

APLICACION DE LA BIOTECNOLOGIA LA MEJORA GENETICA DE LA PATATA¹

Ritter Azpitarte E

NEIKER - Instituto Vasco de investigación y Desarrollo Agrario, Granja Modelo de Arkaute, Apartado 46, E-01080 Vitoria-Gasteiz, Alava, España. E-mail: eritter@neiker.net

SUMMARY

Due to its characteristics, the potato crop has been used intensively for different biotechnological applications, which could be divided into three main parts : tissue culture, markers and its applications and genetic transformation. *In vitro* culture allows the production of pre-base seed potatoes via plantlets or microtubers and is useful or safe maintenance of germplasm. Different techniques which allow to reduce or increase the ploidity level of potato genotypes are related to tissue culture and can be combined to develop different breeding strategies. Several molecular marker types have been applied in potato breeding and genetics. They have be en used to perform DNA finger printing, phylogenetic analyses and for linkage mapping. Markers for monogenic characters and for QTLs have been integrated in these maps, which could be applied to marker assisted selection in breeding programmes. Genetic transformation has be en applied or many purposes in potato. Transgenic potato plants with resistance or high resistance levels against different viruses, bacteria, fungi and nematodes are available. Other applications include improved resistances to abiotic stress or changes in the metabolic pathways. Several examples for molecular farming exist in potato.

Debido a sus características, la patata ha sido y sigue siendo objeto de gran interés para aplicaciones de la biotecnología, que se podrían dividir en tres grandes apartados: Cultivo de Tejidos, Marcadores y sus aplicaciones y la Transformación Genética. En lo siguiente se enumeran diferentes ejemplos para cada uno de estos apartados .

1. CULTIVO DE TEJIDOS

La patata se deja regenerar relativamente fácil a partir de diferentes tejidos organizados de agregados de células y hasta de células desprovistas de su pared celular (i.e. protoplastos). Este hecho ha conllevado que la patata (aparte del tabaco) ha sido desde un principio un cultivo preferido para el establecimiento de diferentes técnicas de cultivo *in vitro* (Ross (1986)).

¹ En: Pascualena J, Ritter E. (Ed) 2000. Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo en Patata. Patata 2000. 3-6 Julio, Vitoria-Gastéis, España.

El desarrollo de diferentes técnicas de cultivo *in Vitro* permite la multiplicación rápida, es decir, por plántulas y minitubérculos o por microtubérculos para la producción de patata prebase y base (ver monografía de Ranalli (1997) Para la obtención de plántulas se parte generalmente de cortes de tallo de un único o de múltiples nudos que se multiplican en medio líquido o sólido. Los medios están basados en el Medio de Murashige y Skoog, a veces suplementado con diferentes sustancias que pueden regular el crecimiento y desarrollo.

Otras aplicaciones del cultivo *in vitro* incluyen la eliminación de patógenos, particularmente de virus, por cultivo de meristemos después de termo o quimioterapia. Asimismo representa una forma cómoda y segura para conservar germoplasma de patata, y facilita el intercambio seguro de material vegetal.

Diferentes estrategias de mejora genética en patata están asociadas con el cultivo de tejidos (Fig. 1). El género *Solanum* presenta en la naturaleza una gran variabilidad con respecto al nivel de ploidía. Como ejemplos se pueden mencionar *Solanum chacoense* (2x), *S. chaucha* (3x), *S. tuberosum* (4x), *S. edinense* (5x) y *S. demissum* (6x). Aparte existen híbridos entre diferentes especies lo cual en parte conlleva cierto grado de aneuploidía. Aunque las variedades comerciales son generalmente tetraploides, la biotecnología ha abierto hace tiempo nuevos caminos para realizar la mejora genética a nivel diploide e incluso monoploide.

