



Organogénesis Somática en Papa

***Solanum tuberosum* L. cv.
Andinita a partir de discos
de hojas de plantas
desarrolladas *in vitro***

Por

**Ing° Agr° MSc. José G. Díaz M.
Dra. Norca Mogollón.**



INTRODUCCIÓN

- La papa, *Solanum tuberosum* L. es un cultivo de origen tropical y el cuarto de importancia a nivel mundial, después del arroz, trigo y maíz en cuanto a producción.
- Valor nutritivo: Agua.....77%
Carbohidratos.....18%
Proteínas.....2,5%
Vitaminas.....B6 y C
- Valor calórico: 80 cal / 100 g

(Hawkes, 1978; Mejía, 1987)



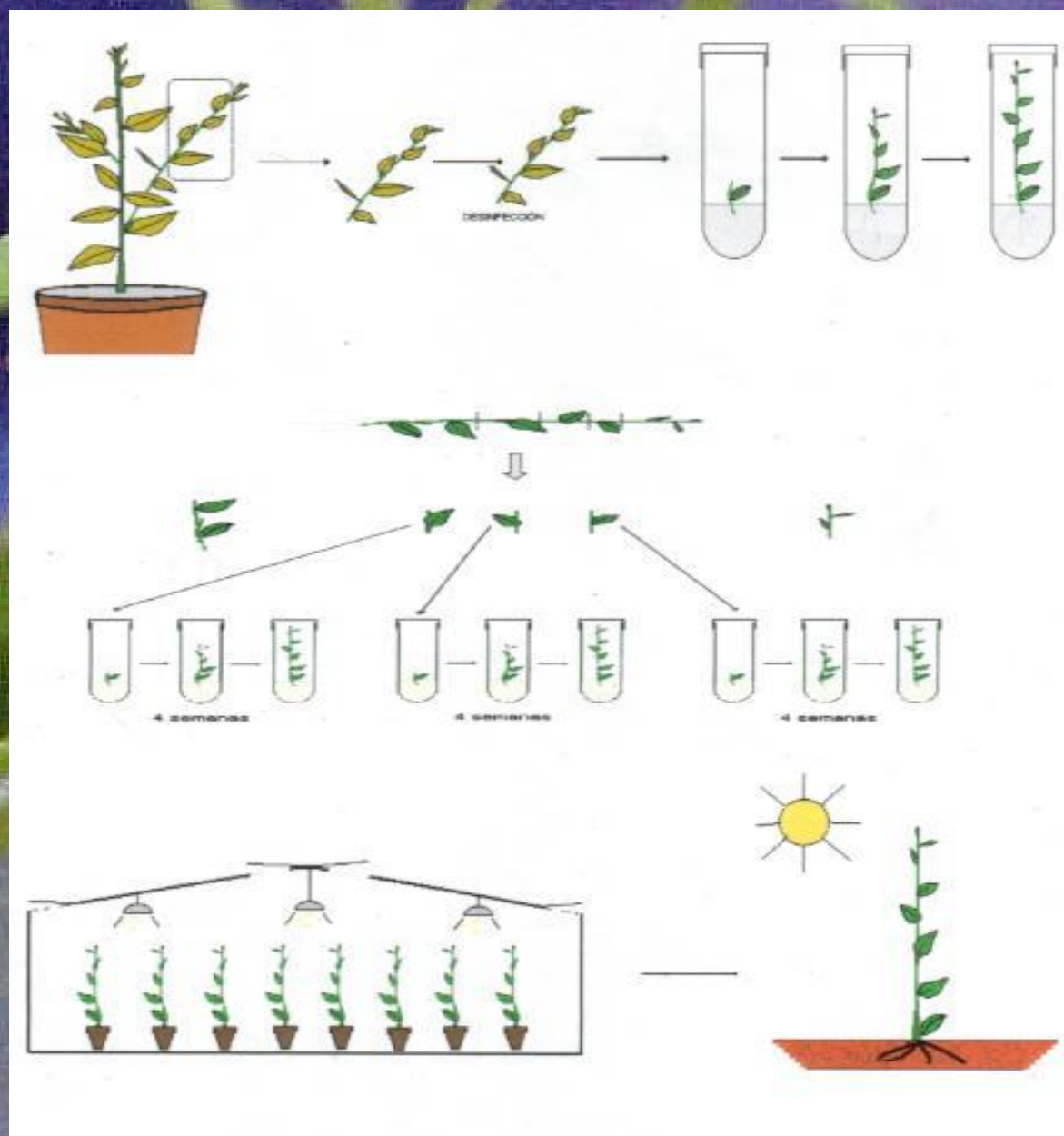
INTRODUCCIÓN

- **Propagación Convencional: Vegetativa**
- **Enfermedades por hongos, bacterias y virus.**
- **Rendimiento y calidad comercial**
- **Distribución internacional de germoplasmas (Mejía, 1987).**



INTRODUCCIÓN

- Propagación por la técnica de cultivo *in vitro*
- La misma consiste en colocar, bajo condiciones asépticas, porciones pequeñas de tejidos u órganos en un recipiente con medio nutritivo para lograr la multiplicación masiva de plantas, con uniformidad genética y completamente sanas.





