Micropropagación y Regeneración de lulo (*Solanum quitoense*) por organogénesis

Vanesa Segovia[1], Inés Sanchez[2], Alvaro Mejia[1], William M. Roca[1,3] y Zaida Lentini [1]

[1]Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, A.A 6713, Cali Colombia, [2] CORPOICA,
[3]Actualmente CIP

Introducción

El lulo es una solanacea que está cobrando importancia en el mercado nacional. La principal limitante en su cultivo es el ataque de plagas y enfermedades que requieren de costosos agroquímicos para su control. La transformación genética es una herramienta del fitomejoramiento que permite obtener plantas resistentes a plagas y enfermedades, pero en la actualidad no se encuentran reportes de transformación para lulo. El primer paso para desarrollar un protocolo de transformación es tener un método de regeneración establecido y un medio de micropropagación que proporcione clones vigorosos. En la actualidad solo existe una publicación para regeneración de plantas de lulo que se ha mostrado ineficiente en la regeneración de clones *in vitro.*

El objetivo de este trabajo es escoger un medio de propagación para lulo que permita obtener material vigoroso y desarrollar una metodología de regeneración que permita en el futuro transformar plantas de lulo.

Metodología

♠ MICROPROPAGACION

Se trabajó con clones seleccionados por el Centro Frutícola Andino-CEFA de genotipos con espinas (SqE) y sin espinas (Sq) para comparar su respuesta a diferentes medios de propagación reportados para especies de la familia solanacea (Cuadro 1); El reportado para lulo (Hendrix R. et al, 1987), el desarrollado para tomate de árbol (Atkinson R. et al, 1993) y el más utilizado para mantenimiento de bancos de germoplasma en papa (Hussey y Stacey, 1991) denominado como medio A. Adicionalmente se probó una variación del medio 4E (Roca et al, 1984) con la mitad de las sales MS (½ MS). El efecto del intercambio gaseoso fue evaluado colocando un tapón de espumilla en la tapa del tubo de ensayo.

♠ REGENERACION DE PLANTAS

Se evaluó la respuesta de dos genotipos (SqE y Sq) en tres medios de cultivo (Cuadro 2), tomando como testigo el protocolo de regeneración reportado para lulo (Hendrix et al. 1985) y probando la respuesta del tejido a un pretratamiento con el sonicador (450 model, 50 Hz, Branson Ultrasonic Corporation) siendo cultivados en el medio reportado para tomate (*Lycopersicum esculentum*) por Ultzen (1993) y un medio de Hendrix modificado (HM) en sus hormonas y el gelificante (Cuadro 2). Como explantes se utilizaron el pecíolo y la lámina foliar. Adicionalmente se evaluó el efecto del medio de propagación en la regeneración con el mejor medio y el mejor explante.

Cuadro 1. Medios de Micropropagación evaluados en lulo

Compuestos	Hendrix (H)	Atkinson (AT)	1/2MS	A
Sales	MS	MS	½ MS	MS
Vitaminas	MS	B5	-	-
Tiamina (mg/L)	-	-	1	0.5
Inositol (mg/L)	-	-	100	-
Pantotenato de calcio (mg/L)	-	-	-	2.5
Pyridoxina (mg/L)	-	-	-	1
Acido nicotínico (mg/L)	-	-	-	5
Azúcar (g/L)	30	30	20	30
Agar (g/L)	7	8	4.5	-
Gel Rite	-	-	-	3.5
pH	5.7	6.2	5.7	5.9
ANA (mg/L)	0.02	0.1	0.02	-
BAP (mg/L)	0.02	1	0.04	-
GA_3 (mg/L)	-	-	0.05	-

Cuadro 2. Medios de Regeneración evaluados en lulo

Compuestos	Hendrix	HM	Ultzen
Sales	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	B5
Azúcar (g/L)	30	30	10
Glucosa	-	-	10
Agar (g/L)	7	-	3
Gel Rite (g/L)	-	2	1
pH	5.7	5.7	5.7
KIN (mg/L)	5	-	-
AIA (mg/L)	0.01	-	0.02
ANA (mg/L)	-	-	-
BAP (mg/L)	-	2	-
Zeatina (mg/L)	-	-	2

