EFECTO DE LAS CITOQUININAS BA Y TDZ EN LA REGENERACIÓN DE BROTES ADVENTICIOS DEL PATRÓN CLONAL 'MARIANA 2624'

L. Pascual
P. Andreu
J.A. Marín
Pomología
Estación Experimental de Aula Dei.
Apartado 202, 50080 Zaragoza.
e-mail: lpascual@eead.csic.es

Introducción

El mayor problema asociado a la regeneración adventicia de todas las especies en general, y de los frutales de hueso en particular, es conseguir un protocolo de regeneración eficiente que sea reproducible. Pero este objetivo, puede no alcanzarse fácilmente si se tiene en cuenta que la complejidad del proceso regenerativo se debe, en parte, al hecho que intervienen múltiples factores (genotipo, origen y edad del explanto, posición del explanto en la planta, balance hormonal exógeno y endógeno, condiciones físicas de crecimiento como luz, temperatura, pH, potencial osmótico, suministro de oxígeno e intercambio de gas, presencia o ausencia de etileno en el ambiente, *etc.*); algunos de estos factores son limitantes y otros difícilmente evaluables, con lo cual asignar el papel regulador de los distintos factores durante el proceso de diferenciación de yemas adventicias puede resultar difícil y poco concluyente.

Con el cultivo *in vitro* de especies frutales, no se necesitan grandes espacios y las condiciones de cultivo se controlan mucho más que en el campo, e incluso que en el invernadero, de tal forma, que pueden llegar a optimizarse las condiciones ambientales y nutritivas donde se desarrollan las plantas. Las técnicas de cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales proporcionan una herramienta muy útil para acelerar los trabajos de selección y mejora ya que permiten evaluar los genotipos en niveles de organización celular más simples (órganos, tejidos o células) en vez de utilizar plantas completas; y además permiten trabajar con un gran número de individuos, en poco espacio y durante corto tiempo, aumentándose así las posibilidades de éxito.

Al igual que ocurre con las especies herbáceas, la transformación genética, a través de la transferencia de genes, ofrece muchas posibilidades para la mejora de las especies leñosas, ya que permite introducir caracteres únicos a especies y genotipos de élite sin alterar el resto de los caracteres agronómicos o forestales que

determinan su importancia agronómica y económica. Utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, a lo largo de la década de los 90, se ha logrado establecer con éxito líneas transgénicas de distintas especies frutales, utilizando varios tipos de explantos. Sin embargo, algunos genotipos del género *Prunus* son recalcitrantes a los sistemas de regeneración basados en el empleo de material adulto (raíces, hojas, peciolos, entrenudos, *etc.*) y sólo se han obtenido plantas transgénicas de ciruelo y albaricoquero, con los genes para 'Plum pox virus coat protein' y 'Papaya Ringspot virus coat protein'. Pero los explantos transformantes fueron material muy juvenil de origen embrionario, cotiledones y segmentos de hipocotilos, que posee un mayor potencial de regeneración.

Por lo tanto, en la mejora de frutales, para poder aprovechar las ventajas que ofrece la selección precoz y las nuevas estrategias que proporciona la biotecnología, incluida la transformación mediada por *Agrobacterium*, resulta obvio que lo primero que hay que resolver son los problemas que plantea la falta de métodos de regeneración vegetal de árboles adultos, a partir de células o tejidos, cuyos caracteres agronómicos estén ya evaluados y sean objeto de interés.

El experimento presentado forma parte de un estudio más amplio, con distintas especies de *Prunus*, para establecer métodos adecuados de regeneración de brotes a partir de tejidos diferenciados de hoja de patrones clonales. En el estudio se consideró no sólo el tipo y la combinación de reguladores de crecimiento y sus concentraciones, sino también la edad de los explantos y las condiciones físicas de los cultivos, así como la adición de diversos compuestos.

Material y métodos

Las hojas de 'Mariana 2624' (*Prunus cerasifera* x *munsoniana*), de 30 días de edad, se tomaron de brotes cultivados *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Se utilizaron 25 hojas/tratamiento. Las hojas se cortaron en tres trozos (proximal, media y distal), según cortes transversales al nervio central. Estos explantos foliares se colocaron con el envés en contacto con el medio de regeneración, y las placas de Petri pasaron a la cámara de cultivo, con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y temperatura de 22°C. Las citoquininas N^6-benzil-adenina (BA) y tidiazurón (TDZ), a concentración de 7,5 μM, se utilizaron, independientemente, como únicos reguladores de crecimiento en los medios de regeneración, basados en el medio LP (Quorin y Leproive, 1977). Los medios se suplementaron con 20 o 30 g/l de sacarosa. Además, fue evaluado un medio con 20 g/l de sacarosa y 20μM de $AgNO_3$. Los subcultivos de los explantos fueron mensuales y el experimento se repitió tres veces con un mes de intervalo.

Resultados y Discusión

Se evaluó la formación de nuevos órganos o brotes a partir de las partes proximal, media y distal de las hojas. Cómo única respuesta morfogénica se observó formación de nuevos brotes, que tardó en producirse (más de 90 días). Con el paso del tiempo, los explantos en los medios con $AgNO_3$ se amarillearon o empardecieron. Los resultados observados (TABLA I) no son los óptimos en ninguno de los tratamientos efectuados, aunque el mayor número de brotes se obtuvo con TDZ y 20 g/l de sacarosa. A diferencia de lo que ocurre para 'Mariana GF 8-1, la adición de 20 μM de $AgNO_3$ y el empleo de 7,5 μM de TDZ (Escalettes y Dosba, 1993) no favorecieron la regeneración adventicia de 'Mariana 2624'. Experimentos posteriores al presentado, evidenciaron que la combinación de N^6-bencil-adenina (a menor concentración) y ácido 1-naftalén-acético (NAA) rindió mayores tasas de regeneración de brotes a partir de hojas de 'Mariana 2624'.

Tabla I: Formación de brotes (105 días) a partir de secciones transversales de hoja

	TDZ-20	TDZ-30	TDZ-20-Ag	BA-20	BA-30	BA-20-Ag
proximal	3b (2c)	0	0	1b	0	0
	2b (2c)	0	0	0	0	0
	1b	1b	0	1b	1b	1b
media	2b (2c)	0	0	0	0	0
	2b (2c)	0	0	0	0	0
	1b	0	1b	1b	0	0
distal	0	0	0	0	1b	1b
	1b	0	0	0	0	0
	2b (1c)	0	0	0	1b	0

b: brote; c: callo

Al etileno se le ha relacionado con la maduración de los embriones y con la senescencia de los tejidos. Sin embargo, bien pudiera estar implicado en el proceso morfogénica, inhibiendo la diferenciación de las yemas adventicias. El nitrato de plata disminuye la acción del etileno, reduciendo su producción por parte de los tejidos vegetales, por lo que se consideró interesante comprobar su efecto en los medios de regeneración. Pero no se ha observado aquí una acción positiva sobre la regeneración de brotes.

Quorin, M.; Leproive, P. 1977. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de *Prunus*. *Acta Horticulturae* 78: 437-442

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia. Plantarum* 15: 473-497

Escalettes, V.; Dosba, F. 1993. In vitro adventitious shoot regeneration from leaves of Prunus spp. *Plant Sciencie* 90: 201-209