INTRODUCCIÓN

- ❖ La Organogénesis: es la ruta que siguen las células para manifestar su totipotencia y regenerar plantas completas.
- ❖ Esta vía conduce a la diferenciación de meristemas caulinares y/o radicales que regeneran tallos y raíces adventicias, respectivamente.



INTRODUCCIÓN

- ❖ la Organogénesis implica la formación de estructuras monopolares que establecen conexión vascular con el tejido del que derivan (Segura, 1993).



INTRODUCCIÓN

- El cultivar Andinita, fue saneado en el CIP - Perú y liberado en Venezuela por el INIA – Mérida (FONAIAP). Dicho cultivar se ha convertido en uno de los más importantes para las zonas altas del país, debido a sus atributos de producción y tolerancia a enfermedades (Mogollón *et al.*, 1998).



INTRODUCCIÓN

● OBJETIVO GENERAL

- Propagar clonalmente la papa *Solanum tuberosum* L. cv. Andinita mediante organogénesis somática utilizando discos de hoja de plantas cultivadas *in vitro*.



OBJETIVOS

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Evaluar el efecto de los reguladores de desarrollo tipo auxinas, citocininas y giberelinas en la inducción de callo organogénico.
- ❖ Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la diferenciación y desarrollo brotes adventicios.
- ❖ Determinar el origen histológico de brotes adventicios formados.



MATERIALES Y METODOS

- Laboratorio de cultivo *in vitro* de la Unidad de Biotecnología del Decanato de Agronomía de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" Lara . Venezuela





MATERIALES Y METODOS

- Material en multiplicación de papa *Solanum tuberosum* L. cv. Andinita proveniente del INIA-LARA





MATERIALES Y METODOS

- Multiplicación del material inicial.
- Medio de cultivo: Murashige y Skoog (1962) + 30 mg.L⁻¹ de tiamina, 10 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 1 mg.L⁻¹ de pirodoxina, 2 mg.L⁻¹ de L-glicina y 30 g.L⁻¹ de sacarosa.
- El pH $5,7 \pm 0,1$
- Estado físico: sólido con 8 g.L⁻¹ de agar (Mogollón *et al.*, 1998).



MATERIALES Y METODOS

Condiciones de cultivo:

- Luminosidad: 41,54 $\mu\text{mol.s}^{-1}$
- Fotoperíodo: 16 horas de luz.
- Temperatura de 24 ± 2 °C





MATERIALES Y METODOS

- El proceso de organogénesis somática se llevó a cabo en dos etapas:

a) Inducción de callo

b) Diferenciación y Desarrollo de brotes.



MATERIALES Y METODOS

A. Inducción del Callo Organogénico





MATERIALES Y METODOS

Se utilizó secciones de hojas
(JayaSree *et al.* (2001); Romano *et al.*
(2001) y Seabrook y Douglas (2001)).



MATERIALES Y METODOS

Se probó el efecto de 2,4-D, ANA, AIA, BA (benciladenina), Zeatina (ZA), thidiazuron (TDZ) y el ácido giberélico (AG₃) sobre la inducción de callo organogénico (JayaSree *et al.* (2001); Romano *et al.* (2001) y Seabrook y Douglas (2001))



MATERIALES Y METODOS

T1 = 2,4-D 0,2 + BA 2,5 mg.L⁻¹

T2 = ANA 0,2 + BA 2,5 mg.L⁻¹

T3 = AIA 3,33 + TDZ 0,033 mg.L⁻¹

T4 = AIA 3,33 + BA 0,034 mg.L⁻¹

T5 = ANA 0,2 + BA 2,0 + AG₃ 2,5 mg.L⁻¹

T6 = BA 2,0 + ZA 2,0 + AG₃ 0,1 mg.L⁻¹



MATERIALES Y METODOS

- **Diseño: completamente al azar**
- **Repeticiones: 10**
- **Tratamientos: 6**
- **Unidades experimentales: 60**
- **Variables: masa fresca, diámetro y características cualitativas del callo formado**
- **Duración: 15 días**



MATERIALES Y METODOS

B. Diferenciación y Desarrollo de Brotes



MATERIALES Y METODOS

Los callos provenientes de la fase de inducción fueron transferidos al mismo medio MS, adicionando diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y en las mismas condiciones de crecimiento.



MATERIALES Y METODOS

T1= BA 2,0 + AG₃ 5,0 + ANA 0,2 mg.L⁻¹

T2= ZA 2,6 + AG₃ 0,2 + AIA 0,05 mg.L⁻¹

T3= ZA 5,0 + AG₃ 5,0 mg.L⁻¹

T4= ANA 0,2 + BA 2,0 + AG₃ 2,5 mg.L⁻¹

T5= BA 2,0 + AG₃ 5,0 mg.L⁻¹

T6= BA 2,3 + ZA 2,5 mg.L⁻¹



MATERIALES Y METODOS

- **Diseño: completamente al azar**
- **Repeticiones: 10**
- **Tratamientos: 6**
- **Variables: número de brotes y aspecto del callo formado.**



MATERIALES Y METODOS

- C. Estudio histológico:

Dicho estudio estuvo comprendido desde la inducción del callo organogénico a partir de los discos de hoja hasta el desarrollo completo de los brotes.

