

## SELECCIÓN *IN VITRO* DE CALLOS DE PAPA (*Solanum tuberosum*) VAR. DIACOL CAPIRO EMPLEANDO EL FILTRADO CRUDO DE *Phytophthora infestans* (MONT) DE BARY

### SELECCIÓN *IN VITRO* OF POTATO CALLUS (*Solanum tuberosum*) VAR. DIACOL CAPIRO USING CULTURE FILTRATE OF *Phytophthora infestans* (MONT) DE BARY

Aura I. Urrea<sup>1</sup>, Novisel Veitía<sup>2</sup>, Idalmis Bermúdez<sup>2</sup>

#### Resumen

Se evaluó el efecto del filtrado crudo del hongo *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío de la papa, y la respuesta de resistencia en callos en dos variedades de papa: Diacol Capiro (susceptible) y Diacol Monserrate (con resistencia de campo). También se estandarizaron en estas dos variedades los procesos de inducción, multiplicación de callos y regeneración de vitroplantas a partir de los mismos.

Con la combinación hormonal 2,4D (1 mg/l) y BAP (2 mg/l) se obtuvo la mejor respuesta para inducir la formación de callos a partir de hojas jóvenes en los dos genotipos. La adición de tiosulfato de plata (1.0 mg/l) y ácido cítrico (50 mg/l) fue muy importante para la multiplicación de los callos de la variedad Diacol Capiro, tanto para incrementar el crecimiento como para evitar la muerte del tejido. El porcentaje de regeneración de plantas a partir de los callos fue superior en Diacol Monserrate. Sin embargo, ambas variedades mostraron buena capacidad regenerativa de los callos hasta los cuatro subcultivos evaluados.

La dilución del filtrado crudo (concentrado veinte veces en rotoevaporador) que permitió la diferenciación de las variedades por la respuesta de resistencia a nivel de callos fue una parte del filtrado y cinco de medio de cultivo (1:5).

Con este trabajo se propone un esquema de selección *in vitro* a partir de callos para ser usado en programas de mejoramiento para la resistencia a *Phytophthora infestans*.

*Palabras clave:* *Phytophthora infestans*, tizón tardío, *Solanum tuberosum*, papa, selección *in vitro*, filtrado crudo.

#### Abstract

The effect of the culture filtrate of *Phytophthora infestans* fungus, which is the causal agent of potato late blight, and the resistance response at the callus level of two potatoes varieties, Diacol Capiro (susceptible) and Diacol Monserrate (field resistance), was evaluated.

Which the hormonal combination 2,4D (1 mg/l) and BAP (2 mg/l) was the best to induce callus formation of young leaves for the two genotypes. To the callus multiplication the addition of silver thiosulfate (1.0 mg/l) and citric acid (50 mg/l) was very important in Diacol Capiro to increase the growth and to avoid tissue death.

The percent of the regeneration was higher in Diacol Monserrate but both varieties showed good regenerative capacity in callus with four subcultures.

The dilution of the culture filtrate (twenty times rotoevaporated) that best show the differential response resistance was 1:5. With this work we are presenting a scheme of *in vitro* selection to use in breeding programs to *Phytophthora infestans* resistance.

*Key words:* *Phytophthora infestans*, late blight, *Solanum tuberosum*, potato, *in vitro* selection, culture filtrate.

## INTRODUCCIÓN

Los avances biotecnológicos alcanzados en la última década han comenzado a marcar nuevas

pautas en las investigaciones encaminadas a la búsqueda de nuevas variedades, siendo la resis-

Recibido: agosto de 2000; aprobado para publicación: octubre de 2000.

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, apartado 1226. E-mail: aurea@matematicas.udea.edu.co.

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. E-mail: orellana@ibp.edu.cu.

tencia a plagas y enfermedades el objetivo fundamental de muchos de los programas de mejoramiento genético que se realizan en la actualidad.

Las técnicas de cultivo de tejidos están siendo bastante difundidas para el mejoramiento de plantas y actualmente existen reportes de mutantes de interés obtenidas por esta vía en diferentes cultivos (Van den Bulk, 1991). Las mayores posibilidades de las técnicas biotecnológicas están dadas en la mejora de la resistencia a patógenos que se pueden cultivar *in vitro* y que produzcan toxinas, y que el sistema de regeneración de las plantas a partir de diferentes niveles celulares esté desarrollado. Se han hecho importantes contribuciones al conocimiento del modo de acción de las toxinas (Daud y Briggs, 1983), la respuesta de resistencia y los cambios fisiológicos que ocurren en las células de plantas infectadas por hongos y bacterias patógenas (Miller, 1985, citado por Gómez, 1998).

