

# La conservación in vitro de los recursos fitogenéticos de patata

Este sistema permite obtener material vegetal libre de enfermedades y su mantenimiento indefinido

**L**a conservación de los recursos fitogenéticos es de gran importancia para preservar la biodiversidad y para mantener una base genética amplia que pueda utilizarse en los programas de mejora genética. Estos recursos fitogenéticos se conservan en bancos de germoplasma, cuyas funciones básicas son mantener las colecciones en buen estado y suministrar el material requerido a terceras partes, generalmente con fines de mejora genética. La mejora en patata se concentró en el pasado principalmente en obtener mayores cosechas, pero en la actualidad han cambiado las prioridades hacia caracteres de resistencia a plagas y enfermedades.

Los genes de resistencia se transfieren de especies salvajes del género *Solanum* o de variedades primitivas. El sistema clásico de almacenamiento del germoplasma se basa en la conservación de semillas en unas condiciones controladas de temperatura y humedad relativa. Sin embargo hay especies que no permiten la aplicación de este método de conservación, bien porque no soportan las bajas temperaturas que se utilizan habitualmente o porque la propagación se realiza preferentemente por vía asexual.

La patata es uno de estos casos donde la conservación en forma de semilla verdadera es inviable debido al alto grado de heterocigosis (lo que ocasionaría la pérdida de la variedad si se reprodujera sexualmente) y a su baja fertilidad, dificultando la obtención de semillas. Por todo ello, las variedades de patata se propagan de forma vegetativa a partir de los tubérculos, que son unos tallos subterráneos y engrosados (debido al almacenamiento de almidón) sobre el que se disponen las yemas que, en condiciones adecuadas, desarrollarán una planta completa. Sin embargo, se debe añadir que las especies salvajes del género *Solanum* sí se almacenan en forma de semilla verdadera.

El mantenimiento de una colección clásica de variedades de patata exige la multiplicación anual en campo. Este método tiene una serie de desventajas: requiere una gran superficie de cultivo y abundante mano de obra además de los problemas fitosanitarios inhe-

*La conservación de una colección clásica de patata exige su multiplicación anual en campo, con los consiguientes inconvenientes, por ello, una alternativa muy interesante es el almacenamiento in vitro. Este artículo analiza los dos sistemas generales de conservación in vitro: a medio y largo plazo.*

Jon Veramendi y Luis M. Arregui.

Departamento de Producción Agraria.  
Universidad Pública de Navarra.

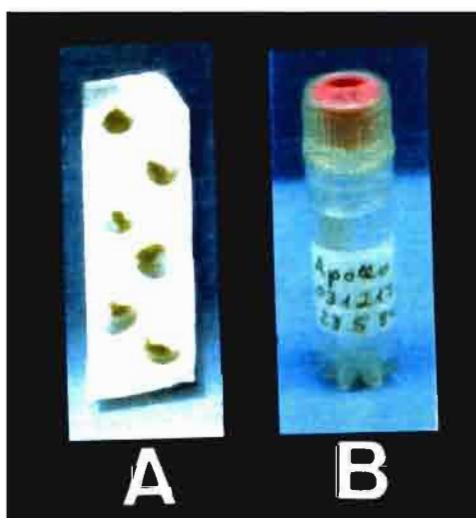


Figura 1. Criopreservación de germoplasma de patata. A. Microgotas con ápices sobre papel de aluminio. B. Criovial donde se introducen las hojas de aluminio. Este criovial se congela directamente por inmersión en nitrógeno líquido.

rentes al cultivo (enfermedades, plagas y virus) y riesgo de pérdidas por accidentes culturales o condiciones ambientales adversas. Una alternativa son los sistemas de almacenamiento in vitro, que ya se aplican a numerosas especies. En el caso concreto de la patata la principal ventaja es la obtención por técnicas de cultivo in vitro, y su posterior mantenimiento indefinido, de un material vegetal li-

bre de enfermedades (principalmente virales) siempre que se mantengan in vitro. Existen dos sistemas generales de conservación in vitro: a medio plazo (1-2 años) y a largo plazo o criopreservación (tiempo indefinido). Durante la última década se han establecido varios bancos de germoplasma in vitro de patata. Los más importantes están en el Centro Internacional de la Papa (CIP) en Perú (Dodds et al., 1991), Alemania (Mix-Wagner, 1996) y Hungría (Heszky y Nagy, 1987).