En cada fase se tomaron muestras con intervalos de tres a cinco días, dependiendo de la velocidad de desarrollo del callo o de la formación de estructuras organizadas (brotes).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Inducción de Callo





RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Las Auxinas fueron indispensables para la formación de callo

Stamp y Henshaw (1987) en yuca, Xue *et al.*, (1991) en ajo chino, Tianem (1993) y García y Martínez (1995) en papa, Lou y Kako (1994) en pepino, Bockish *et al.* (1997) en ajo, Eady *et al.* (1998) y Zheng *et al.* (1998) en cebolla y Salunkhel *et al.* (1999) vid.

- 2,4-D mejor respuesta que el AIA.

Al parecer existen unas proteínas asociadas con la capacidad de regeneración de células *in vitro* que activan la formación de callo (Saker, 1998).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

García y Martel (1992) encontraron que la presencia de ANA en el medio de regeneración, afectó la formación de brotes en discos de hojas de diversos cultivares en papa.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

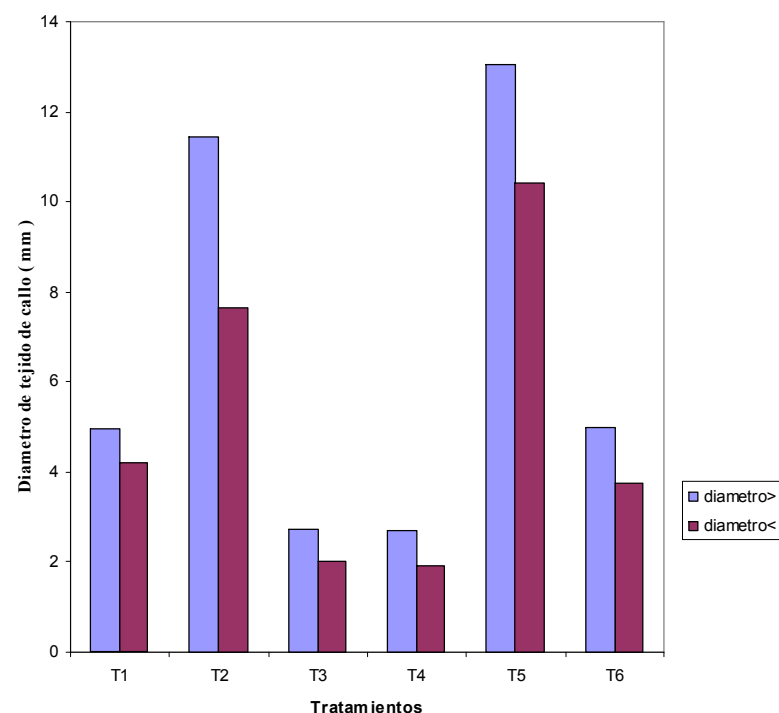
Los resultados de evaluar las diferentes dosis de reguladores de crecimiento sobre la inducción de callo en discos de hoja se presentan en el cuadro 1 y figura 1.



Cuadro 1. Efecto de reguladores de crecimiento sobre la masa fresca y diámetro de callo inducido desde discos de hoja de papa *Solanum tuberosum* L. cv Andinita.

Tratamientos	Masa (g)	Ø mayor (mm)	Ø menor (mm)
T1 = 0,2 mg.L-1 de 2,4 - D + 2,5 mg.L-1 de BA	0.05 c	4.9 c	4.2 c
T2 = 0,2 mg.L-1 de ANA + 2,5 mg.L-1 de BA	0.16 b	11.5 b	7.6 b
T3 = 3.33 mg.L-1 de AIA + 0,033 mg.L-1 de TDZ	0.02d	2.7 d	2.0 d
T4 = 3,33 mg.L-1 de AIA + 0,034 mg.L-1 de BA	0.02 d	2.7 d	1.2 d
T5 = 0,2 mg.L-1 de ANA + 2,0 mg.L-1 de BA + 5,0 mg.L-1 de AG3	0.23 a	13.1 a	10.4 a
T6 = 2,0 mg.L-1 de BA + 2,0 mg.L-1 de Zeatina + 0,1 mg.L-1 de AG3	0.04 c	5.0 c	3.8 c

Figura 1. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el diámetro de callo en la fase de inducción en discos de hoja de vitroplanta de papa *Solanum tuberosum* cv. Andinita.



