

Tema 15. Herramientas especiales de mejora I: técnicas citogenéticas y cultivo *in vitro*

1. Aplicación de las técnicas citogenéticas en la mejora

Cada especie se caracteriza por un conjunto específico de cromosomas que aparece en los núcleos de sus células y que se denomina genomio. Dos especies diferentes tienen genomios diferentes. El número de cromosomas de un genomio concreto se designa genéricamente por X , y recibe el nombre de número monoploide.

En las células de un organismo pueden existir varias copias del mismo genomio o incluso de distintos genomios. Cuando la dotación cromosómica de las células somáticas de un organismo está constituida por uno o varios genomios completos se dice que el organismo es euploide. A este término se contraponen el de aneuploide, que será aquel organismo cuya dotación cromosómica de sus células somáticas incluye algún genomio incompleto. Como norma general el número de cromosomas de los gametos de un organismo será la mitad del de sus células somáticas.

Atendiendo al número de genomios que contienen las células somáticas de los organismos euploides éstos se clasifican en:

- Haploides, tienen un único genomio (x cromosomas)
- Diploides, tienen dos copias del mismo genomio ($x+x=2x$ cromosomas), por tanto, por cada cromosoma de una de las copias del genomio existe otro equivalente en la otra copia. A estas parejas de cromosomas idénticos se les llaman cromosomas homólogos. Un diploide tiene en sus células somáticas x parejas de cromosomas homólogos, siendo x el número monoploide.
- Poliploides, tienen más de dos genomios completos. Los poliploides pueden ser autopoliploides o alopoliploides. En los autopoliploides todos los genomios son de la misma especie, o dicho de otro modo, un organismo es autoploide si incluye en sus células somáticas más de dos copias de un único genomio, pudiendo ser triploides ($x+x+x=3x$), tetraploides ($x+x+x+x=4x$), pentaploides ($x+x+x+x+x=5x$), hexaploides ($x+x+x+x+x+x=6x$), etc. Un triploide tiene x tríos de cromosomas homólogos, un tetraploide x cuartetos de cromosomas homólogos, etc.
- En los alopoliploides no todos los genomios son de la misma especie. Por ejemplo, si A es el genomio de una especie y B es el de otra, un organismo con dos copias completas de A y dos de B ($AABB$) sería un alopoloide, en concreto un alotetraploide (aloploide y alopolipoide es lo mismo). Si representamos por letras mayúsculas distintas a los genomios de especies distintas, la nomenclatura empleada es acorde a la siguiente relación:

$AABB$	Alotetraploide (4 juegos completos)
$AABBCC$	Alohexaploide (6 juegos completos)
$AABBCCDD$	Alooctoploide (8 juegos completos)
$AAABBB$	Autoalohexaploide
$AABBBB$	Autoalohexaploide
<i>Etc.</i>	

Distinto al número monoploide (x) es el número haploide o gamético, representado por n y que es igual a la mitad del número de cromosomas presentes en las células somáticas. Si el número haploide de un organismo es n , el número de cromosomas en el núcleo de sus células somáticas es $2n$. Si dicho organismo presenta regularidad meiótica producirá gametos con n cromosomas. De ahí que a n se le denomine número gamético.

En los diploides $n = x$. No es así en un poliploide. Por ejemplo, en un autotetraploide ($xxxx$) $2n = 4x$, es decir $n = 2x$.

La citogenética es la disciplina que se encarga del estudio de aquellas estructuras citológicas relacionadas con la herencia, o sea el núcleo y los cromosomas incluidos en él. Las técnicas citogenéticas son técnicas que permiten la manipulación de cromosomas o segmentos amplios de cromosomas. Estas técnicas se utilizan para obtener artificialmente cambios numéricos, dando lugar a autoploides artificiales, aloploides artificiales o haploides artificiales. Aunque en este tema solo estudiaremos las aplicaciones en la mejora de estos cambios numéricos, también se utilizan las técnicas citogenéticas para intercambiar o transferir entre especies cromosomas enteros (formas de adición y formas de sustitución), segmentos cromosómicos (injertos cromosómicos) o incluso genes individuales.

1.1 Inducción artificial de autoploides

Las formas autopoliploides de una especie presentan una serie de diferencias morfológicas, fisiológicas y genéticas con la correspondiente forma diploide. En algunos casos esas diferencias son de interés agronómico. En estos casos, la mejora puede alcanzar determinados objetivos induciendo artificialmente el desarrollo de formas autopoliploides. Por otra parte, estas formas tienen reducida su fertilidad sexual, ya que la meiosis de un poliploide es irregular, debido al reparto irregular de cromosomas homólogos, produciéndose gametos que en general serán portadores de dotaciones cromosómicas desequilibradas. Este desequilibrio compromete su viabilidad. Los gametos completamente equilibrados (portadores de uno o varios genomas, pero todos ellos completos) también pueden producirse, pero su frecuencia será muy baja, a menos que el autoploide esté diploidizado. Por todo ello los autoploides son, en principio, menos fértiles que los diploides.