Resultados y Discusión

♠ MICROPROPAGACION

La respuesta de los dos genotipos (Sq y SqE) varió dependiendo de el medio de cultivo utilizado. Las plantas mostraron significativamente hojas más delgadas y cloróticas, además de una escasa emisión de raíces, cuando se cultivaron en los medios y condiciones reportadas por Hendrix y Atkinson, que incluye tubos con cierre hermético (Fig.1.1). En contraste se obtuvieron plantas significativamente mas vigorosas de lámina foliar ancha, hojas color verde intenso y abundante raíz cuando se cultivaron en los medios ½ MS (Fig. 1.2 y 1.3) y A con un tapón de espumilla en la tapa (Fig.1.3). Después de aproximadamente un año (doce subcultivos) las plantas en el medio ½ MS presentaron un efecto de decoloración en las hojas y una lenta emisión de raíces (Fig. 1.2 y 1.3), por lo que se escogió el medio A (Fig. 1.3) y la condición de aireación como la mejor combinación para obtener plántulas vigorosas que toleran el proceso de regeneración.

El intercambio gaseoso favorece el desarrollo de las plántulas de lulo y es un factor que no había sido considerado anteriormente. Con esta metodología se obtienen plantas más eficientes en la fase de endurecimiento en invernadero.

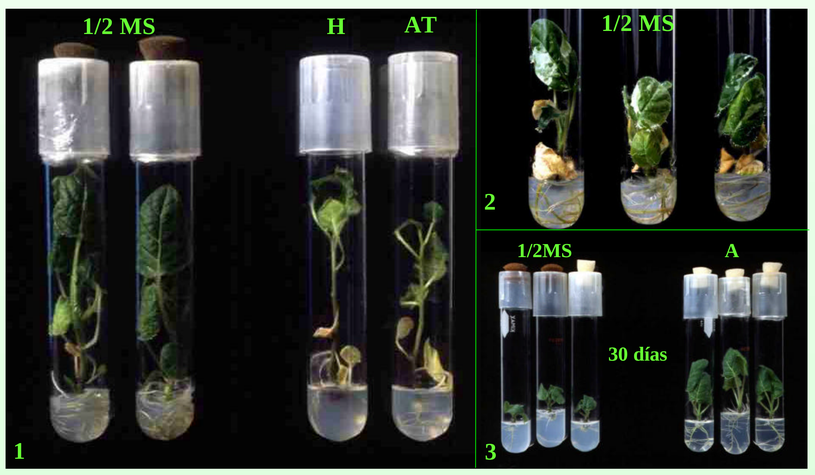
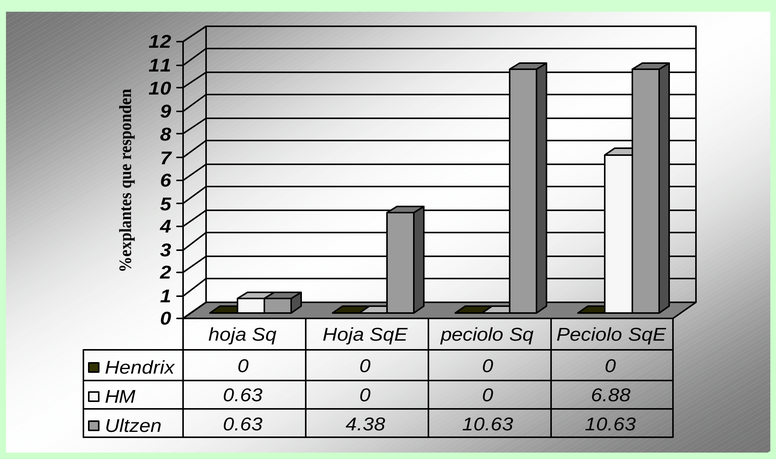


Fig. 1. Respuesta de las plántulas de lulo: **(1)** medios Hendrix (H) y Atkinson (AT) con cierre hermético y ½ MS con espumilla en la tapa. **(2)** Decoloración de las hojas después de doce subcultivos en el medio ½ MS . **(3)** Lento desarrollo de plantas en medio ½ MS comparado con el medio A con espumilla en la tapa.