T1 = 2,4-D 0,2 + BA 2,5 mg.L⁻¹

T2 = ANA 0,2 + BA 2,5 mg.L⁻¹

T3 = AIA 3,33 + TDZ 0,033 mg.L⁻¹

T4 = AIA 3,33 + BA 0,034 mg.L⁻¹

T5 = ANA 0,2 + BA 2,0 + AGe₃ 2,5 mg.L⁻¹

T6 = BA 2,0 + ZA 2,0 + AGe₃ 0,1 mg.L⁻¹

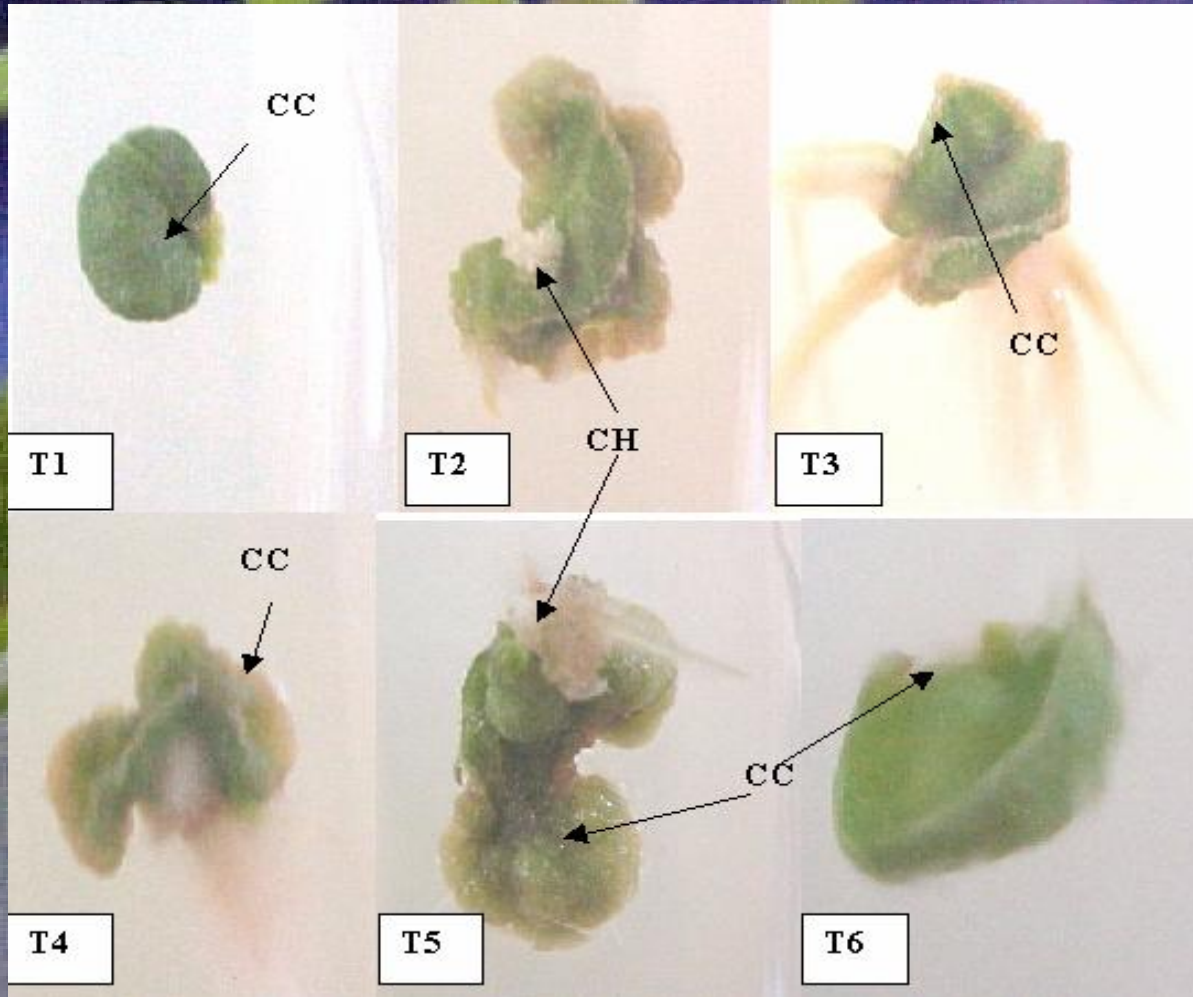


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- La combinación ANA – BA de JayaSree *et al.* (2001), en el tratamiento T2 y la combinación ANA – BA - AG₃ de Romano *et al.* (2001), en el tratamiento T5, produjeron un callo harinoso y friable, contrario al callo formado en el resto de los tratamientos que fue compacto (callo organogénico).



Figura 2. Fase de inducción de calo desde discos de hojas de papa *Solanum tuberosum* L. cv. Andinita. En la figura se muestra el calo compacto (CC) de donde se originan los brotes respectivamente a los 15 días de cultivo.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN

B. Diferenciación y Desarrollo de Brotes





RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento en la fase de diferenciación y desarrollo de brotes

El cuadro 2 muestra los resultados de evaluar las diferentes combinaciones de reguladores de desarrollo sobre la diferenciación y desarrollo de brotes (figuras 3, 4 y 5).