## Conservación a largo plazo: criopreservación

La criopreservación es una técnica en la que el material vegetal se mantiene congelado en nitrógeno líquido (-196 °C). El punto clave de este sistema es evitar la formación de cristales de hielo intracelular que dañan irreversiblemente las células. Existen diferentes técnicas que combinan la congelación lenta con el empleo de crioprotectores (dimetilsulfóxido, manitol, polietilenglicol, etc.): deshidratación inducida por frío, vitrificación, encapsulación-deshidratación, desecación y congelación en gotita (Engelmann, 1997).

En patata se han utilizado varios de ellos pero el que se ha llevado a la práctica en Alemania es el de congelación en gotita o "drop system" (Schäfer-Menuhr, 1996; Schäfer-Menuhr et al., 1997). Se aíslan ápices caulinares (2-3 mm de longitud) de plantas cultivadas in vitro, se realiza un tratamiento crioprotector con dimetilsulfóxido y se colocan 6 microgotas (2,5 microlitros/gota) del medio de congelación con 6 ápices sobre una hoja de papel de aluminio (Figura 1A). El conjunto se congela directamente en nitrógeno líquido. Se introduce la hoja en el criovial (Figura 1B) y se conserva en el tanque de almacenamiento que está lleno de nitrógeno líquido.

Para regenerar el material se descongelan las hojas de aluminio introduciéndolas en medio líquido y luego cultivando los ápices en placas de petri de 3 cm de diámetro. Se incuban en una cámara de cultivo a 23 °C y tras 3 meses se obtienen brotes que pueden micropagarse de forma rutinaria. Este sistema es sencillo y reproducible. Una vez congelado el

material, el único trabajo que se requiere es el llenado periódico del tanque, debido a las pérdidas de nitrógeno por evaporación. Optimizando todos los parámetros, este sistema se ha aplicado a 219 variedades y genotipos. Se han cultivado 64.000 ápices caulinares y se han obtenido plantas regeneradas de todos los genotipos que se han conservado hasta la fecha (Schäfer-Menuhr et al., 1997).

### Conservación a medio plazo

El cultivo in vitro de tejidos permite la rápida propagación clonal de un elevado número de plántulas en un corto periodo de tiempo, bajo condiciones controladas, requiriendo un espacio reducido y poco trabajo de manipulación. En el caso de la patata, los brotes se desarrollan in vitro con gran rapidez en condiciones adecuadas de temperatura e iluminación.

En general se requiere subcultivar el material a medio de cultivo fresco cada 4-8 semanas. Cuando se quiere utilizar el cultivo in vitro como un sistema de conservación de germoplasma se puede actuar sobre dos factores: las condiciones ambientales de la cámara de cultivo y la composición del medio de cultivo. Los sistemas de conservación a medio plazo tienen en común el empleo de bajas temperaturas (6-15 °C) y baja irradiación (menor de 30  $\mu$ mol. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Otras características comunes son el uso de retardadores de crecimiento como ácido abscísico, manitol o ancytidol (Veramendi et al., 1998; Dodds et al., 1991; Powell y Calgary, 1989; Wescott, 1981a, b).

Cualquier sistema de conservación debe tener en cuenta la estabilidad genética del material a lo largo del tiempo. El empleo de retardadores del crecimiento podría, eventualmente, seleccionar líneas con tolerancia al fitorregulador. Con el fin de evitar este problema, en nuestro laboratorio hemos puesto a punto un sistema de conservación a medio plazo cuyo medio de cultivo carece de reguladores de crecimiento (Veramendi, 2000). Se parte de material micropagado in vitro a partir de segmentos nodales. Brotes bien desarrollados (3-4 semanas) se subdividen en fragmentos nodales que incluyen una única yema (Figura 2A). Estos segmentos nodales se cultivan en un medio que incluye las sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog modificadas (Zarrabeitia et al., 1997) y 8% (p/v) de sacarosa. Como recipientes de cultivo se emplean cajas de policarbonato (Figura 3A). Desde este momento las cajas se mantienen en una cámara a 10 °C y baja irra-

diación (20  $\mu$ mol. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Durante el primer mes de cultivo se desarrollan los brotes a partir de la yema axilar y, a partir del segundo mes, se empiezan a formar los microtubérculos en los cultivares más tempranos (Figura 2B). Con el paso del tiempo estos microtubérculos brotarán. Tras varios meses de desarro-

