

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.)

Esperanza Rodríguez¹; Carolina Trujillo²; Sergio Orduz³; Sonia Jaramillo⁴;
Rodrigo Hoyos⁵ y Rafael Arango⁶

RESUMEN

Este estudio reporta un sistema de regeneración simple y eficiente a partir de explantes de hoja de Diacol Capira (DC) y Parda Pastusa (PP), dos variedades comerciales de papa cultivadas en Colombia. Un medio único de cultivo es usado tanto para la inducción de callos como para la regeneración de tallos. Se comparó el efecto de diferentes relaciones entre auxinas y citoquininas adicionadas a un medio selectivo para regenerar tallos (4.3 g/L de Sales de Murashige and Skoog (1962), 30 g/L sacarosa, 0.5g/L tiamina, 1 mg/L ácido giberélico, 40mg/L ácido ascórbico y 1.7 g/L fitagel pH 5.7) a partir de explantes de hoja. El análisis de los resultados demostró que todos los explantes de hojas de DC, tratados con zeatina ribósida- ZR (3mg/L), ácido indol -3- acético - AIA (1mg/L) y todos los explantes de hojas de PP tratados con ZR (3 mg/L), regeneraron plántulas fuertes y morfológicamente normales. El medio fue utilizado en posteriores experimentos de transformación genética.

Palabras claves: *Regeneración, explante, regulador de crecimiento, Solanum tuberosum, Diacol Capira y Parda Pastusa*

¹ Unidad de Biotecnología Vegetal, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB)

² Programa de Maestría, Depto. Biología, Universidad de Antioquia.

³ Unidad de Biotecnología y Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB)

⁴ Profesora Asociada. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779, Medellín

⁵ Profesor Asistente. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779, Medellín

⁶ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Depto. Biología. E-mail: rarango@col3.telecom.com.co

Aprobado para su publicación abril 26 de 2000.

ABSTRACT

This study describes an efficient one- step regeneration system from leaf explants of two colombian commercial potato varieties: Diacol Capira (DC) and Parda Pastusa (PP). A single culture medium is used for initiation of callus and developing of shoots. We compared the effect of different concentration ratios between auxins and cytokinins added to a basal medium (Murashige and Skoog basal salt mixture (1962) supplemented with 30g/L saccharose, 0.5g/L thiamine, 1 mg/L gibberelic acid, 40mg/L ascorbic acid 1.7 g/L, phytigel, pH 5.7) to regenerate leaf explants. Analysis of results revealed that all leaf explants from DC treated with zeatin riboside -ZR (3 mg/L), indole - 3-acetic acid - IAA (1 mg/L) and all leaf explants from PP treated with ZR (3mg/L), induced regeneration, producing green and morphologically normal plants. This medium was used for subsequent genetic transformation experiments.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) forma parte de la dieta de una gran proporción de la población mundial y su cultivo es uno de los más extendidos en el mundo, ocupando el cuarto lugar después del trigo, el maíz y el arroz (Miller y Lipschutz, 1984). La producción de papa en los países en vía de desarrollo se ha incrementado en 153% en las tres últimas décadas. Latinoamérica aumentó su producción en 5 millones de toneladas, hecho que refleja la importancia de este cultivo (Lobaton, 1992).

En Colombia existen dos variedades comerciales muy importantes, Diacol Capira (DC) y Parda Pastusa (PP) las cuales son susceptibles al ataque de las polillas de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) (Torres, 1992). Aunque el uso de agentes químicos es la forma tradicional de controlar las plagas, otra

forma podría ser el desarrollo de variedades mejoradas a través de métodos convencionales, sin embargo, es un proceso lento debido a la segregación y a la recombinación de características deseables y no deseables en la semilla (Park, Ronis, Boe y Cheng, 1995).

Una herramienta muy útil para abordar el problema del control de estas plagas, es el uso de algunas técnicas de ingeniería genética como la transformación mediada por *Agrobacterium* (De Block, 1988; Visser, 1991; Newell *et al.*, 1991; Cardi *et al.*, 1992; Sheerman *et al.*, 1988; Snyder y Belknap, 1993; Stieckema, 1988). Este sistema ha sido usado para producir variedades con características mejoradas tales como resistencia a insectos, mediante la introducción de genes que codifican para proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (Ebora; Ebora y Sticklen, 1994; Escriche, 1994; Ely, 1996).