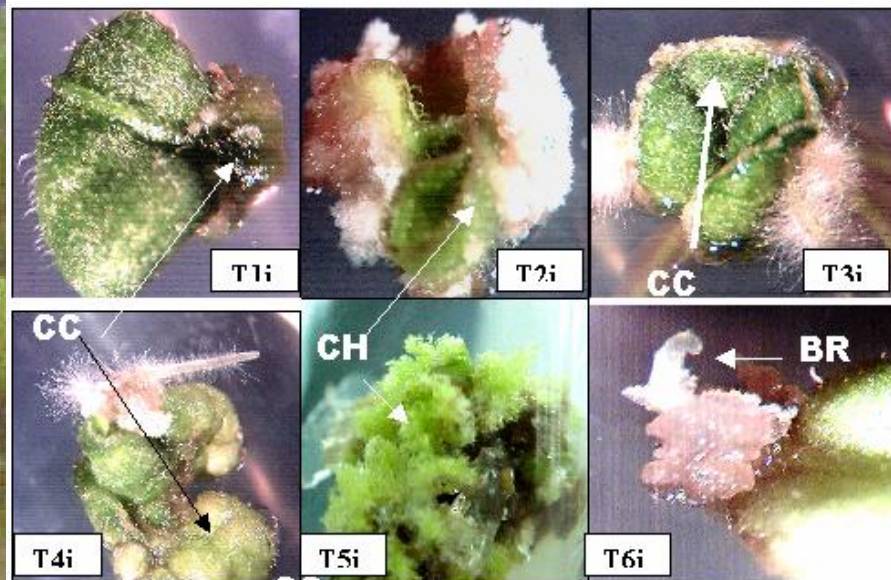
Cuadro 2. Efecto de reguladores de crecimiento sobre el desarrollo de brotes del callo inducido desde discos de hoja de papa *Solanum tuberosum* L. cv Andinita.

Tratamientos(mg.L ⁻¹)	Masa fresca (g)	# de brotes
T1= 2,0 BA + 5,0 de AG ₃ + 0,2 ANA	1,21 a	10,2 a
T2= 2,6 de ZA + 0,2 AG ₃ + 0,05 AIA	1,10 ab	9,1 a
T3= 5,0 ZA + 5,0 AG ₃	0,73 c	1,7 c
T4= 0,2 ANA + 2,0 BA + 2,5 AG ₃	1,02 b	1,1 c
T5= 2,0 BA + 5,0 AG ₃	1,05 ab	2,1 c
T6= 2,3 BA + 2,5 ZA	1,16 ab	5,7 b



Figura 3. Organogénesis en callos formados de discos de hoja de papa *Solanum tuberosum* L. cv. Andinita. Callo compacto (CC) y el callo harinoso (CH). Desarrollo de brotes (BR) desde callo compacto.

INDUCCIÓN DE CALLO



DIFERENCIACIÓN Y DESARROLLO

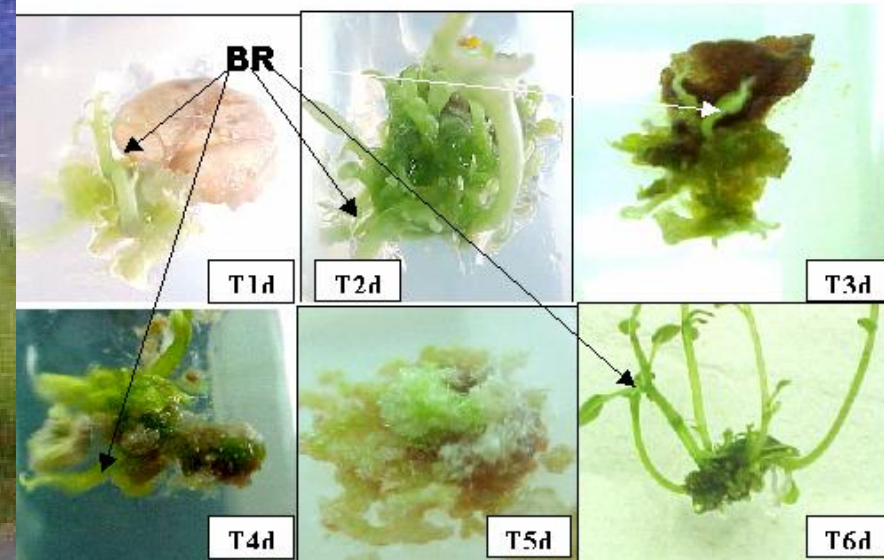




Figura 4. Inducción de callo organogénico desde discos de hojas de vitroplantas de papa *Solanum tuberosum* L. cv. Andinita. A disco de hoja cultivado con inicios de formación de callo B y C callo harinoso (CH), desde el disco de hoja (DH). Además se observa también el callo compacto (CC).