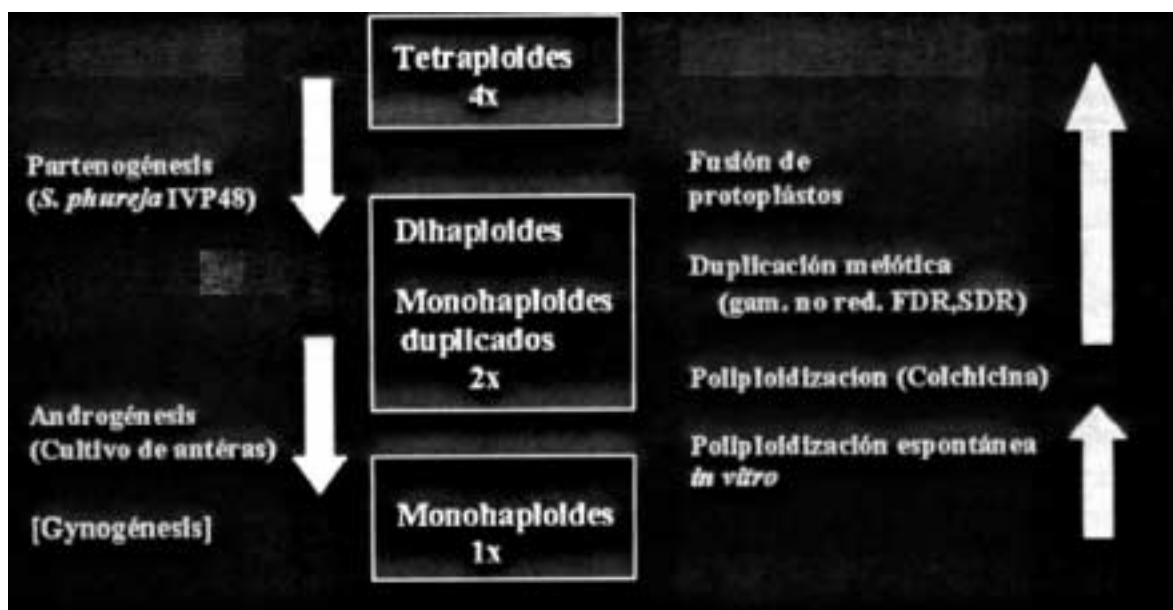


Fig.1. Métodos de Mejora Genética basados en diferentes niveles de ploidía.

La reducción del nivel de ploidía se puede realizar a través de partenocarpía, mediante cruzamientos con ciertos clones de *S. phureja*, como mostraron Hougas & Peloquin ya en por androgénesis (cultivo de anteras) o por gynogénesis. Por otra parte, para retornar al nivel tetraploide existen varias posibilidades como la poliploidización espontánea por cultivo *in vitro* o mediante colchicina (Frandsen (1967), así como por cruzamientos con genotipos que forman gametos no reducidos (Chase (1963)) y por fusión de protoplastos (hibridación somática), realizada por primera vez por Butenko y Kuchko (1980).

La aplicación de estas técnicas permite ampliar la base genética para seleccionar e introducir resistencias u otros caracteres de interés agronómico procedentes de especies silvestres. La combinación de estas técnicas sirve para desarrollar programas de mejora con niveles ploidía mixtos tal como los presentaron Wenzel et al (1982) o Uhrig & Salamini (1987).

2. MARCADORES

Numerosos tipos de marcadores se han aplicado en la mejora genética de la patata. Inicialmente estos fueron proteínas y particularmente isoenzimas. Los primeros marcadores a e ADN fueron los RFLPs (Gebhardt et al (1989)). Con la aparición de la técnica PCR se desarrollaron y aplicaron varios tipos de marcadores, dominantes o codominantes, como por ejemplo los RAPD, AFLP (van Eck et al (1995), SSR (Milbourne et al (1998)), ISTR, ISSR, SCAR y CAP (Oberhagemann et al (1999), que se han empleado en menor o mayor grado también en la patata.

Entre las numerosas aplicaciones de estos marcadores moleculares figuran la identificación varietal y la comprobación de su pureza (Gorg et al (1992)). Marcadores moleculares se han empleado en el género *Solanum* para el análisis de la biodiversidad y para estudios filogenéticos. Fragmentos específicos permiten hacer un seguimiento de introgresiones de especies silvestres en variedades de patata (Gorg et al (1992)).