Para *P. infestans* se han estudiado las propiedades de las toxinas y el filtrado producido en medio líquido y sus efectos sobre tubérculos y hojas, así como en callos, células, protoplastos y microsporas (Dieter, 1986; Wenzel et al., 1987; Mollers et al., 1992; Maximova et al., 1996).

Es muy importante conocer si en una variedad de planta determinada, a diferentes niveles de organización celular, la respuesta a las toxinas o a los metabolitos producidos por el patógeno *in vitro* se correlaciona con la reacción ante la enfermedad de la planta hospedera, para poder establecer protocolos de selección bajo condiciones *in vitro*.

En este trabajo se reporta la respuesta diferencial de resistencia en callos en dos variedades de papa cuando se exponen al filtrado crudo de *P. infestans*. También se describe la regeneración de plantas a partir de los callos seleccionados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron con vitroplantas de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum*

L.) con diferentes grados de resistencia al ataque del hongo *P. infestans*: la variedad Diacol Capiro altamente susceptible y la variedad Diacol Monserate con resistencia parcial (de campo). El material fue donado por el Laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de las Plantas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

### Inducción y multiplicación de callos

Para la formación de callos se utilizaron como explantes hojas jóvenes de vitroplantas en fase de multiplicación con tres o cuatro semanas de cultivo. Se tomaron las hojas del tercio superior de la planta, se les eliminó la base y se pusieron con el envés en contacto con el medio de cultivo. El medio de cultivo basal estaba compuesto por las sales MS complementadas con mio-inositol (100 mg/l), tiamina (0.4 mg/l), pantotenato de calcio (2.0 mg/l), ácido giberélico (0.25 mg/l) y sacarosa (30 g/l). El pH se ajustó a 5.7 antes de esterilizar en autoclave y el medio se solidificó con agar-agar (8 g/l).

A partir de los resultados de ensayos preliminares, en los que la cantidad de callo varió según la concentración de auxina y citoquinina y se obtuvo poca formación de callo cuando se combinaron estos dos reguladores de crecimiento a bajas concentraciones, se evaluaron diferentes concentraciones hormonales, suplementando el medio de cultivo basal en los siguientes tratamientos: 1) 2,4D (1.0, 3.0, 5.0 y 7.0 mg/l); 2) ANA (1.0, 2.0 mg/l) + 6BAP (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l); 3) 2,4D (1.0, 2.0 mg/l) + 6BAP (1.0, 2.0 mg/l); 4) 2,4D (1.0, 2.0, 4.0 mg/l) + kinetina (0.84, 1.7 mg/l); 5) ANA (1.0, 2.0 mg/l) + kinetina (1.0, 2.0, 4.0 mg/l).

Se evaluaron treinta explantes por cada combinación, los cuales se mantuvieron en condiciones de oscuridad y a  $26 \pm 2$  °C de temperatura. Después de veinte días de cultivo se determinó el porcentaje de explantes que formaron callo y se clasificaron de acuerdo con la escala elaborada para este ensayo como resultado de trabajos similares realizados anteriormente y a la cual se hace referencia a continuación: 1) folíolos sanos sin presencia de callo y emisión de raíces; 2) formación de poco

callo tipo brote en la base de la hoja; 3) formación de callo en los bordes de la hoja y emisión de raíces; 4) formación de callo en los bordes del explante y sin raíces; 5) abundante callo en bordes y superficie de la hoja; 6) toda el área foliar cubierta de callo.

Una vez obtenidos los callos, se estudió el efecto del tiosulfato de plata (TSP) y el ácido cítrico en la multiplicación, para lo cual se empleó el medio basal anteriormente descrito suplementado con 2 mg/l 6-bencilaminopurina (BAP), 1 mg/l de 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D), ácido cítrico (50 mg/l) y 1.0 mg/l de tiosulfato de plata ( $\text{AgS}_2\text{O}_4$ ) adicionado después de la esterilización del medio.

La evaluación del crecimiento durante el proceso de multiplicación se realizó a los veinte días de cultivo, utilizando la escala propuesta por Santana (1982). Se evaluaron 100 callos por tratamiento.

