minitubérculos frescos (N3) se logró identificar un polipéptido entre 40 y 45 kDa que coincide con la masa molecular de la patatina, proteína característica de los tubérculos; su abundancia relativa (puede representar hasta el 50% de la proteína total en tubérculo) así como la masa molecular, sugieren que se trata de la patatina. La concentración de este polipéptido durante el desarrollo del tubérculo cambia, de tal forma que en estolón (N1) apenas si es perceptible. En el microtubérculo (N2) este polipéptido se hace más aparente, mientras que en el minitubérculo el polipéptido es más abundante. Sin embargo, su concentración disminuyó cuando el minitubérculo se almacenó durante dos meses. Cuando los meristemos de esquejes de plantas de papa se siembran en medio de condiciones de luz, acumula grandes concentraciones de los dos polipéptidos de rubisco, como lo indica el control (Rb), la LS de 50 kDa y la SS de 14 kDa. Tanto en plántulas *in vitro* (N4) como en plantas de invernadero (NS), se observan claramente estas dos bandas. Además, de las diferencias encontradas en rubisco y patatina, características de tejido fotosintético y órgano de almacenamiento, respectivamente, también se encontraron diferencias en polipéptidos de masas moleculares pequeñas (de 14 a 35 kDa). Es importante hacer notar que en estolones se detectan los polipéptidos tanto de patatina como los de rubisco, lo que explica en parte los resultados reportados *in vitro*: el potencial de los estolones de formar tanto plántulas como microtubérculos.

## Western blot

Como una forma de comprobar la presencia de proteínas en los estadios de desarrollo e inducción o como un control para monitorear la morfogénesis de la planta de papa, se empleó la técnica de Wes-

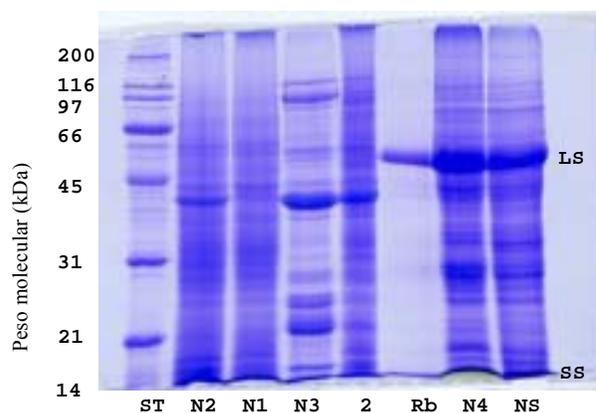


Fig. 6. Electroforesis SDS-PAGE. Gel teñido con azul de coomassie. Las muestras consisten en extractos crudos de diversos tejidos de papa. Estándares de peso molecular, ST; estolón, N1; microtubérculo, N2; minitubérculo fresco de 5 mm, N3; minitubérculo con dos meses de almacenamiento, 2; rubisco, Rb; plántula *in vitro*, N4; planta crecida y desarrollada en suelo, NS; LS (55 kDa) y SS (14 kDa).

tern Blot. Como se puede observar en la figura 7, se demuestra la presencia de proteínas entre los 18.1 y 18.4 kDa en estructuras bien formadas, como el caso de minitubérculo recién cosechado o minitubérculo brotado (carril 4) y minitubérculo almacenado por espacio de un mes (carril 5); lo cual señala que existen actividades bioquímicas y fisiológicas para inducir o dejar de inducir la formación de estructuras, que como en el caso de los minitubérculos permitirán desarrollar otras plántulas, y que en la muestra de estolón (carriles 1 y 2) no se encuentra presente, y ligeramente marcado en el minitubérculo recién cosechado (carril 3).