Para que la transformación genética sea exitosa, se requiere de la estandarización previa de medios de cultivo que permitan una eficiente regeneración de ápices a partir de explantes. Se han regenerado plantas de papa mediante la formación de tallos adventicios sobre explantes extraídos de tejidos de hojas compuestas (peciolos, raquis y foliolos) (Jacobsen, 1977; Roest y Bokellmann, 1976; Webb, Osifo y Henshaw, 1983), segmentos de tallos (Newell *et al.*, 1991), microtubérculos crecidos *in vitro* (Snyder y Belknap, 1993; Ishida; Snyder y Belnap, 1989) y discos de tubérculos provenientes de campo (Snyder y Belknap, 1993; Hoekema *et al.*, 1989). El factor más importante que influye en la organogénesis *in vitro* parece ser el efecto de los fitoreguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citoquininas cuya relación debe ser específica para cada variedad con el fin de que su efecto sea óptimo. El ácido naftalen acético (ANA), la bencilaminopurina (BAP), y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4- D) son efectivos para inducir regeneración de tallos; sin embargo, el ácido indol- 3- acético (AIA) y la zeatina ribósida (ZR) parecen ser las más efectivas (Snyder y Belknap, 1993; Hoekema *et al.*, 1989).

En este artículo se reporta la estandarización de un medio único que permite la inducción de callos a partir de los cuales se induce regeneración de tallos en las variedades de papa DC y PP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de plántulas *in vitro*:

Se tomó como fuente para desarrollar un grupo base de plantas, plántulas juveniles y sanas cultivadas *in vitro* certificadas como libres de virus de las variedades DC y PP obtenidas del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede - Medellín. Tallos con dos entrenudos y una longitud entre dos y tres centímetros (cuatro o cinco) fueron sembrados en 10-15 ml de medio de propagación líquido, en frascos de vidrio, cubiertos con papel aluminio e incubados a 20°C con un fotoperíodo de 12 horas. El medio de propagación usado para ambas variedades contiene: 4,4 g/L de sales de Murashige and Skoog (1962), 2 mg/L ácido D- Pantoténico, 20 g/L sacarosa, 0,4 g/L tiamina, 100 mg/L Myo-inositol y 6 ó 24 µM tiosulfato de plata (TSP), pH 5,8. El TSP (AgNO₃ + Na₂S₂O₃) es un inhibidor de la acción del etileno que promueve el crecimiento de las plantas al bloquear la senescencia prematura (Hulme, Higgins y Shields, 1992).

Fuente de Explantes: Se seleccionaron plantas juveniles y sanas cultivadas *in vitro* del grupo base de nuestro laboratorio de 4-5 semanas de edad. A partir de las hojas se cortaron explantes de 0,5 cm² aproximadamente, los cuales se utilizaron para evaluar diferentes medios de cultivo para regeneración de tallos de papa.

Regeneración de plántulas: Se realizaron tres experimentos con nueve tratamientos cada uno, para cada variedad de papa (DC y PP). En cada

experimento se evaluó el efecto de la combinación de dos reguladores de crecimiento sobre la regeneración de tallos en explantes de hojas. Cada explante fue designado como una unidad muestral para un total de 30 por tratamiento. Cada experimento se hizo utilizando un diseño experimental bifactorial con tres niveles.

Los experimentos se realizaron de la siguiente manera: se tomaron hojas de plantas propagadas *in vitro* de 3 a 4 semanas de cultivo. Al explante se le hicieron dos cortes, uno basal y uno distal y posteriormente se sembró con el haz en contacto con el medio de cultivo, utilizando 10 explantes por caja de petri de 25 ml. Las hormonas fueron adicionadas a un medio base de cultivo para papa con la siguiente composición: 4,3 g/L de Sales de Murashige y Skoog (1962), 30 g/L sacarosa, 0,5 g/L tiamina, 1 mg/L ácido giberélico, 40mg/L ácido ascórbico y 1,7 g/L fitagel pH 5,7. A este medio según el experimento, se le adicionaron los reguladores de crecimiento en todas las combinaciones posibles como se describe a continuación:

- ANA a 0, 0,5, 1,0 mg/L - BAP a 0, 1,5, 3,0 mg/L
- 2,4- D a 0, 0,5 1.0 mg/L - BAP a 0, 2,0, 3,0 mg/L
- AIA a 0, 1,0, 3,0 mg/L - ZR a 0, 0,5, 3,0 mg/L

Todos los explantes una vez sembrados en el medio de regeneración a evaluar, fueron sometidos a un periodo inicial de oscuridad de dos semanas y

posteriormente fueron expuestos a un fotoperíodo de 12 horas y a una temperatura de 20°C. A cada tratamiento se le hizo cambio de medio cada 15 días.