### Obtención de los metabolitos tóxicos de *P. infestans*

El aislamiento del hongo correspondiente a la raza de complejidad 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11 donado por el INISAV, fue mantenido en el medio de cultivo V-8 (Jang and Tainter, 1991). El filtrado crudo fue obtenido por el cultivo de dos discos de micelio de 1 cm<sup>2</sup> inoculados en erlenmeyer de 1.000 ml, con 400 ml de medio líquido formado por las sales MS, tiamina 1.0 mg/l, glutamina 400 mg/l, asparagina 400 mg/l y sacarosa 20 g/l, bajo condiciones de oscuridad constante y 20 °C de temperatura.

Después de veinte días de incubación se colectó el micelio formado usando una malla fina. El medio derivado se pasó a través de papel Whatman # 4 para eliminar los restos de micelio. El filtrado se concentró veinte veces por rotoevaporación al vacío a 40 °C. La conservación se realizó a -20 °C en una ultracongeladora Koska modelo UCV-40560.

### Regeneración de plantas

Callos con uno, dos, tres y cuatro subcultivos de multiplicación, fueron transferidos al medio de regeneración utilizado por Veitía *et al.* (1999). El mismo estaba compuesto por las sales MS, vitaminas Heinz, AIA (0.1 mg/l), my-inositol (100 mg/l),  $\text{AG}_3$  (0.5 mg/l), zeatina (2.0 mg/l) y sacarosa 20 g/l.

Los callos se mantuvieron bajo condiciones de luz 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$  y un fotoperiodo de dieciséis horas luz y una temperatura de  $23 \pm 2$  °C. Para cada tratamiento (número de subcultivo) y variedad, se emplearon veinte callos, en los que se determinó el porcentaje de estos que regeneraron a los 80 días de cultivo y el número de vitroplantas por callo.

### Diferenciación varietal de la resistencia a partir de callos

Se estudió el efecto de diferentes diluciones del filtrado de *P. infestans* sobre callos de papa de las variedades en estudio. Las diluciones se prepararon con el filtrado crudo y el medio de formación de callo de cada variedad. En la tabla 1 se especifican las diluciones en cada tratamiento.

Tabla 1. Diluciones empleadas para los estudios a nivel de callo

Tratamiento	Partes de cultivo filtrado	Partes de agua
1	1	1.2
2	1	1.6
3	1	1.8
4	1	3
5	1	4
6	1	5
7	Medio de multiplicación de callos	

Se emplearon 40 callos de un tamaño aproximado de 5 mm por cada tratamiento, poniendo cuatro callos por placa de Petri (7 cm). La evaluación del crecimiento de los callos en el medio selectivo se realizó a los veinte días de cultivo y el porcentaje de mortalidad de los mismos se determinó

de forma visual, comparando con los callos subcultivados en un medio sin el medio derivado del hongo y apoyados en la escala de grados propuesta por Santana (1982).

**Análisis estadístico**

En los experimentos de formación, multiplicación de callos y regeneración de plantas se realizó un análisis de clasificación simple y se analizó la asociación entre categorías de una variable y otra mediante una tabla de contingencia, utilizando la prueba de Chi-cuadrado. En este caso se empleó el paquete estadístico Stat-Xact-4. Para analizar la respuesta de los callos ante el filtrado del hongo el procesamiento estadístico consistió en un análisis de clasificación simple, y para determinar grupos homogéneos y significativamente diferentes se realizó una prueba de rangos múltiples de Duncan.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Inducción y multiplicación de callos**

En este experimento se logró la formación de callos en ambas variedades con los diferentes tratamientos evaluados, excepto cuando se usó 2,4D

como única hormona. En las diferentes relaciones hormonales estudiadas para la formación de los callos, se observó que la kinetina no logró romper el balance hormonal interno en estas variedades cuando se combinó con las auxinas ANA y 2,4D, ya que aunque se logró inducir callos, también se desarrollaron raíces (grado 3 en la escala), las cuales se incrementaban con el aumento en relación auxina /citoquinina (figura 1). El BAP, por el contrario, a una concentración igual a 1mg/l combinado con las diferentes concentraciones de auxinas, indujo la formación de callos sin la presencia de raíces.

Los porcentajes más elevados de explantes que formaron callos en los grados 5 y 6 de la escala se alcanzaron con la combinación de 1.0 mg/l de 2,4D y 2.0 mg/l de 6-BAP para ambas variedades (tablas 2 y 3); no obstante, el tipo de callo formado fue muy característico para cada una de ellas. La variedad Diacol Capiro formó un callo compacto de color blanco-amarillo, mientras que los callos de Diacol Monserrate se caracterizaron por sus estructuras nodulosas parecidas a masas proembriogénicas cuando se observaron al microscopio estereoscópico.