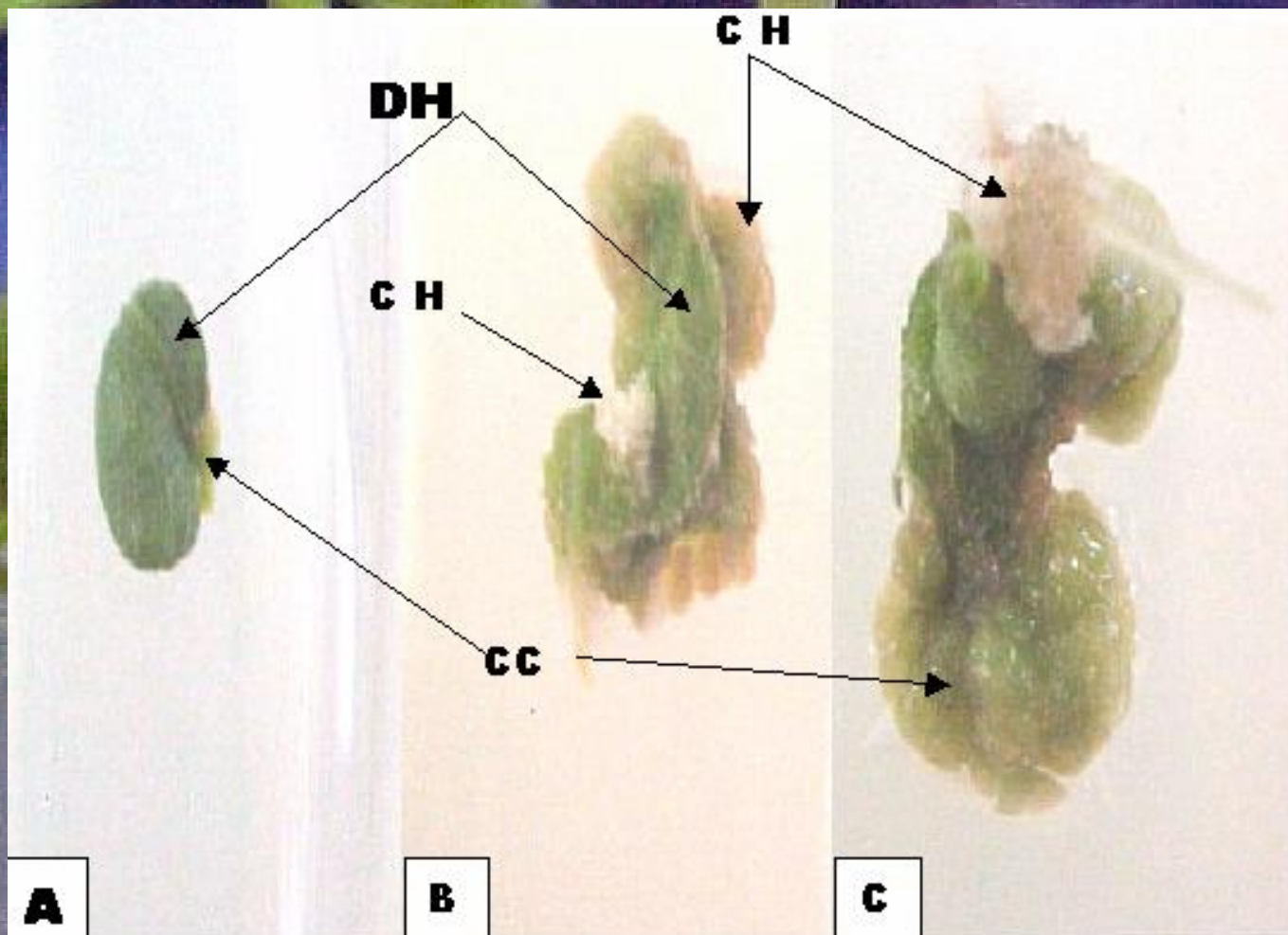
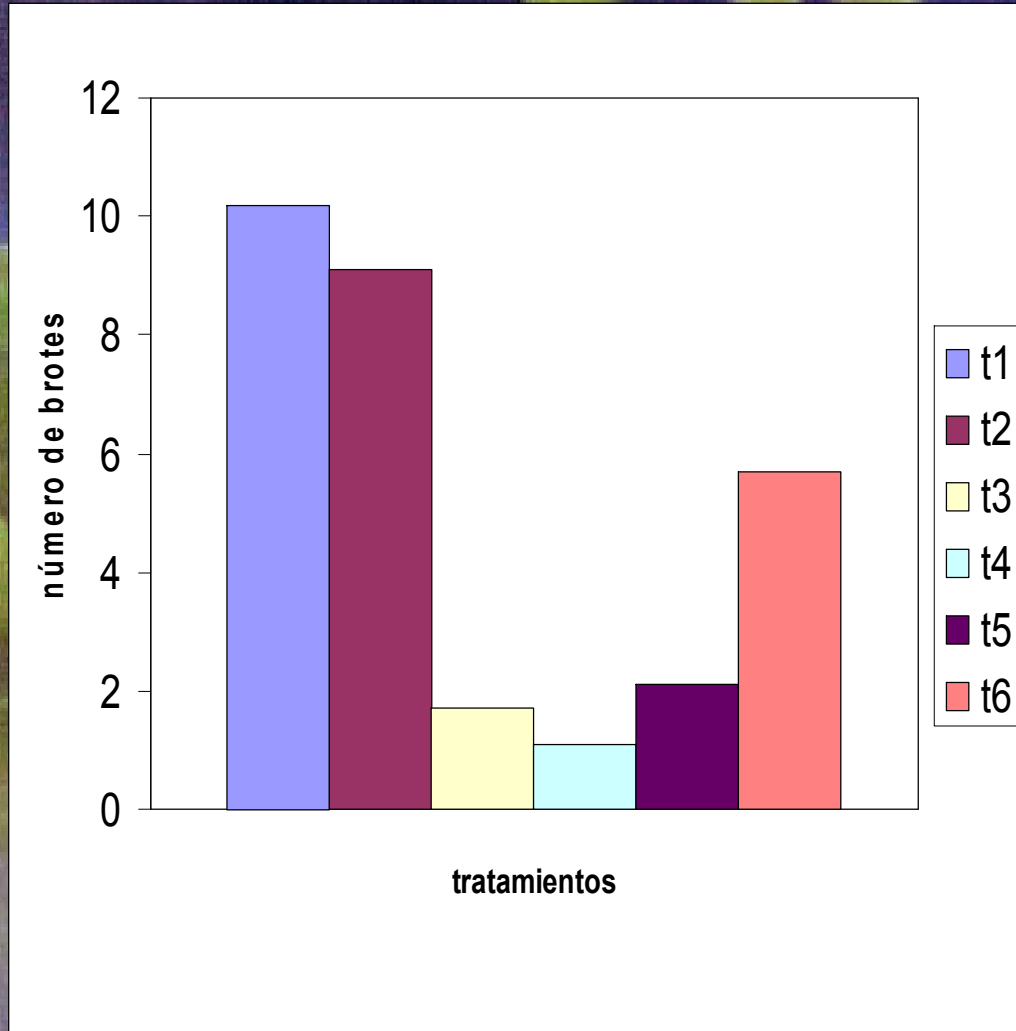