## Discusión

### Plántulas

Como se observó, la propagación de las plantas de papa se logró usando esquejes de tallo con yemas, en medio MS con sacarosa al 3%, 100% de la concentración normal de nitratos y sin  $AG_3$ . Se ha reportado que el esqueje de tallo de papa puede desarrollar *in vitro* tres estructuras: tubérculos, brotes y estolones; dependiendo de la composición del medio de cultivo, sobre todo de la concentración de sacarosa.<sup>14</sup> En el caso de plántulas regeneradas en condiciones *in vitro*, se observó la formación de tubérculos sésiles, los cuales no se desarrollaron para continuar con la formación de un tallo aéreo, pro-

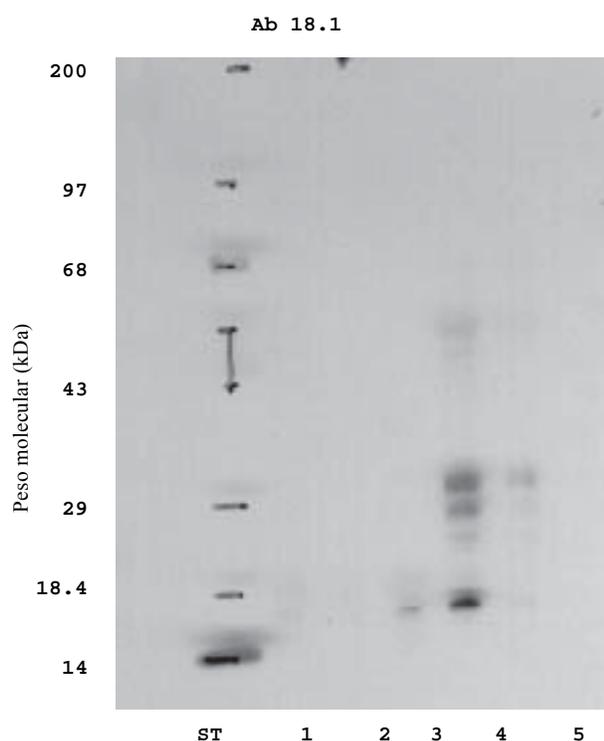


Fig. 7. Radiografía de la proteína 18.1 con el sistema de detección ECL (Amersham Life Science). Anticuerpo, ST; estolón, 1; estolón con inicio de formación de tubérculo en la punta, 2; minitubérculo recién cosechado, 3; minitubérculo brotado, 4; minitubérculo con un mes de almacenamiento, 5.

bablemente debido a niveles endógenos de sacarosa y ácido giberélico. En condiciones de 8% de sacarosa y 1/10 de concentración normal de nitratos en el medio, el estolón se desarrolló hasta formar un microtubérculo, pero cuyo crecimiento se detuvo para dar lugar al desarrollo de un nuevo tallo.<sup>15</sup>

En cuanto a las giberelinas (GA's), Kumar y Wareing (1972), citados por Vreugdenhil y cols., 1998,<sup>14</sup> describieron que la adición de GA's induce a las yemas axilares, más que a los brotes, a desarrollar estolones. Aun bajo concentraciones altas de sacarosa, se ha observado que el estolón no siempre forma un tubérculo.<sup>16</sup> Debido al involucramiento de ciertos genes en la biosíntesis de carbohidratos (Ross y cols., 1994; Visser y cols., 1994, en Vreugdenhil y cols., 1998),<sup>14</sup> se modifica un tanto la respuesta del alargamiento del estolón e inducción de la formación de tubérculos. Por otro lado, la formación de microtubérculos ocurrió a bajas y altas concentraciones de sacarosa y baja concentra-

ción de nitratos, pero en ausencia de GA<sub>3</sub>. Cabe señalar que dicha ausencia de GA<sub>3</sub> no es total, ya que existen bajos niveles o niveles críticos de hormonas endógenas que siempre están presentes y éstas no pueden ser detectadas.<sup>8</sup> El desarrollo de microtubérculos en alta o en baja concentración de sacarosa radica en que la sacarosa actúa como un regulador por la influencia de los niveles endógenos durante la formación de tubérculo.<sup>8</sup> Los minitubérculos obtenidos tanto en plantas *in vitro* como a través de semillas-tubérculo muestran un mismo potencial para generar las diferentes estructuras, es decir, tallos, estolones y tubérculos; esto debido a la suplementación del medio de cultivo con sacarosa, sales, así como GA<sub>3</sub>.