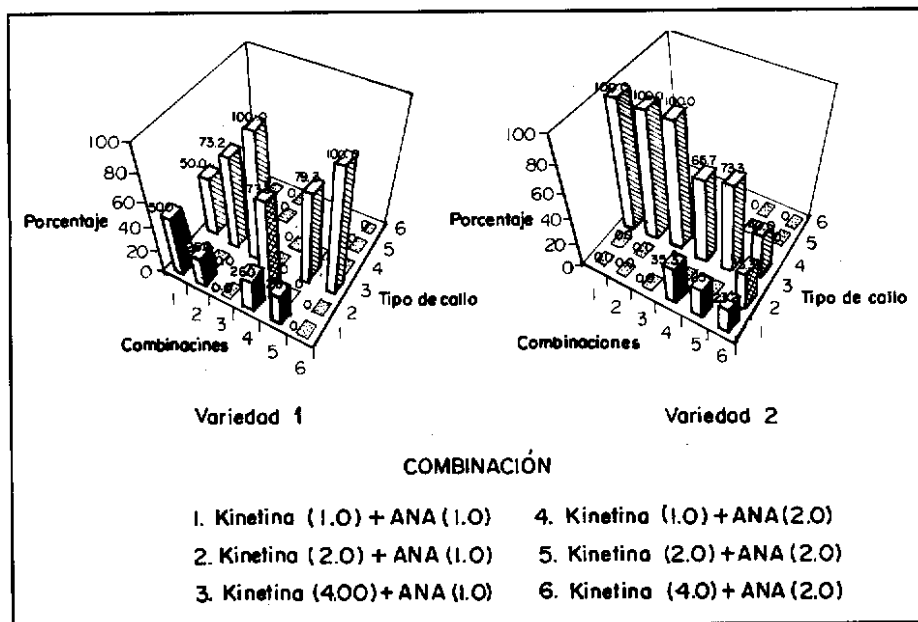


Figura 1. Porcentajes de formación de callo en cada uno de los grados de la escala de evaluación para las diferentes combinaciones de kinetina y ANA

**Tabla 2.** Porcentaje de explantes que formaron callo en la variedad Diacol Capiro, en los grados 4, 5 y 6 de la escala y en función del tratamiento

Tratamientos (mg/l)	Grados de la escala		
	4	5	6
6-BAP(1.0) + 2,4D(1.0)	100%	0.00	0.00
6-BAP(1.0) + 2,4D(2.0)	66.67%	33.33%	0.00
6-BAP(2.0) + 2,4D(1.0)	0.00	23.33%	76.67%
6-BAP(2.0) + 2,4D(2.0)	26.67%	73.33%	0.00

Chi-cuadrado: 101.42 ( $p < 0.0000$ )

Coeficiente de contingencia: 0.7061

Cramer's V: 0.7051

**Tabla 3.** Porcentaje de explantes que formaron callo en la variedad Diacol Monserrate, en los grados 4, 5 y 6 de la escala y en función del tratamiento

Tratamientos (mg/l)	Grados de la escala		
	4	5	6
6-BAP(1.0) + 2,4D(2.0)	70.00%	30.00%	0.00
6-BAP(2.0) + 2,4D(1.0)	0.00	73.33%	26.67%
6-BAP(2.0) + 2,4D(2.0)	0.00	10.00%	0.00

Chi-cuadrado: 52.35 ( $p < 0.0000$ )

Coeficiente de contingencia: 0.6503

Cramer's V: 0.6053

Como plantean Martel y De García (1992), para la inducción de callos en los explantes se requiere una auxina y la más frecuentemente utilizada es el 2,4D a diferentes concentraciones, según el genotipo; sin embargo, en muchos casos se hace necesario la combinación con una citocinina para romper el balance hormonal endógeno y estimular mayor formación de callo como ocurrió en este estudio. Los discos de hoja de los cultivares Diacol Capiro y Diacol Monserrate responden a este patrón de crecimiento.

Estos resultados también coinciden con los descritos en trabajos realizados con otras variedades de papa sobre la formación de diferentes tipos de callo (Freire, 1993; De García y Martínez, 1995; Veitía *et al.*, 1999). En la papa la habilidad del tejido para formar callo y el subsiguiente crecimiento dependen en gran medida de la variedad (Dostal y Skladal, 1982; Wenzler *et al.*, 1989). La morfogénesis *in vitro* está probablemente más

influenciada por el genotipo que por cualquier otro factor. Por tanto, el medio y las condiciones del cultivo necesitan ser variadas frecuentemente de un género a otro o de una especie de planta a otra, e incluso variedades de plantas muy próximas pueden diferir en sus requerimientos de cultivo (George y Sherrington, 1984; Veitía *et al.*, 1999).