Figura 5. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la formación de brotes en la fase diferenciación y desarrollo de callos generados desde discos de hoja de papa *Solanum tuberosum* L. cv. Andinita.



T1= BA 2,0 + AG₃ 5,0 + ANA 0,2 mg.L⁻¹

T2= ZA 2,6 + AG₃ 0,2 + AIA 0,05 mg.L⁻¹

T3= ZA 5,0 + AG₃ 5,0 mg.L⁻¹

T4= ANA 0,2 + BA 2,0 + AG₃ 2,5 mg.L⁻¹

T5= BA 2,0 + AG₃ 5,0 mg.L⁻¹

T6= BA 2,3 + ZA 2,5 mg.L⁻¹



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Romano *et al.* (2001) y Seabrook y Douglas (2001), quienes lograron inducir embriogénesis somática en papa desde diferentes tipos de explantes.

- La eficiencia de producción de brotes en tiempo, fue superior a la lograda por García y Martínez (1992), quienes lograron embriogénesis pero después de tres meses de evaluación, en este caso a los 21 días de cultivo se logró la regeneración de brotes.



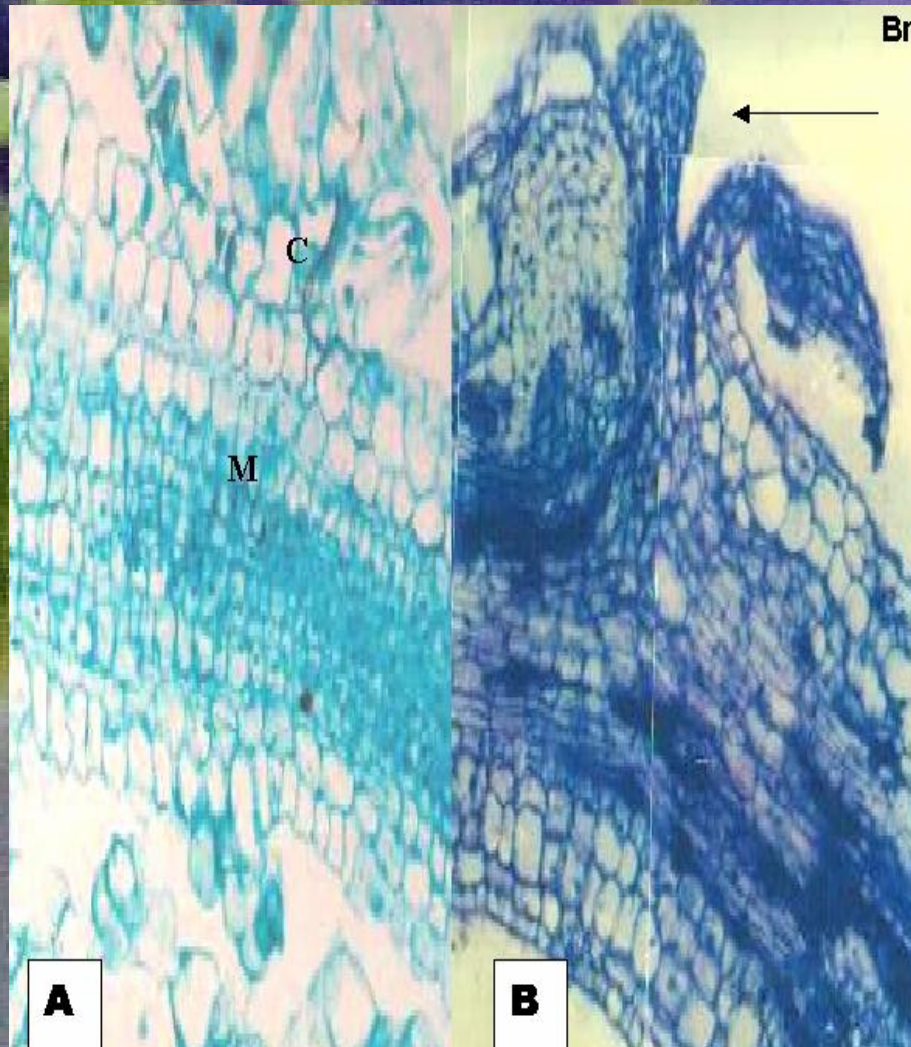
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio Histológico

- Mediante el estudio histológico del tejido de callo formado a partir del cultivo de discos de hoja se logró determinar el origen de dicho tejido.
- El origen de los brotes a partir del mismo tejido formado de los discos de hoja, se tomó de la secuencia de callos formados en las dos fases (figura 6).