La selección natural ha ido favoreciendo mecanismo de escape a la esterilidad, tales como la apomixis o la diploidización. La diploidización se da cuando en un poliploide, por acumulación de cambios cromosómicos a lo largo del tiempo, la meiosis deja de ser irregular, dándose un reparto equilibrado de genomas en la profase I. Pasa entonces a comportarse como un diploide desde el punto de vista reproductivo.

Como ejemplos de cultivos importantes que son autoploides generados de forma espontánea, podemos citar la patata ($2n = 4x = 48$) y la alfalfa ($2n = 4x = 32$) y el plátano ($2n = 3x$). La alfalfa al estar completamente diploidizada, produce siempre gametos con $n=2X$ cromosomas.

La mejora por autoploidía no se refiere a la mejora de los poliploides espontáneos. Éstos, si están diploidizados se comportan sexualmente como un diploide y pueden ser mejorados como si fueran especies diploides. Otras veces, la diploidización no se han completado, pero pueden multiplicarse vegetativamente o presentar apomixis, en cuyo caso los trataremos como se tratan estos grupos de plantas en la mejora. Cuando hablamos de mejora por

autoploidía nos referimos fundamentalmente a la obtención artificial de formas autoploides cuyas características, por su interés agrícola, son explotables comercialmente. Como regla general la obtención de un autoploide hay que acompañarla de selección para aumentar su fertilidad sexual si la propagación se va a realizar por medio de semillas. No es necesaria tal precaución si el producto se puede propagar vegetativamente y no requiere la formación de semillas para su aprovechamiento. La mejora agronómica del autoploide artificial una vez obtenido, para incrementar su fertilidad o para otros caracteres, puede abordarse mediante las técnicas convencionales descritas para los grupos de plantas atendiendo a su sistema reproductivo propagativo. El nivel tetraploide ha sido el que más éxito ha tenido, tanto en la naturaleza como cuando la inducción ha sido artificial. El método consagrado para obtener tetraploides a partir de un diploide es la utilización de colchicina. Este agente altera la mitosis dando lugar a la c-mitosis, en la cual no se forman ni las fibras del huso ni el tabique celular. Por tanto en vez de formarse dos células hijas queda una sola célula con 4x cromátidas, que luego dan lugar a 4x cromosomas.

Se han obtenido variedades autotetraploides que se explotan comercialmente en varias especies agrícolas, tales como centeno, *Trifolium pratense* (trébol rojo), raygrass perenne (*Lolium perenne*), raygrass italiano (*Lolium multiflorum*), vid, rábano, espinaca, menta y remolacha.

Las formas triploides son completamente estériles pero suelen ser más vigorosas que las diploides equivalentes, y en algunos casos superan a las tetraploides, como es el caso de la remolacha. Se obtienen cruzando una forma diploide con una tetraploide.

Los ejemplos más destacados de formas triploides inducidas artificialmente son las remolachas y sandías triploides. Ambas formas triploides son completamente estériles, por lo que se deben obtener de nuevo a partir de sus parentales diploide y tetraploide cada vez que se quieran multiplicar. El que sean estériles no es un problema para explotarlas como plantas de cosecha, ya que, en el caso de la remolacha lo que se cosecha son sus raíces, y en el caso de la sandía triploide, es capaz de producir frutos sin semillas (una de sus ventajas) si se siembra junto con otra variedad diploide que actúe como polinizadora. La mera polinización, sin fecundación, induce, en algunas especies, el desarrollo de frutos a partir de flores polinizadas (partenocarpia estimulativa).

1.2 Inducción artificial de formas alotetraploides

En la naturaleza muchas especies son aloploides que se han generado a partir de ancestros diploides. La formación (espontánea o inducida) de un aloploide tiene dos pasos:

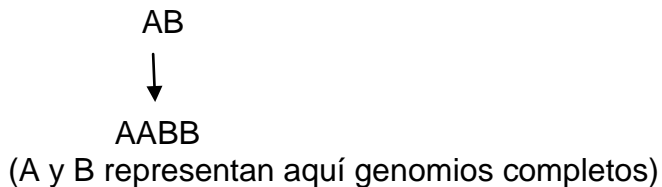
- Hibridación interespecífica entre dos especies, dando lugar a un híbrido interespecífico que reúne dos genomios diferentes:

AA x BB



AB

- Duplicación espontánea de los genomios, dando lugar a la nueva especie aloploide



Un alotetraploide se forma a partir de dos especies diploides, un alohexaploide a partir de una tetraploide y otra diploide, un alooctoploide a partir de dos tetraploides o de una diploide y otra hexaploide, etc.