Otra posibilidad de gran interés es la construcción de mapas genéticos basados en marcadores moleculares (Gebhardt et al (1989)). En estos mapas se pueden integrar marcadores para genes cualitativos. De esta forma se han obtenido marcadores para resistencias monogénicas a PVY, PVX (Rx1, Rx2; Ritter et al (1991)), nematodos (Grol (Barone et al 1990), HI (Gebhardt et al 1993), Gpal, Gpa2) y *Phytophthora infestans* (R1, RJ, R6, R7) (Leonards-Schippers 1992). Por otra parte, se pueden integrar también marcadores para caracteres cuantitativos (análisis QTL). Estudios realizados en patata incluyen análisis QTL para resistencia a *P. infestans* (Leonards-Schippers (1994)) y *Globodera pallida* (Kreike et al (1993)), para la producción y sus parámetros, y para el contenido en azúcares y almidón (Schafer-Pregl et al (1998)). Estos marcadores permiten la "selección asistida por marcadores" (MAS) en la mejora genética. Se pueden observar QTLs esparcidos por todo el genoma. Algunos coinciden en diferentes

años, mientras que otros reflejan la interacción genotipo medioambiente. También se pueden observar en ciertos casos que componentes influyen en la producción.

La integración de genes (cDNA) conocidos, incluyendo genes "candidatos" para caracteres de interés (por ejemplo proteínas PR y secuencias RGL) y genes homólogos de otras especies, nos lleva al concepto del "mapa funcional" (Gebhardt et al (1989)). La alineación de diferentes mapas mediante RFLP (Gebhardt et al (1991)), AFLP comigrantes y SSR, ha incrementado el número de diferentes marcadores disponibles además de permitir estudios comparativos entre genomas dentro del género Solanum y entre diferentes especies como patata y tomate (Fig. 2).

Con respecto a nuevos conceptos y aplicaciones de mapas genéticos, actualmente se está construyendo un mapa ultradenso en patata, que es el prerequisite para el mapeo físico, es decir, la asociación de fragmentos concretos de ADN (de una librería de BACs) con marcadores de un mapa genético. El mapeo físico ofrece teóricamente la posibilidad de aislar cualquier gen de interés para su caracterización posterior o para utilizarlo en la transformación genética. En patata se han clonado de esta manera los genes Rx1 y Rx2 que confieren resistencia al virus PVX. Recientemente se obtuvo también el gen Gpa2, que es efectivo contra los nematodos del quiste de la patata.