♠REGENERACION DE PLANTAS

En el medio de cultivo reportado para organogénesis de lulo (Hendrix) no se obtuvo respuesta del tejido, por el contrario los explantes sometidos al sonicador y cultivados en los medios HM y Ultzen presentaron brotes organogénicos en láminas foliares y pecíolos. La respuesta organogénica fue dos veces mayor en el medio Ultzen, el cual mostró regeneración en los dos genotipos y los dos explantes (X^2: 4.9, *p*: 0.27; X^2: 16.0, *p*: 0.001). El pecíolo fue el mejor de los explantes en los dos genotipos, alcanzando un 10.6 % de regeneración a los 55 días de tratamiento (Fig. 2 y Fig. 3.1), comparado con la lámina foliar que obtuvo 0.6% de regeneración para Sq y 4.38% para SqE (Fig. 2 y Fig. 3.2).



	hoja Sq	Hoja SqE	peciolo Sq	Peciolo SqE
Hendrix	0	0	0	0
HM	0.63	0	0	6.88
Ultzen	0.63	4.38	10.63	10.63

Fig. 2. Respuesta organogénica de los dos genotipos (SqE y Sq) en diferentes medios utilizando hojas y pecíolos como explante.

Fig. 3. Brotes regenerados a partir de **(1)** peciolos y **(2)** lámina foliar.

El medio de micropropagación utilizado para desarrollar las plantas donantes de los explantes, afectó su respuesta organogénica. Pecíolos que provenían de plantas micropropagadas en medio A mostraron un mayor porcentaje de regeneración respecto a los provenientes de plantas micropropagadas en medio ½ MS (Fig. 4). Los brotes regenerados fueron subcultivados en el medio A durante 45 días y posteriormente fueron transplantados a suelo en el invernadero donde se desarrollaron saludablemente y similar al material no regenerado y propagado *in vitro* (Fig 5.1), y. posteriormente en el campo (Fig. 5.2) hasta floración y fructificación .Esta metodología es un avance para el desarrollo de un protocolo de transformación genética de lulo.

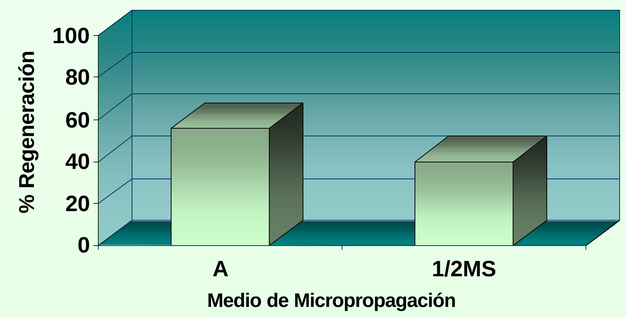


Fig.4 Regeneración en medio Ultzen de pecíolos provenientes de plantas micropropagadas en medios A o ½ MS.

Fig. 5. Plantas regeneradas de lulos con espinas y sin espinas cultivadas en invernadero **(1)** y campo **(2)**

Conclusiones

Se obtuvo una metodología de propagación mejorada, con la que se obtienen plantas vigorosas con buena adaptación en la fase de endurecimiento, por lo que puede ser utilizada en la producción comercial *in vitro* de clones seleccionados y en la propagación masiva de variedades e híbridos. Se desarrolló una metodología reproducible de regeneración de plantas para clones mantenidos *in vitro*, que permite desarrollar un protocolo de transformación. Actualmente, se trabaja en ensayos preliminares para el establecimiento de una metodología de transformación genética de lulo mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Referencias

1. ATKINSON R. and GARDNER R. 1993. Regeneration of trnasgenic tamarillo plants. Plant Cell Reports. 12: 347-351.
2. HENDRIX R., LITZ R. and KIRCHOFF B. 1987. Invitro organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum*, *S. quitoense* (naranjilla) and *S.sessiliflorum*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 11: 67-73. .
3. HUSSEY G. AND STACEY. 1984. Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (Solanum tuberosum L.). Ann. Bot. 53: 565-578.
4. ROCA W. M. (1984). Cassava. In: Handbook of plant Cell Culture, ed W.R. Sharp; D.A. Evans; P.V. Amirato and Y. Yamada, 269-301
5. ULTZEN T., GIELEN J., VENEMA F., WESTERBROEK A., HAAN P., TAN M., SCHRAM A., GRINSVEN M and GOLDBACH R. 1995. Resistance to tomato spotted wilt virus in trnasgenic tomato hybrids. Euphytica. 85: 159-168.