Análisis estadístico: Para seleccionar el medio adecuado de regeneración se tuvieron en cuenta observaciones cualitativas como la calidad de los tallos regenerados en cada tratamiento y el aspecto morfológico. Los resultados de cada experimento obtenidos después de 8-9 semanas fueron analizados mediante el programa estadístico STATISTICA versión 5,1. Para determinar la asociación entre la concentración de los reguladores de crecimiento y la regeneración de tallos se realizó un análisis de Regresión Logística (Logit). Para determinar la significancia de la asociación se utilizó una χ^2 ($p < 0,001$), en el cual la variable dependiente, regeneración de tallos tiene una respuesta binomial (presencia o ausencia) y las variables independientes son la concentración de auxinas y citoquininas.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Mantenimiento de plántulas *in vitro*: En ensayos preliminares observamos el efecto del TSP ($\text{AgNO}_3 + \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) como inhibidor de la síntesis de etileno, reflejado en el desarrollo de las hojas. De manera general se observó durante el proceso de propagación *in vitro* de las plántulas que utilizando concentraciones de 6 y 24 μM para PP y DC respectivamente se mejoraba la calidad de las hojas. Esto se hizo porque de acuerdo con reportes publicados

(Hulme, Higgins y Shields, 1992; Chang y Chang, 1991; Perl, Aviv y Galun, 1988) encontramos que el TSP promueve el crecimiento de las plántulas y provee de una manera evidente hojas más grandes al inhibir la acción del etileno. Este medio nos permitió desarrollar plántulas con tallos y hojas verdes, con una mayor área foliar (entre 0,5 y 1 cm² aproximadamente), cuando se adiciona al medio de propagación.

Regeneración de plántulas: En todos los tratamientos hechos con las diferentes hormonas de crecimiento, el proceso de regeneración se inicia con la aparición de callos en los bordes y cerca de la nervadura principal de los explantes, durante las dos primeras semanas después de iniciado el tratamiento. Entre la cuarta y sexta semanas, se produjo inducción de ápices en ambas variedades, DC y PP, con los reguladores de crecimiento ZR y AIA en todas las concentraciones.

Con los tratamientos 2,4 -D / BAP (0.0/2.0 y 0.5/3.0 mg/L), se presentó inducción de ápices en DC entre la cuarta y la sexta semana. PP dio los primeros ápices entre la quinta y octava semana cuando se utilizó 2,4 -D a 2 mg/L y BAP a 3 mg/L. Los tratamientos hechos con ANA y BAP en las dos

variedades, comenzaron a producir ápices entre la quinta y octava semana.

Los medios suplementados con auxinas sin considerar la concentración, indujeron formación de raíz (datos no mostrados). Las concentraciones de ANA y BAP que produjeron los porcentajes de regeneración más altas fueron 0,5 y 3,0 mg/L respectivamente para la variedad DC, dando un 77% de explantes regenerantes. Para la variedad PP, la respuesta más alta, se encontró a concentraciones de 3,0 mg/L BAP con una regeneración del 73% (Tabla 1). Sin embargo, el poco crecimiento de los ápices producidos y la frecuente formación de callos friables en los que no se produjo diferenciación celular, fueron razones para ensayar otros reguladores de crecimiento.

En los experimentos con 2,4 -D y BAP se presentó un menor porcentaje de ápices regenerados en relación con los obtenidos en el tratamiento de ANA y BAP. Un 60% de los ápices regenerados fueron obtenidos cuando se utilizaron 2.0 mg/L de BAP y 0.5/3.0 mg/L de 2,4 -D y BAP respectivamente en DC; y un 67% de regeneración se presentó en PP cuando se utilizó 2.0 mg/L de BAP (Tabla 2).