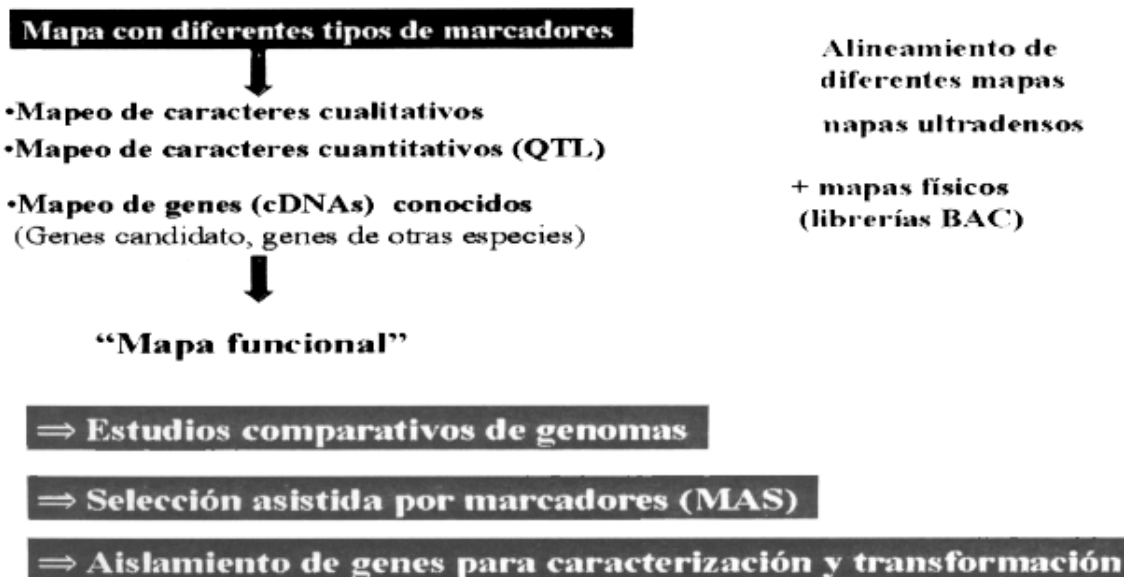


Fig. 2. Aplicaciones y conceptos de mapas genéticos.

3. TRANSFORMACION GENETICA

La transformación genética permite introducir nuevas características sin alterar al resto de la expresión fenotípica de un individuo. Numerosos ejemplos se conocen en la patata (ver monografía de Davies (2000)). Se han obtenido plantas transgénicas de patata resistentes a todos los virus, utilizando diferentes genes en la transformación. Al igual existen patatas transgénicas con resistencias (incrementadas) para otros patógenos como bacterias, hongos, nematodos e insectos. Otras aplicaciones de la transformación genética en patata incluyen resistencias aumentadas a estrés fisiológico (sequía, salinidad, frío) y alteraciones en procesos de desarrollo (crecimiento, floración, tuberización). Asimismo, se ha alterado con esta técnica el metabolismo de carbohidratos, obteniendo aumentos considerables en el contenido de almidón o manipulando la composición del mismo (almidón sin amilasa). El bloqueo de la encima Nt-inhh (inhibidor de la invertasa) permite reducir el contenido en azúcares reductores, lo cual mejora la calidad de patata para la producción de "Chips" (Greiner et al (1999)).

Recientemente la patata está ganando importancia como biofactoría ("molecular farming") y para usos alternativos. Existen varios ejemplos de patatas transgénicas que han producido con éxito albumen humano, planticuerpos, vacunas, proteínas de alto valor nutritivo y fructanos.

Nuevos conceptos en la transformación genética incluyen el desarrollo de nuevos marcadores de selección que no sean antibióticos, el desarrollo de nuevos promotores específicos de tejidos o inducibles y la acumulación y combinación de diferentes genes para la transformación. En el marco de los proyectos CYTED III.1 "Obtención de patatas transgénicas con resistencias a virus, bacterias y hongos" y INCO: FEI8-CT 960126 se han desarrollado diferentes constructos con combinaciones de dos genes (incluyendo glucanasas, quitinasas, lisocimas, proteínas de capsida, transcriptasa, RIP, osmotinas) para resistencias a diferentes patógenos. La disponibilidad de vectores con tres marcadores diferentes, permite introducir fácilmente hasta seis genes diferentes en la patata. De esta forma se han obtenido plantas transgénicas con inmunidad a PVY y/o PLRV y con altos niveles de resistencia a *Erwinia ssp.* y *Phytophthora infestans*.

REFERENCIAS

- Barone A, Ritter E, Schachtschabel U, Debener T, Salamini F, Gebhardt C (1990) Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode Globodera rostochiensis. *Mol Gen Genet* 224: 177-182.
- Butenko, R & AA Kuchko (1980) Somatic hybridization of *Solanum tuberosum L. and S. chacoense* Bitt. by protoplast fusion. In: L Ferenczy & GL Farkas (Ed). *Advances in Protoplast Research*. Akad. Kiado, Budapest. pp. 146-154.
- Chase SS (1963) Analytical breeding in *Solanum tuberosum L.* -a scheme utilizing parthenotes and other diploid stocks. *Can J Genet Cytol* 15: 359-363
- Davies HV (2000) *Advances in potato improvement through genetic engineering*. Proceed Intern Symp Plant Genetic Engineering, La Habana, December 1999, Elsevier.
- Frandsen NO (1967) Chromosomenverdopplung und Chimärenbildung nach Colchizinbehandlung haploider Kartoffelsamen. *Eur Potato J* 10: 1-15.