### Multiplicación de los callos

Al estudiar en este experimento el efecto del tiosulfato de plata y del ácido cítrico, se encontró que este último compuesto no tuvo efecto positivo sobre el proceso de multiplicación de los callos en las dos variedades de papa estudiadas ya que los valores alcanzados en la escala evaluada fueron similares a los del testigo (medio de inducción). La tabla 4 muestra el número de callos de cada variedad en cada uno de los grados de la escala utilizada para la evaluación en los diferentes tratamientos. Se determinó que Diacol Capiro requiere la adición de tiosulfato de plata para multiplicar por encima del 50% la masa de callo inicialmente formada, contrario a lo que ocurrió en Diacol Monserrate, en el que la adición de TSP inhibió la multiplicación del callo. En esta variedad el uso del medio de inducción (tratamiento A) mostró una mejor respuesta a la multiplicación.

Respecto del uso del tiosulfato de plata, resultados similares fueron reportados por De Block (1988), quien señala el efecto esencial de la adición de  $Ag^+$  sobre la formación de callos en hojas de la variedad Russet Burbank, mientras que en otros cultivares presentaron una reacción menos pronunciada, incluso dañina. En ausencia de  $Ag^+$  se formaba un callo amarillo oscuro no regenerable.

Autores como Mollers *et al.* (1991), Hulme *et al.* (1992) y Rodríguez *et al.* (2000), han recomendado el uso del  $Ag^+$  para variedades de papa en las cuales el exceso de etileno en el cultivo de tejidos es un problema, lo que se caracteriza por la formación de un callo amarillo-necrótico difícil de regenerar brotes, como ocurrió con Capiro. En papa se ha usado  $Ag^+$  para inhibir su acción, adicionándolo al medio de cultivo como  $AgNO_3$

**Tabla 4.** Efecto del ácido cítrico y del tiosulfato de plata en la multiplicación de los callos de las variedades Diacol Capiro y Diacol Monserrate, a los veinte días de cultivo

Escala	Diacol Capiro			Diacol Monserrate		
	Tratamientos			Tratamientos		
	A	B	C	A	B	C
0	75	7	1	7	7	68
1	19	44	5	8	13	24
2	6	49	21	20	13	8
3	0	0	54	44	35	0
4	0	0	19	21	32	0

Chi-cuadrado: 340,17 ( $p < 0.0000$ )

Coefficiente de contingencia: 0.729

Cramer's V: 0.753

Chi-cuadrado: 175.97 ( $p < 0.0000$ )

Coefficiente de contingencia: 0.608

Cramer's V: 0.541

Tratamientos

A. Sales MS + 2,4D + 6 BAP

B. Sales MS + 2,4D + 6 BAP + ácido cítrico (50 mg/l)

C. Sales MS + 2,4D + 6 BAP + TSP (1 mg/l)

o como  $\text{AgS}_2\text{O}_3$  (TSP), tanto en los procesos de regeneración de plantas a partir de callos y protoplastos como durante de la micropropagación.

Se ha comprobado que el ion  $\text{Ag}^+$  bloquea la acción del etileno por ligamiento a sus receptores, y por tanto su efecto puede ser alterado mediante la inhibición de su acción o por su eliminación con absorbentes (Economou, 1991).

### Regeneración de plantas

Se logró regenerar plantas a partir de los callos formados en ambas variedades; sin embargo, los dos genotipos evaluados se obtuvieron porcentajes de regeneración diferentes. La variedad Diacol Capiro presentó porcentajes mayores de 50 en los diferentes subcultivos que fueron menores que los porcentajes de regeneración encontrados en la variedad Diacol Monserrate (tabla 5). No obstante, como puede observarse que en las dos variedades y a través de los diferentes subcultivos de multiplicación, no se presentaron diferencias significativas en los porcentajes de regeneración, lo que significa que el potencial de regeneración se mantuvo hasta el cuarto subcul-

tivo, presentando la variedad Diacol Monserrate los valores más estables.

**Tabla 5.** Porcentajes de callos mayores y menores del 50% que regeneraron vitroplantas en las variedades de Diacol Capiro y Diacol Monserrate durante cuatro subcultivos

Subcultivos	Diacol Capiro		Diacol Monserrate	
	-50%	+50%	-50%	+50%
1	20	80	10	90
2	35	65	5	95
3	30	70	2	98
4	26.32	73.68	5	95

Chi-cuadrado 1.19 ( $p < 0.7553$ )

Coefficiente de contingencia: 0.729

Cramer's V: 0.1218 Cramer's V: 0.