Son alopoliploides espontáneos el trigo (alohexaploide el panadero o harinero, alotetraploide el duro o semolero), el tabaco, el algodón, la avena, la caña de azúcar, el ciruelo, el peral, el cacahuete, la colza, la col, etc. Todos ellos están completamente diploidizados, y por tanto se mejoran como si fueran diploides.

La utilización de la alopoliploidía en mejora consiste en la inducción artificial de alopoliploides con diversos fines, entre los cuales quizás el más destacable sea la síntesis de nuevas especies alopoliploides. Los ejemplos más destacados son el triticale (nueva especie sintetizada artificialmente a partir de trigo y del centeno), el tritordeo (nueva especie sintetizada artificialmente a partir de trigo y de una especie del mismo género que la cebada) y el vallico híbrido, obtenido a partir de *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*.

1.3 - Haploides

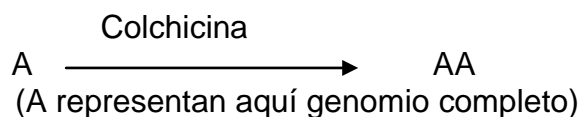
En la descendencia de individuos diploides, autopoliploides o alopoliploides, pueden aparecer ocasionalmente individuos cuyo número de cromosomas en sus células somáticas se haya reducido en a la mitad (n). Estos individuos se denominan en general haploides. Se da el nombre de monoploides a los haploides que derivan de un diploide, y de polihaploides a los que derivan de poliploides. Entre estos últimos pueden distinguirse los autopolihaploides, que derivan de un autoploide, y los alopoliploides, que derivan de un alopoloide.

La haploidía natural ocurre en las plantas superiores por cualquier mecanismo que provoque el desarrollo de un individuo a partir de una célula haploide sin fecundar. La frecuencia de haploidía puede ser incrementada o detectada en las plantas por medios artificiales tales como:

- castración y aislamiento de las flores castradas
- polinización retrasada hasta el límite de receptividad
- polinizaciones interespecíficas o intergenéricas
- polinizaciones con polen extraño (alfalfa o trigo con polen de maíz o sorgo)
- polinización con polen irradiado
- utilizando genotipos estimuladores, en especies donde hay genes que aumentan la frecuencia de partenogénesis, observándose diferencias entre variedades a la hora de obtener haploides
- El procedimiento habitual en la actualidad que puede ser aplicado a todas las especies, si bien el método ha de ser puesto a punto en cada una de ellas, es el cultivo de anteras o microsporas. Es decir colocando en un medio *in vitro* anteras y regenerando plantas a partir de los granos de polen o microsporas.

Si el haploide es monohaploide, su meiosis es absolutamente irregular, pues no hay apareamiento entre homólogos. En estos casos la esterilidad es

muy elevada. Los individuos haploides monohaploides son más pequeños y de menor vigor que los diploides y sus células son de menor tamaño. No son en absoluto explotables como productos finales de mejora. Su utilización es únicamente como productos intermedios de mejora para varios fines, entre los que cabe destacar el desarrollo a partir de ellos de formas diploides induciendo duplicación de su genomio con colchicina. Dichas formas diploides son líneas puras homocigotas para todos sus genes, ya que el segundo genomio generado es una réplica exacta del presente en el haploide previo. Estas líneas se llaman líneas diplohaploides, y pueden ser productos finales de la mejora en autógamias o como parentales de híbridos o de variedades sintéticas. La línea pura se obtiene por esta vía en solo dos pasos, la obtención del haploide a partir del diploide y su posterior duplicación del genomio para volver al estado diploide. Se acorta así el proceso de obtención de líneas puras con respecto al desarrollo de las mismas mediante programas convencionales que solo utilizan la autofecundación continuada, espontánea (autégamias) o artificial (alógamas), como fuente de homocigosis.



2.- Cultivo de tejidos y regeneración

Consiste en colocar un trozo (llamado explante) de tejido, órgano, embrión, etc. en medios artificiales y en condiciones ambientales determinadas para regenerar un individuo completo. Se trata pues de una multiplicación vegetativa, pero utilizando minúsculos propágulos en lugar de esquejes, estacas, rizomas, yemas injertadas, etc. Tales técnicas aun no son aplicables sistemáticamente a todas las especies. Hay grupos botánicos enteros en los que la regeneración es difícil, entre ellos los cereales y las leguminosas anuales. Por el contrario, son fáciles de regenerar muchas solanáceas, algunas especies del género *Brassica*, las orquídeas y muchas otras ornamentales, el manzano, el cerezo, el fresón, el banano, etc. En general, las plantas de multiplicación vegetativa regeneran mejor que las estrictamente sexuales, y las plurianuales mejor que las anuales.