Figura 6. A Tejido del mesófilo (M) del disco de hoja a partir del cual se formó el callo (C). B. Brote en formación (Br).





RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación los brotes, estos se originaron del tejido de callo compacto formados desde los discos de hoja, tal como lo reportado por García y Martel (1992) en el mismo cultivo, cuando lograron brotes desde disco de tubérculos (figura 7).

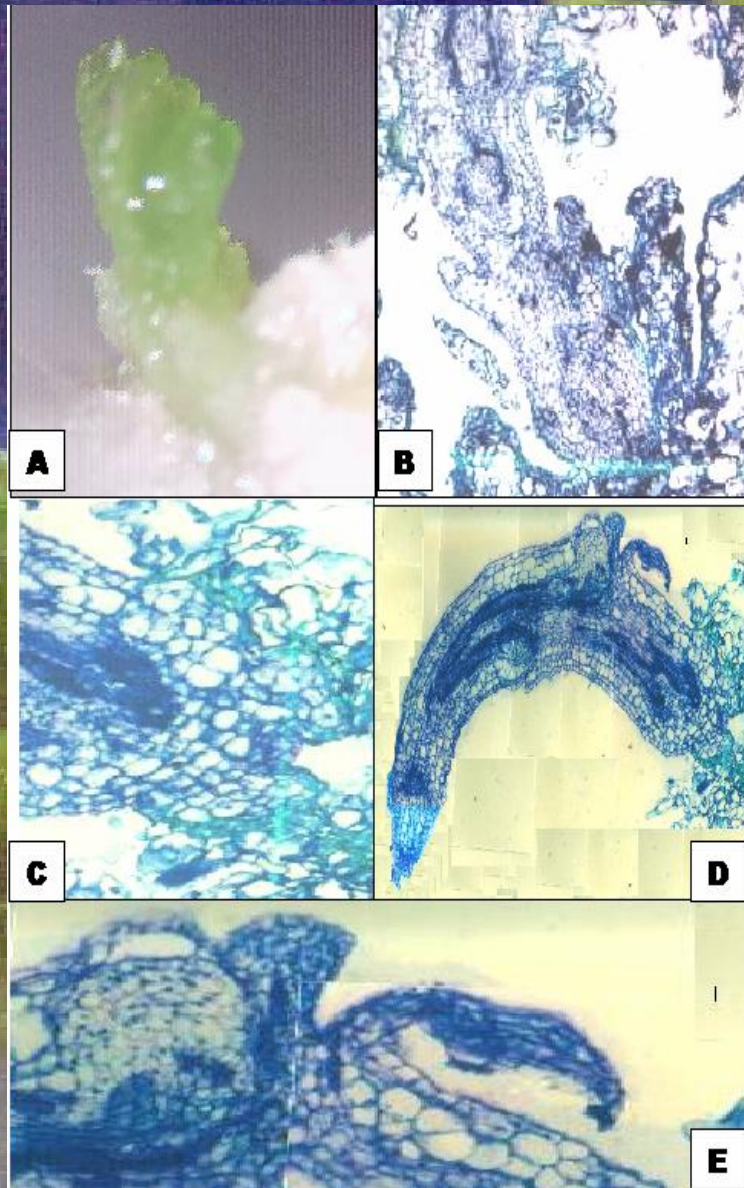


Figura 7. Formación de brotes a partir de callo cultivado en MS + 0,5 mg.L⁻¹ de BA. A muestra el brote emergiendo del callo. B Corte longitudinal donde se observa el brote emergido del tejido de callo. C Detalle desde donde se origina el brote. D desarrollo de un brote y E detalle de la emergencia del mismo.



CONCLUSIONES

- ❖ En base a los resultados obtenidos en esta investigación se puede afirmar que es posible la micropropagación de *Solanum tuberosum* L. cv. Andinita por la vía de organogénesis somática a partir de discos de hojas de plantas cultivadas *in vitro*.



CONCLUSIONES

- ❖ A partir de los discos de hojas se formaron dos tipos de callo: uno harinoso y otro compacto que originó brotes.



CONCLUSIONES

- ❖ La formación de callo organogénico se logró con 2 mg.L^{-1} de ANA, mientras que la formación de brotes se logró en dos medios de cultivos, MS con $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ZA más 5 mg.L^{-1} de AG_3 y MS con 2 mg.L^{-1} de BA más 5 mg.L^{-1} de AG_3 más $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA.



CONCLUSIONES

- ❖ El tejido de callo se originó del mesófilo del disco de hoja, del cual se diferenciaron los embriones y brotes



Gracias