Chi-cuadrado 0.72 ( $p < 0.8683$ )

Coefficiente de contingencia: 0.0945

En cuanto al número de vitroplantas regeneradas por callo, no se encontró interacción con el subcultivo. La diferencia se estableció entre las variedades: la Diacol Capiro presentó valor medio de 11.29 vitroplantas por callo, significativamente diferente del valor encontrado para la variedad Diacol Monserrate de 13.84 vitroplantas por callo.

Las diferencias en la capacidad y modo de regeneración entre las variedades, como lo sugieren Park *et al.* (1995), pueden ser explicadas con base en los niveles endógenos de fitohormonas. Además, la capacidad para formar brotes depende del tipo de callo originado, pues un callo tipo embriogénico tiene ventajas sobre uno no embriogénico.

Los sistemas de regeneración en papa que utilizan tejido foliar como material inicial, en la mayoría de los casos, siguen el método indirecto, en el que el callo producido puede ser inducido a regenerar tallos (Wenzler *et al.*, 1989; Jia *et al.*, 1993; Freire, 1993) o usado para establecer cultivos de células en suspensión para posterior regeneración de plantas (Lillo, 1989; Carrasco *et al.*, 1994). También se ha descrito la regeneración directa de brotes a partir de hojas (Dale, 1995; Rodríguez *et al.*, 2000). La iniciación de

los brotes en los callos está relacionada además con la producción de clorofila (Jarret *et al.*, 1980). Wenzler *et al.* (1989) describen un callo regenerante como compacto, saludable y amarillo-verde.

### Diferenciación varietal de la resistencia a partir de callos

Los resultados mostraron que a este nivel de organización celular la diferenciación de los genotipos se logró comparando tratamientos y variedades entre sí. Se encontró que en las diluciones del filtrado crudo del hongo 1:1.2, 1:1.6 y 1:1.8, la respuesta de los callos en cuanto a la diferenciación fue significativa con respecto a las diluciones 1:3, 1:4 y 1:5 (figura 2). Los porcentajes de supervivencia obtenidos en los callos sometidos a presión de selección fueron significativamente diferentes a los controles, específicamente para Diacol Capiro, aun utilizando la dilución 1:5. A esta concentración se presentó la mayor diferencia de los callos que sobrevivieron entre la variedad susceptible (18%) y la variedad resistente (73%) (tabla 6). Diacol

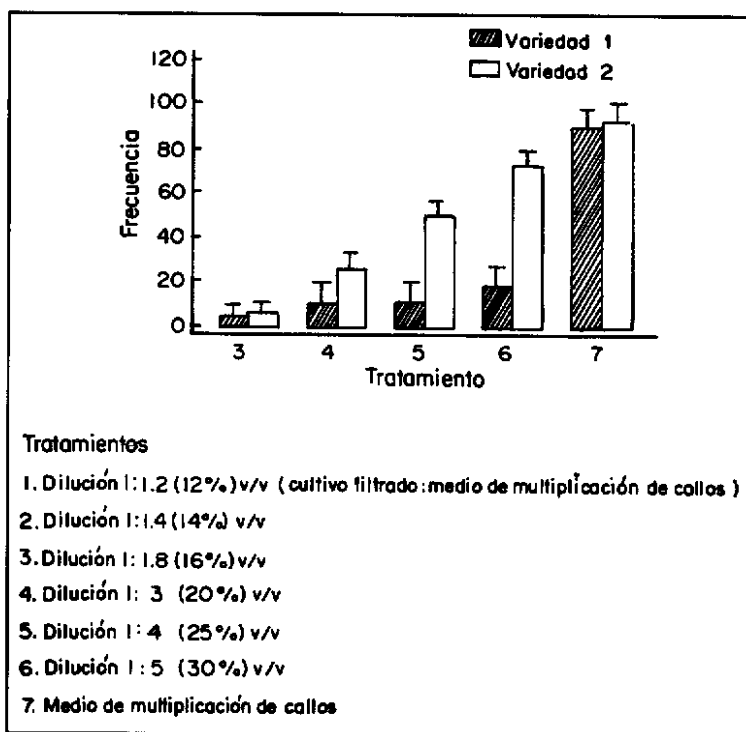
Monserrate mostró valores similares entre los explantes experimentales y los controles, permitiendo diferenciar la variedad susceptible de la resistente.