Tabla 1. Porcentaje de explantes regenerados (Número de explantes regenerados/total de explantes por tratamiento x 100), después de los tratamiento con Acido naftalen acético, ANA (mg/L) y Bencilaminoourina, BAP (mg/L) a las 4, 7 y 9 semanas para las variedades de papa Diacol Capiro y Parda Pastusa.

Diacol Capira									
Semanas	ANA 0,0	ANA 0,5	ANA 1,0	ANA 0,0	ANA 0,5	ANA 1,0	ANA 0,0	ANA 0,5	ANA 1,0

	BAP 0,0	BAP 0,0	BAP 0,0	BAP 1,5	BAP 1,5	BAP 1,5	BAP 3,0	BAP 3,0	BAP 3,0
4	0	0	0	12	12	0	36	21	0
7	0	0	0	18	18	12	54	54	9
9	0	0	0	27	33	23	53	77	10
Parda Pastusa									
4	0	0	0	15	0	0	18	0	0
7	0	0	0	15	45	3	54	30	6
9	0	0	0	13	57	7	73	57	6

Tabla 2. Porcentaje de explantes regenerados (Número de explantes regenerados/total de explantes por tratamiento x 100), después del tratamiento con 2,4-Diclorofenoxiacético, 2,4-D (mg/L) y Bencilaminopurina, BAP (mg/L) a las 4, 6 y 9 semanas para las variedades de papa Diacol Capira y Pardo Pastusa.

Diacol Capira									
Semanas	2,4D 0,0 BAP 0,0	2,4D 0,5 BAP 0,0	2,4D 1,0 BAP 0,0	2,4D 0,0 BAP 2,0	2,4D 0,5 BAP 2,0	2,4D 1,0 BAP 2,0	2,4D 0,0 BAP 3,0	2,4D 0,5 BAP 3,0	2,4D 1,0 BAP 3,0
4	0	0	0	27	13	0	37	33	0
6	0	0	0	57	20	0	43	47	0
9	0	0	0	60	30	3	57	60	3
Parda Pastusa									
4	0	0	0	7	23	0	17	30	7
6	0	0	0	63	60	23	57	47	27
9	0	0	0	67	60	33	53	53	37

Los porcentajes de regeneración más altas se lograron cuando se utilizó ZR y AIA (3,0/1,0 mg/L para DC y 3 mg/L de ZR para PP); no solamente se obtuvo un 100% de explantes regenerados en ambas variedades, sino que el número de los ápices generados por callo fue mayor que los observados en los tratamientos de 2,4 -D y BAP (Tabla 3). La organogénesis de ápices con esta combinación de reguladores, fue un proceso rápido con respecto a otros

reportados (Park *et al.*, 1995; Hulme, Higgins y Shields, 1992), puesto que en la segunda semana en oscuridad todos los explantes presentaron callos (100% en DC y 100% en PP) y dos semanas más tarde, comenzaron a aparecer ápices en un alto porcentaje de explantes. La Figura 1 muestra explantes de DC y PP de los controles de ZR/AIA. La Figura 2 muestra el tratamiento de 3 mg/L de ZR y 1mg/L de AIA para DC y PP respectivamente.

Tabla 3. Porcentaje de explantes regenerados (Número de explantes regenerados/total de explantes por tratamiento x 100), después del tratamiento con Zeatina Riboisida, ZR (mg/L) y Acido Indol 3-Acético, AIA (mg/L) a las 4, 6 y 8

semanas para las variedades de papa Diacol Caapira y Pardo Pastusa.

Diacol Capira									
Semanas	ZR 0,0	ZR0,0	ZR 0,0	ZR 1,5	ZR 1,5	ZR 1,5	ZR 3,0	ZR 3,0	ZR 3,0
	AIA 0,0	AIA 1,0	AIA 2,0	AIA 0,0	AIA 1,0	AIA 2,0	AIA 0,0	AIA 1,0	AIA 2,0
4	0	0	0	37	40	20	67	57	67
6	0	0	0	53	77	30	90	97	90
8	0	0	0	70	93	50	93	100	97