- Gebhardt C, Schaefer-Pregl R, Oberhagemann P, Chen X, Chalot-Balandras C, Ritter E, Concilio L, Bonnel E, Hesselbach J, Salamini F (1999) Function Maps of potato. EBPN, Proceedings of Phytosphere 99.
- Gebhardt C, Blomendahl C, Schachtschabel U, Debener T, Salamini F, Ritter E (1989) Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum*, ssp. *tuberosum*) with RFLP-fingerprints. Theor Appl Genet 78: 16-22.
- Gebhardt C, Ritter E, Debener T, Schachtschabel U, Walkemeier B, Uhrig H, Salamini F (1989) RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. Theor Appl Genet 78: 65-75.
- Gebhardt C, Ritter E, Barone A, Debener T, Walkemeier B, Schachtschabel U, Kaufmann H, Thompson RD, Bonierbale MW, Ganai MW, Tanksley SD, Salamini F (1991) RFLP maps of potato and their alignment with the homeologous tomato genome. Theor Appl Genet 83: 49-57.
- Gebhardt C, Mugniery D, Ritter E, Salamini F, Bonnel E (1993) Identification of RFLP markers closely linked to the HI gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. Theor Appl Genet 85: 541-544.
- Gorg R, Schachtschabel U, Ritter E, Salamini F, Gebhardt C (1992) Discrimination among 136 Tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. Crop Science 32: 815-819.
- Greiner S, Rausch T, Sonnewald U, Herbers K (1999) Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. Nature Biotechnology 17: 708-711.
- Hougas RW, Peloquin SJ (1958) The potential of potato haploids in breeding and genetic research. Am Potato J 35: 701-707.
- Kreike CM, de Koning JRA, Vinke JH, van Ooijen JW, Gebhardt C, Stiekema WJ (1993) Mapping of loci involved in quantitatively inherited resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* pathotype Rol. Theor Appl Genet 87: 464-470.
- Leonards-Schippers C, Gieffers W, Salamini F, Gebhardt C (1992) The R 1 gene conferring race specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V. Mol Gen Genet 233: 278-283.
- Leonards-Schippers C, Gieffers W, Schaefer-Pregl R, Ritter E, Knapp SJ, Salamini F, Gebhardt C (1994) Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. Genetics 137: 67-77.

- Milbourne D, Meyer RC, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C, Waugh R (1998) Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet* 259: 233-245.
- Oberhagemann P, Chalot-Balandras C, Bonnel E, Schafer-Pregl R, Wegener D, Palornino C, Salamini F, Gebhardt C (1999) A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: Towards marker assisted selection. *Mol breeding* (in press).
- Ranalli, P (1997) Innovative propagation methods in seed tuber multiplication programmes. *Potato Research* 40: 439-453.
- Ritter E, Debener T, Barone A, Salamini F, Gebhardt C (1991) RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol Gen Genet* 227: 81-85.A
- Ross, H (1986) Potato breeding: problems and perspectives. *J Plant Breed* 37 (suppl.)
- Schafer-Pregl R, Ritter R, Concilio L, Hesselbach J, Lovatti L, Walkemeier B, Thelen H, Salamini F, Gebhardt C (1998) Analysis of quantitative trait loci (QTLs) and quantitative trait alleles (QTAs) for tuber yield and starch content. *Theor Appl Genet* 97: 834-846
- Uhrig H, Salamini F (1987) Dihaploid plant production from 4x-genotypes of potato by the use of efficient anther plants producing tetraploid strains (4x EAPP-clones) - Proposal of a breeding methodology.
- Van Eck H, Rouppe van der Voort J, Draaistra J, van Zandvoort P, van Enckevort E, Segers B, Peleman J, Jacobsen E, Helder J, Bakker J (1995) The inheritance and chromosomal allocation of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breeding* 1 :397-410.
- Wenzel G, Bapat VA, Uhrig H (1982) New strategies to tackle breeding problems of potato. En: Giles KL & SK Sen (Eds) *Plant cell culture in crop improvement* pp. 293- 301. Plenum Publishing Corporation.