### Proteínas

La rubisco representa el marcador para identificar la presencia de proteínas propias de desarrollo vegetativo aéreo. En los estadios de desarrollo de las partes de los órganos de la planta de papa, se expresan dos proteínas de interés bioquímico y fisiológico: la rubisco y patatina. Esta última es un marcador de la inducción y desarrollo de un tubérculo. La presencia de la banda de patatina es un indicador de la actividad promotora del microtubérculo a partir del estolón. Esto fue lo que se observó en el corrimiento de muestras correspondientes a los microtubérculos (N3 y 2), en los cuales destacan las bandas de patatina y otras proteínas de minitubérculo fresco, las cuales fueron semejantes a las de minitubérculos almacenados por más tiempo. Con la aplicación del Western blot se comprobó la existencia de la glicoproteína bajo las condiciones antes señaladas de desarrollo de los tubérculos.

### Conclusiones

Como se pudo observar con los resultados alcanzados, la obtención de esquejes con yemas a partir de plantas *in vitro* proporciona buen material para generar estolones y alcanzar la tuberización. En cuanto al desarrollo de las plántulas, las obtenidas demostraron respuestas al fotoperiodo y a la concentración de azúcares, a la ausencia de GA<sub>3</sub> y a la concentración de nitratos a 1/10 de la concentración basal. Esto permitió alcanzar la tuberización en el medio de cultivo empleado. Se considera adecuada la cantidad de 8% de sacarosa en el medio de cultivo, ya que es un nivel efectivo para la induc-

ción del tubérculo por los cambios que ocurren en los niveles de GA's durante el desarrollo de estolones y tubérculos, promovidos concomitantemente por las bajas concentraciones de sales a 1/10 de nitratos aquí utilizadas. La interacción entre GA<sub>3</sub> y sacarosa durante el inicio del desarrollo del tubérculo, además de la síntesis de carbohidratos, sugiere la necesidad de un análisis más profundo en todas las etapas de desarrollo del esqueje, estolón y tubérculo. Los niveles de proteína identificados corresponden a la patatina (40 kDa), como resultado de la inducción por el incremento de la sacarosa. Otro efecto de la sacarosa en los esquejes es la formación de raíces, además de ser un regulador osmótico de los niveles endógenos de GA en el desarrollo de los tubérculos. Aparentemente el GA<sub>3</sub> inhibe la tuberización, porque priva la participación de la glicoproteína patatina. El análisis de Western blot comprobó precisamente la presencia de patatina sintetizada en las plántulas (estolón) y tubérculos. Finalmente, queda demostrado que es posible obtener semilla básica de papa mediante el empleo de plántulas *in vitro* en medio de cultivo enriquecido con sacarosa y reducido en nitratos a 1/10 de la concentración original y sin la adición de GA<sub>3</sub>. Es a través de las secciones o esquejes con yemas de las plántulas *in vitro*, como se puede reproducir la planta de papa en medio MS basal con sacarosa del 3 al 8%, con 1/10 de la concentración de sales de nitrato y en ausencia de GA<sub>3</sub>. Es así como se alcanza el desarrollo del estolón y su conversión en un microtubérculo.

## Resumen

El crecimiento poblacional y el incremento en la demanda de vegetales para satisfacer los requerimientos nutrimentales de la propia población son cada vez más altos, tal es el caso de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Al no existir la cantidad de producto con la calidad necesaria para consumo humano e industrial, se hace necesario implementar mecanismos para incrementar la producción. Se realizaron estudios para encontrar el medio de cultivo adecuado para desarrollar la tuberización *in vitro*. Se emplearon esquejes de tallo y estolones de plantas provenientes de invernadero e *in vitro*. Los esquejes se mantuvieron por espacio de 30 días en condiciones de iluminación. Los resultados demostraron que es posible regenerar la planta de papa a partir de estolón, siempre y cuando provenga de

esquejes *in vitro*, puesto que los que provienen de plantas de invernadero mostraron una fuerte tendencia a formar tubérculos, en medio MS con 8% de sacarosa, 1/10 de la concentración normal de nitratos y en ausencia de GA<sub>3</sub>. Los mejores tubérculos obtenidos correspondieron a los tubérculos inducidos bajo iluminación procedentes de plántulas *in vitro*. El análisis electroforético de proteínas por medio de SDS-PAGE mostró la presencia de patatina (40-45 kDa) particularmente en plántulas *in vitro*. Mediante Western blot se logró identificar la presencia de proteínas de aproximadamente 18 kDa, en tubérculos almacenados durante 30 días.