Parda Pastusa									
Semanas	ZR 0,0	ZR0,0	ZR 0,0	ZR 1,5	ZR 1,5	ZR 1,5	ZR 3,0	ZR 3,0	ZR 3,0
	AIA 0,0	AIA 1,0	AIA 2,0	AIA 0,0	AIA 1,0	AIA 2,0	AIA 0,0	AIA 1,0	AIA 2,0
4	0	0	0	3	7	7	43	3	0
6	0	0	0	77	20	10	90	63	26
8	0	0	0	83	33	10	100	87	40

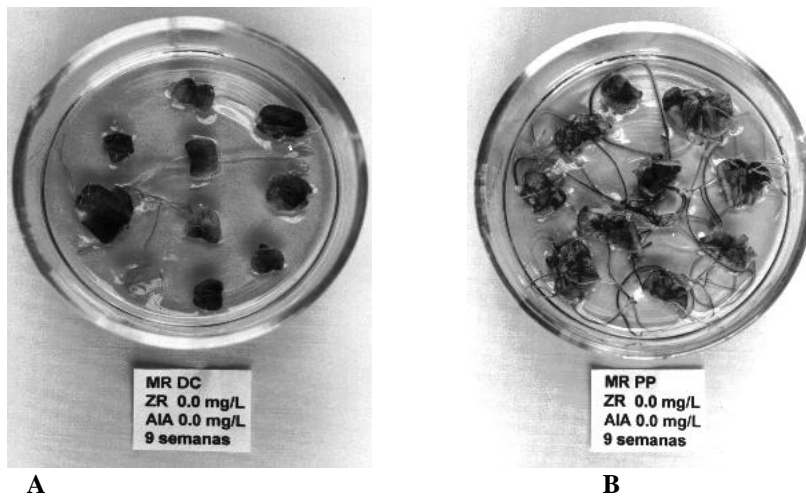
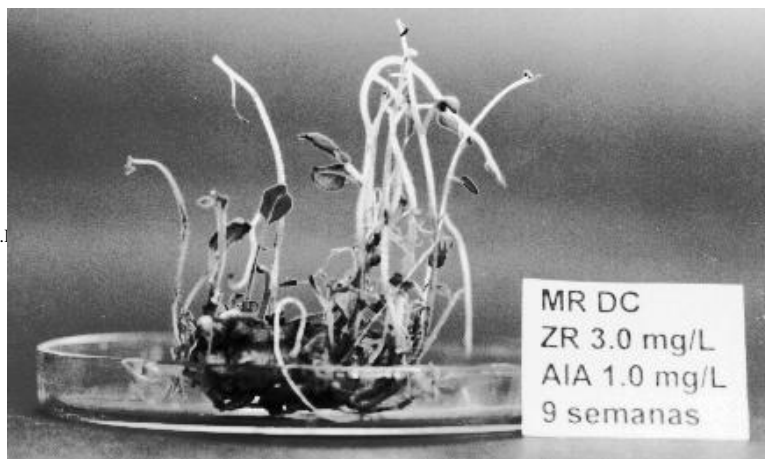
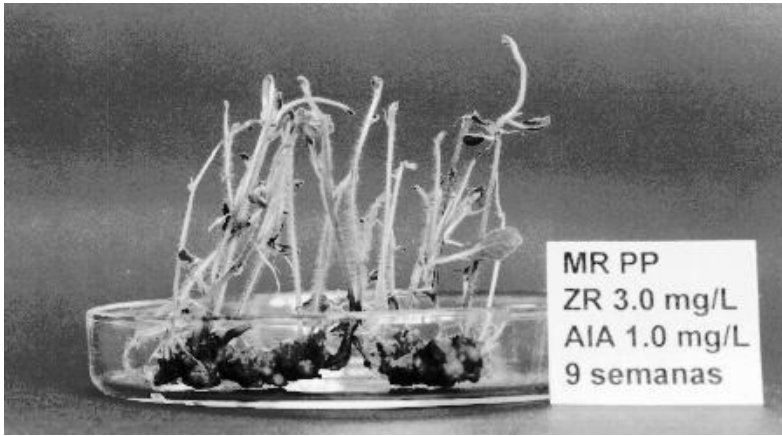


Figura 1. Control negativo para el tratamiento con ZR y AIA. Explantes de hojas de DC (A) y PP (B) en medio de regeneración sin suplemento de hormonas, nueve semanas después de iniciado el tratamiento.