llo estos brotes se secan (Figura 3B). Una segunda y hasta tercera brotación de los microtubérculos es posible durante el periodo de conservación. En estas condiciones, el material puede mantenerse durante 24 meses sin ningún subcultivo intermedio. El único trabajo que se realiza durante este periodo es una revisión bimensual de todo el material para eliminar posibles contaminaciones. Tras el periodo de conservación se cultivan los microtubérculos y los segmentos nodales de los brotes que se hayan desarrollado. Realizando el cultivo en un medio con 2% (p/v) de sacarosa y 20 °C se obtienen nuevos brotes en 3-4 semanas (Figura 4), que se pueden reintroducir en el banco por un nuevo periodo de 24 meses o multiplicar en condiciones normales.

Las ventajas del sistema son:

1. Disponibilidad continua del material para su distribución. Durante todo el periodo de conservación de 24 meses hay microtubérculos y brotes susceptibles de ser aislados y multiplicados.
2. Facilidad y rapidez de entrega. Desde la llegada de una petición transcurren 3-5 semanas hasta que se envía el material.
3. Posibilidad de mantener el material libre de patógenos.
4. Bajo coste del material y equipamiento necesario.

El Banco de Germoplasma de la Universidad Pública de Navarra se creó en 1999 y cuenta con 120 entradas correspondientes en su mayoría a variedades comerciales (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) aunque también hay genotipos correspondientes a *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* y *Solanum demissum*. En NEIKER (Granja Arkaute, Vitoria) existe otro Banco de Germoplasma que utiliza el método desarrollado en nuestro laboratorio y que cuenta con más de 300 entradas. De cara al futuro y para evitar posibles duplicaciones de material y gastos innecesarios el objetivo es fusionar ambos bancos y establecerlo de la siguiente manera. Un banco activo utilizando el sistema de cultivo in vitro a 10 °C y situado en Vitoria y un banco pasivo de criopreservación ubicado en Pamplona. En el banco activo se conservarían los genotipos más demandados, mientras que en el banco pasivo estaría todo el germoplasma disponible. Asimismo se crearía una base de datos electrónica única para la gestión de ambos bancos. ■

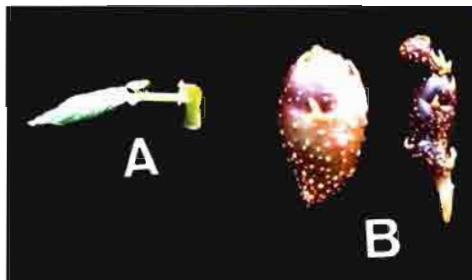


Figura 2. Conservación de germoplasma de patata a medio plazo. A: Segmento uninodal que se utiliza como explanto inicial. B: Microtubérculos desarrollados tras 1 año de conservación.

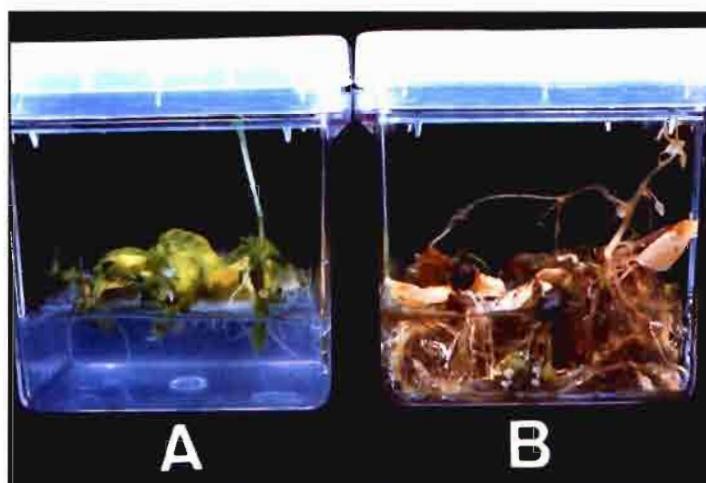


Figura 3. Recipientes de cultivo para conservación de germoplasma de patata a medio plazo. A: 1 mes después del cultivo. B: 1 año después del cultivo. Se aprecian microtubérculos y brotes necrosados.



Figura 4. Regeneración de un brote en condiciones favorables sobre un microtubérculo recuperado del banco de germoplasma al final del periodo de almacenamiento (24 meses).

### BIBLIOGRAFÍA

Existe una amplia bibliografía a disposición de los lectores en nuestra redacción.