**Tabla 6.** Porcentajes de supervivencia de los callos de las variedades Diacol Capiro y Diacol Monserrate ante diferentes diluciones del cultivo filtrado del hongo

Dilución	Variedades de papa	
	Diacol Capiro	Diacol Monserrate
1:1.8	4 c	5 e
1:3	10 c	26 d
1:4	11 bc	50 c
1:5	18 b	73 b
Testigo	90 a	93 a
EE:	± 2.62	± 2.16

Valores con letras no comunes en la misma columna difieren para  $p < 0.005$  por la prueba de Duncan

En todos los tratamientos los callos de la variedad susceptible no crecieron sobre el medio que contenía el filtrado del hongo, se oscurecieron y



**Figura 2.** Comportamiento de los callos de papa ante diferentes diluciones del filtrado crudo del hongo *P. infestans*

murieron después de tres semanas de cultivo. Las porciones de callos que sobrevivieron fue posible recuperarlos sobre un medio de regeneración sin el cultivo filtrado. Aunque el porcentaje de callos que sobrevivieron en la dilución 1:5 fue 18% en la variedad susceptible, valor superior al compararlo con porcentajes más confiables de hasta 10%, según lo recomendado por Gómez (1996), esta dilución permitió la mejor diferenciación entre las variedades. Por tanto, la dilución 1:5 influye significativamente en la supervivencia de los callos de la variedad Diacol Capiro, haciendo posible la selección en esta fase del desarrollo celular.

La mayoría de los trabajos de selección con las toxinas de *P. infestans* ha sido realizada en tejido indiferenciado, principalmente en callos (Behnke, 1979; Dieter, 1986) y protoplastos (Wenzel, 1990). Sin embargo, en algunos casos la respuesta *in vitro* no se correspondió con la respuesta de las plantas en el campo (Mollers et al., 1992), lo que acentúa la importancia de los estudios de diferenciación varietal *in vitro* para comprobar la expresión de los genes de resistencia a diferentes niveles de organización celular. La expresión en vitroplantas también ha sido descrita (Urrea et al., 1999).

En general, para la selección de los callos se recomienda realizar varios subcultivos en el medio selectivo, pero teniendo en cuenta las características del callo (ya que dada la susceptibilidad de algunos en dependencia de la variedad), se deben realizar subcultivos intercalados sin agente selectivo en el proceso de selección. El callo de Diacol Capiro es compacto y de crecimiento poco

voluminoso, lo que hace posible una mayor exposición de la superficie callosa con el medio selectivo, mostrando alta susceptibilidad al filtrado crudo del hongo.

Se ha logrado regenerar plantas de papa y tomate a partir de callos, que fueron resistentes al cultivo filtrado de *P. infestans*. Wenzel et al. (1987) regeneraron plantas a partir de protoplastos de papa en presencia de concentraciones selectivas del extracto de *Fusarium sulphureum*. Después de la regeneración, muchos protoclonos no se vieron muy afectados por la toxina en el test de callos o de hojas, al compararlos con los protoclonos regenerados sin presión de selección.

Prácticamente todos los hongos fitopatógenos tienen un grupo de metabolitos que actúan directamente sobre el plasmalema celular. La diferencia fundamental en la capacidad de respuesta al hongo, tanto en variedades resistentes como susceptibles, se presenta en el tiempo requerido para la síntesis de compuestos inhibitorios al hongo como callosa, lignina, fenoles, fitoalexinas, glicoalcaloides, proteínas del patógeno relacionadas e inhibidores de proteínas (Protsenko, 1993 y 1995).

En el presente trabajo los metabolitos fitotóxicos liberados en el filtrado crudo de *P. infestans* permitieron la expresión diferencial de la resistencia a nivel de callos y se logró la regeneración de vitroplantas a partir de éstos, lo que hace posible el empleo de esta metodología de selección *in vitro* en programas de mejoramiento a este patógeno de tan relevante importancia económica en el mundo.

## REFERENCIAS

- Carrasco A, Ruiz de Galarreta JI, Ritter E. 1994. Aislamiento, cultivo y regeneración de plantas a partir de protoplastos en *Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja*. Investigación agraria: producción y protección de vegetales 9(3):347-357.
- De Block M. 1988. Genotype independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Theoret Appl Gen 76:767-774.
- De García E, Martínez S. 1995. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv Desiree from steam nodal sections. J Plant Physiol 45:526-530.
- Dieter R. 1986. Metodologia de seleção *in vitro* para resistência a factores causadores de estresse. Int Congr Plant Tissue Cell-Cult 6 Meet 376:45-47.
- Dostal J, Skladal V. 1982. The biotest for determining the response growth regulating substances as diffusing in the agar culture medium. Ann Res Inst Crop Prod 22:182-194.