A



B

Figura 2. Explantes de hoja DC (A) y PP (B) en medio de regeneración suplementado con 3.0 mg/LZR y 1.0 mg/LAIA. nueve semanas después de iniciado el tratamiento.

Los resultados de la prueba de regresión logística permitieron determinar la asociación entre la regeneración de tallos y la concentración de los diferentes reguladores de crecimiento en cada experimento ($p < 0.0001$). En todos los casos las citoquininas (BAP y ZR) parecen ejercer el efecto más marcado

para la regeneración de tallos, siendo más evidente para ZR (Figura 3). El contenido de auxinas (ANA, 2,4-D y AIA) en el medio de regeneración no parece ejercer efectos en la regeneración de tallos; en el caso particular de la variedad PP evaluada con ZR-AIA, parece incluso detener el efecto de la citoquinina (Figura 3B).

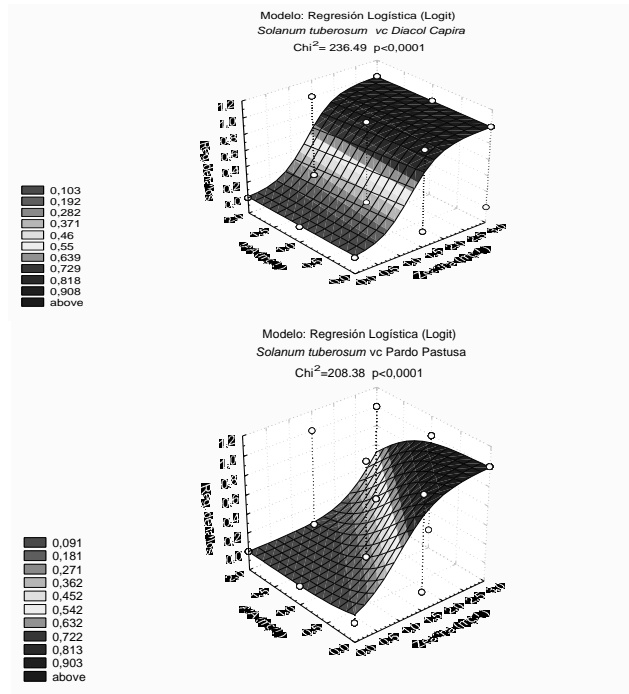


Figura 3. Asociación entre la respuesta de regeneración y la concentración de ZR y AIA para las variedades de papa **DC** (A) y **PP** (B) después de 8 semanas de tratamiento. El eje X muestra las diferentes concentraciones de ZR, el eje Y muestra las concentraciones de AIA y el eje Z la respuesta de regeneración para un total de 30 muestras por concentración de hormonas.