**Palabras clave:** *Solanum tuberosum*, Papa, Estolón, Tuberización, Cultivo *in vitro*, Patatina.

## Abstract

Population growth and the consequent increase in the demand of vegetables to satisfy nutritional requirements are rapidly increasing on a global scale. Such is the case of the potato (*Solanum tuberosum* L.) crop, in which there is not enough supply of this product with the necessary quality for human and industrial consumption. For this reason, it is necessary to increase its productivity. This research was conducted to find out a means for the suitable *in vitro* culture of the plant in order to regenerate the whole plant from stolon cuttings. Single-node cuttings and stolons originating from plants grown in a greenhouse were used for the purpose. The single-node explants were kept under illumination for 30 days. The results showed that it is possible to regenerate the potato plant from stolons, as long as these come from single-node cuttings cultured *in vitro*. This possibility exists due to the fact that those that come from greenhouse plants showed a strong tendency to form tubers when cultured in mediums based on MS added with 8% of sucrose, 1/10 of nitrates, and without GA<sub>3</sub>. The best tubers obtained correspond to those induced under light and formed from *in vitro* cultured plantlets. SDS-PAGE analysis showed the presence of patatin between the 40 and 45 kDa, particularly in *in vitro* plants. Western blot analysis allowed the identification of an 18 kDa protein in tubers stored during thirty days.

**Keywords:** *Solanum tuberosum*, Potato, Stolon, Tuberization, *In vitro* culture, patatin.

## Referencias

1. Santiago Cruz, M.J. y J.A. García Salazar. Situación actual de la agroindustria de la papa en México. *Boletín de la papa* (2000) 2(23):1-17.
2. Santiago Cruz, M.J. y J. Ruvalcaba Limón. Competitividad de los productores en los llanos de Puebla en una economía abierta. En: A. Biarnés, J.Ph. Colin, y M.J. Santiago Cruz. *Agroeconomía de la papa en México*. Orstom /Colegio de Posgraduados (1995) pp. 179-189.
3. Ewing, E.E. y P.F. Wareing. Shoot, stolon, and tuber formation on potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. *Plant Physiology* (1978) 61:348-353.
4. Azpitarte, E.R. Aplicación de la biotecnología a la mejora genética de la patata. En: Pascualena J.R.E. (Ed) 2000. *Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo en Patata*. Patata 2000. 3-6 julio, Vitoria-Gasteiz, España (2000) pp. 17-24.
5. Vreugdenhil, D. y P.C. Struik. An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum* (1989) 75:525-531.
6. Hendrick, T., D. Vreugdenhil y W.J. Stiekema. Patatin and four serine proteinase-inhibitor genes are differentially expressed during potato-tuber development. *Plant Molecular Biology* (1991) 17:385-394.
7. Murashige, T. y F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (1962) 15:473-497.
8. Xu, X., A.A.M. van Lammeren, E. Vermeer, y D. Vreugdenhil. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiology* (1998) 117:575-584.
9. Amersham Life Science. ECL Western blotting protocols. PI/341/95/04. Amersham International plc., Buckinghamshire, England. (1995).
10. Woodson, W.R. y A.K. Handa. Changes in protein patterns *in vivo* protein synthesis during presenescence and senescence of *Hibiscus* petals. *Plant Physiology* (1987) 128:67-75.
11. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* (1970) 227:680-685.
12. Ott, R.L. An introduction to statistical methods and data analysis. 4th Edn., Duxbury Press, Belmont, CA. (1993).
13. Steel, R.G.D. y J.H. Torrie. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2nd Edn., McGraw-Hill Book Company, New York, NY. (1980).
14. Vreugdenhil, D., Y. Boogaard, R.G.F. Visser, y S.M. de Bruijn. Comparison of tuber and shoot formation from *in vitro* cultured potato explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (1998) 53:197-204.
15. Pérez Pacheco, A., N.A. Coria Gil, y J.I. Sarquís Ramírez. Tuberización *in vitro* a partir de esquejes de estolón. XX Congreso de la asociación Latinoamericana de la papa. INIAP. Quito, Ecuador (2002) p 67.
16. Vreugdenhil, D. y L. Helder. Hormonal and metabolic control of tuber formation. In: *Progress in Plant Growth Regulation*. C.M. Karssen, L.V. van Loon, and D. Vreugdenhil (eds). Kluwer Academic Press, Dordrecht (1992) pp 393-400.