- Economou AS.** 1991. Ethylene and shoot formation *in vitro*. *Acta Horticult* 300:35-43.
- Freire M.** 1993. Desarrollo de la embriogénesis somática y la organogénesis en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. var. Desiree). Trabajo de diploma. Curso 92-93, 45 p.
- George EF, Sherrington PD.** 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Eversly, England: Eastern Press, 709 p.
- Gómez KR.** 1998. Selección *in vitro* a enfermedades. En: Pérez JN (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Cuba, Edic. GEO, pp. 327-354.
- Hulme JS, Higgins ES, Shields R.** 1992. An efficient genotype-independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 31:161-167.
- Jang JC, Tainter FH.** 1991. Optimum tissue culture conditions for selection of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in pine callus tissue. *Plant Cell Reports* 9:488-491.
- Jarret RL, Hasegawa PM, Erickson HT.** 1980. Factors affecting shoot initiation from tuber discs of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiol Plant* 47:177-184.
- Jia SR, Xie Y, Tang LX, Cao DS, Zhao YL, Yuan J, Bay YY, Jian ChX, Jaynes JM, Dodds JD.** 1993. Genetics engineering of chinese potato cultivars by introducing antibacterial polypeptide gene. En: You CB, Chen and Ding (eds.). *Biotechnology in Agriculture*. Amsterdam: Klower Academic Publishers, p. 208-212.
- Lillo C.** 1989. Effects of media components and environmental factors on shoot formation from protoplast-derived calli of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 19:103-111.
- Martel A, De García E.** 1992. Formación *in vitro* de brotes adventicios en discos de tubérculo de papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Sebago). *Int J Exper Bot* 53(1):57-64.
- Maximova NI, Matzkyavichune EV, Guzhova NV, Merzlyak MN, Gusev MN.** 1996. Interactions between *Phytophthora infestans* and potato cells during their growth in mixed suspension culture. *Russian J Plant Physiol* 43(2):285-290.
- Mollers C, Zhang JS, Wenzel G.** 1991. The influence of silver thiosulfate on potato protoplast cultures. *Plant Breeding* 108(1):12-18.
- Mollers C, Zitzlsperger J, Wenzel G.** 1992. The effects of a toxin preparation from *Phytophthora infestans* on potato protoplasts and microsporas. *Physiol Mol Plant Pathol* 41:427-435.
- Park YD, Ronis DH, Boe AA, Cheng ZM.** 1995. Plant regeneration from leaf tissue of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Am Potato J* 72:329-335.
- Protsenko MA, Ladyzhenskaya EP, Korableva NP, Voitovich OI, Vassilieva V.** 1994. The late blight fungus *Phytophthora infestans* interferes with the growth regulating system the potato cell. *Acta Phytopathol Entomol Hungarica* 29(1-2):15-22.
- Protsenko MA.** 1995. Molecular mechanisms of recognition at the *Phytophthora infestans* potato cell membrane interface. *Biochemistry* 60(1):39-43.
- Rodríguez E, Trujillo C, Orduz S, Jaramillo S, Hoyos R, Arango R.** 2000. Estandarización de un medio de cultivo adecuado para la regeneración de tallos a partir de hojas, utilizando dos variedades colombianas de papa (*Solanum tuberosum* L.). (En imprenta).
- Santana N.** 1982. Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) *in vitro*. *Cultivos Tropicales*, vol. 4, No. 3.
- Van den Bulk R.** 1991. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding. *Euphytica* 56: 269-285.
- Veitía N, Urrea AI, Gómez R.** 1999. Desarrollo de diferentes medios de cultivo para la formación de callos de papa. *Rev Centro Agrícola* III/99.
- Wenzel G, Debnath SC, Schumann R, Foroughiwehr B.** 1987. Combined applications of classical and unconventional techniques in breeding for disease resistant potatoes. En: Jelling GJ and Richardson DE (eds.). *The production of new potato varieties: technological advances*. Cambridge University Press. p. 305.
- Wenzler H, Mignery G, May G, Park W.** 1989. A rapid and efficient transformation method for the production of large number of transgenic potato plants. *Plant Sci* 63:79-85.