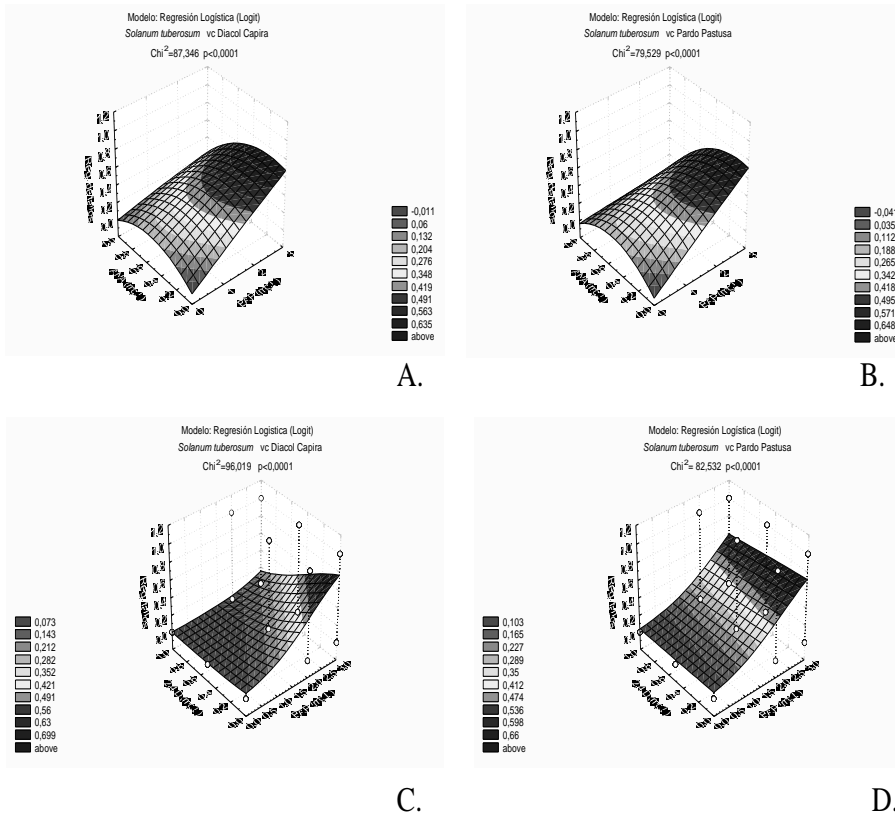


Figura 4. Efecto de la asociación entre la concentración de reguladores de crecimiento vegetal (A y B, ANA/BAP para explantes de las variedades DC y PP; C y D para explantes de DC y PP respectivamente) y la regeneración de tallos, después de 9 semanas de tratamiento. el eje X muestra la concentración de citoquinina (BAP), el eje Y la concentración de auxina (ANA o 2,4-D) y el eje Z la regeneración de tallos.

En los experimentos realizados con combinaciones de ANA-BAP y de 2,4-D-BAP (Figura 4), se observa que ninguna de las combinaciones de hormonas evaluados produce el máximo valor de regeneración de tallos

esperado.

Un medio de cultivo que promueva de una manera eficiente la regeneración de tallos a partir de hojas para una determinada variedad de papa, requiere

básicamente del establecimiento de la relación óptima entre auxinas y citoquininas, factor clave en la morfogénesis de los tejidos *in vitro*. Esta relación varía marcadamente dependiendo del genotipo de papa utilizada, haciéndose necesario estandarizar las condiciones particulares para cada variedad.

Los resultados de los experimentos en los que se utilizaron diferentes hormonas a diferentes concentraciones, revelaron que ZR/AIA fue el experimento que permitió obtener mejores porcentajes de regeneración (Tabla 3). Aunque ANA/BAP y 2,4 - D/BAP se han considerado buenos inductores de tallos de papa (Park *et al.*, 1995), nuestros resultados muestran una gran variación en los porcentajes de regeneración y la formación de plántulas. Esto contrasta con lo obtenido con las combinaciones ZR/AIA, las cuales mostraban mayores porcentajes de regeneración y tallos de aspecto más sano, hecho que podría atribuirse a que estas últimas, son hormonas naturales poseen una actividad apropiada en la totipotencia del tejido vegetal.

De acuerdo con nuestros resultados, consideramos que la utilización de concentraciones altas de ZR (3mg/L) combinadas con concentraciones bajas de AIA (0-1 mg/L), adicionadas al medio base descrito provee un sistema adecuado para la regeneración de tallos a partir de explantes de hojas de las variedades de papa DC y PP y además producen plántulas de morfología normal. De acuerdo con lo reportado en

la literatura (Webb, Osifo y Henshaw, 1983; Hulme, Higgins y Shields, 1992; Veitía , Urrea, Gómez y Freire, 1998), se requiere por lo general de dos medios para completar la regeneración *in vitro*, uno para inducir la formación de callos y otro para inducir la formación de tallos. A diferencia de esto, el medio que hemos estandarizado es único para las dos fases de desarrollo lo cual, reduce notablemente el tiempo y el costo que consume la regeneración completa.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se realizó gracias a la financiación de Colciencias. Agradecemos al Ingeniero agrónomo Darío Castañeda por su valiosa participación en los experimentos preliminares de este estudio y también al Dr. Diego Luis Alvarez por su asesoría en Estadística.

BIBLIOGRAFIA

- GARDI, T. *et al.* *Agrobacterium* - mediated genetic transformation of *Solanum commersonii* Dun. *En: Plant Science*. Vol. 87 (1992); p.179-189.
- CHANG, H.H. and CHA, M.T. Improvement of potato (*Solanum tuberosum*) transformation by *agrobacterium* in presence of silver thiosulfate. *En: Bot. Bull. Academia Senica*. Vol. 32 (1991); p.63-70.
- DE BLOCK, M. Genotype independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *En: Theoretical Applied Genetic*. Vol. 76 (1988); p.767-774.
- EBORA, R.; EBORA, M.M. and STICKLEN, M.B. Transgenic potato expressing the *Bacillus*

- thuringiensis* Cry A(c) gene effects on the survival and food consumption of the *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *En: Journal of Economic Entomology*. Vol. 87, No. 4 (1994); p.1122-1127.
- ELY, S. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins. *En: Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. s.l.: John Wiley, 1996. p.105-124.
- ESCARRICHE, B. *et al.* Occurrence of three different binding sites for *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins in the midgut brush border membrane of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*. *En: Arch. Insect Biochemical Physiology*. Vol. 26 (1994); p.315-327.
- HOEKEMA, A. *et al.* The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X. *En: Biotechnology*. Vol. 7 (1989); p.273-278.
- HULME, J.S.; HIGGINS, E.S. and SHIELDS, R. An efficient genotype-independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. *En: Plant Tissue and Organ Culture*. Vol. 31 (1992); p.161-167.
- ISHIDA, B.K.; SNYDER, G.W. and BELNAP, W.R. the use of *in vitro*-grown microtuber discs in *Agrobacterium*- mediated transformation of *Russet burbank* and *Lemhi russet* potatoes. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 8 (1989); p.325-328.
- JACOBSEN, E. Doubling dihaploid potato clones via leaf tissue culture. *En: Z. Pflanzenzuchtg*. Vol. 80 (1977); p.80-82.
- LOBATON, H.J.E. Importancia y potencial económico de la papa en América Latina. En, la papa el descubrimiento que conquistó al mundo. *En: CURSO INTERNACIONAL DE LA PAPA* (1: 1992: Pamplona). Memorias del Curso Internacional de la Papa. Pamplona: Federación Colombiana de Papa, 1992. p.3-13.
- MILLER, S.A. and LIPSCHUTZ, I. Potato. *En: EVANS, David A., ed. Handbook of plant cell culture*. New York: McGraw Hill, 1984. v.3, p.291-292.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *En: Physiology Plantarum*. Vol. 15 (1962); p.473-497.
- NEWELL, G.A. *et al.* *Agrobacterium* - mediated transformation of *Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 10 (1991); p.30-34.
- PARK, Y.D. *et al.* Plant regeneration from leaf tissues of four north Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *En: American Potato Journal*. Vol. 72 (1995); p.329-338.
- PERL, A.; AVIV, D. and GALUM, E. Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an aliogene. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 7 (1988); p.403-406.
- ROEST, S. and BOKELLMANN, G.S. Vegetative propagation of *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. *En: Potato Research*. Vol. 19 (1976); p.173-178.
- SHEERMAN, S. and BEVAN, M.W. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 7 (1988); p.13-16.
- SNYDER, G.W. and BELKNAP, W.R. A modified method for routine *Agrobacterium* mediated transformation of *in vitro* grown potato microtubers. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 12 (1993); p.324-327.
- STIECKMAN, W.J. *et al.* Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Désirée using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 7 (1988); p.47-50.
- TORRES, F. La polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) Lepidoptera: Gelechiidae. La papa el descubrimiento que conquistó al mundo. *En: CURSO INTERNACIONAL DE LA PAPA* (1: 1992: Pamplona). Memorias del Curso Internacional de la Papa. Pamplona: Federación Colombiana de Papa, 1992. p.67-70.
- VEITIA, N.; URREA, A.I.; GOMEZ, R. and

FREIRE, M. Desarrollo de medios de cultivo para la formación de callos en papa (*S. tuberosum*). En: TERCER ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL (3º: junio - 1998: s.l.). Memorias del III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. s.l.: El Encuentro, 1998. p.30.

VISSER, R.G.F. Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium*

tumefaciens. En: Plant Tissue Culture Manual. Vol. 5 (1991); p.1-9.

WEBB, K.J.; OSIFO, E.O. and HENSHAW, G.G. Shoot regeneration from leaflet discs of six cultivars of potato (*Solanum tuberosum*) subsp. *tuberosum*. En: Plant Science Letters. Vol.30 (1983); p.1-8.