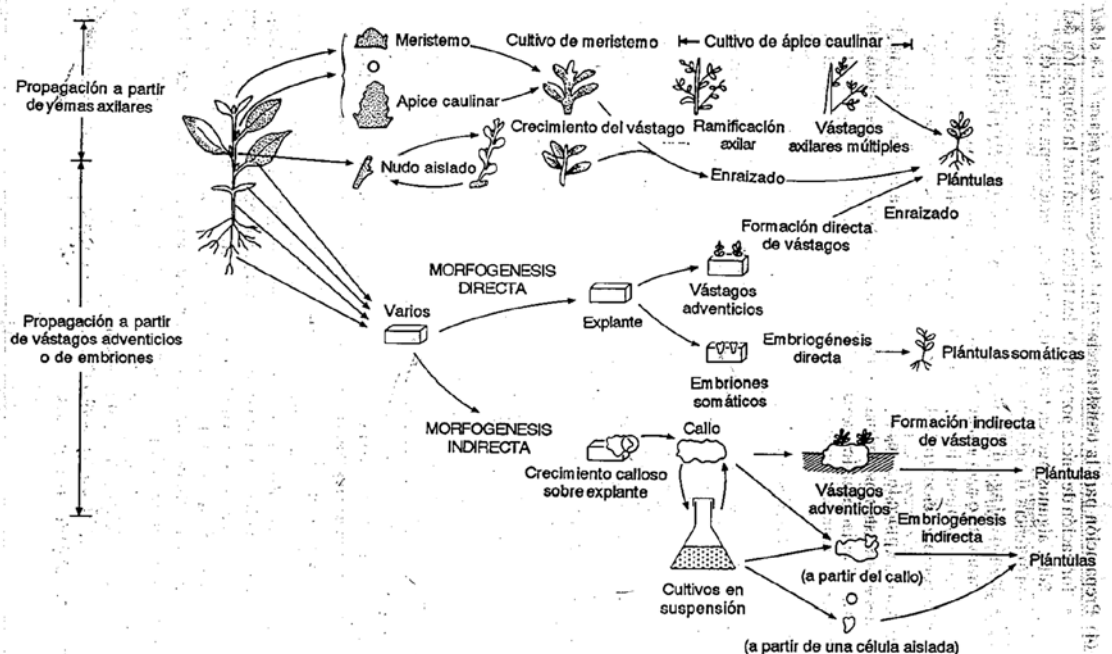
El problema estriba en hacer que unas células que han sufrido un largo proceso de diferenciación, adquiriendo caracteres tan especializados como son los correspondientes a raíz, flores, etc., se desdiferencien volviendo a su condición primitiva de totipotencia, es decir, a adquirir de nuevo la capacidad de regenerar una planta completa. La facilidad de regeneración tiene también una base genética, existiendo genotipos que favorecen la regeneración dentro de una misma especie. La aplicación de estas técnicas requiere un equipamiento y personal especializado, lo que no está al alcance de todos.

2.1 Regeneración *in Vitro*

Las técnicas de cultivo *in vitro* se aplican sobre toda clase de materiales biológicos: células, tejidos, trozos de planta (entrenudos, nudos, raíces, cotiledones, etc.), embriones inmaduros, microsporas, anteras, etc.

Los medios de cultivo contienen sales minerales, azúcares, vitaminas y hormonas. Entre estas últimas juegan un papel esencial las auxinas y las citoquininas, cuyas proporciones relativas favorecen el desarrollo de tallos (caulinogénesis) y de raíz (rizogénesis).

Debe distinguirse entre cultivos de meristemos y embriones, por un lado, los cuales conservan la totipotencia presente en el cigoto, por lo que su cultivo es más fácil (se exceptúan los embriones de híbridos interespecíficos, que necesitan rescate) y el cultivo de células y explantos por otro lado, que han sufrido un largo proceso de diferenciación y deben producir células desdiferenciadas que dan origen a estructuras organizadas (morfogénesis). Decimos que existe morfogénesis directa cuando a partir de un explante (trozo de tejido u órgano) se regeneran directamente tallitos o raíces (organogénesis directa) o embriones somáticos (embriogénesis directa). La morfogénesis indirecta ocurre cuando el explante produce primero una masa desorganizada de tejido vegetal denominada callo. Del callo a su vez pueden extraerse trozos de callo para ser replicados a otro tubo o caja, con el mismo medio, lo cual debe hacerse periódicamente para mantener el callo indefinidamente sin que degenera por envejecimiento. Es lo que se llama subcultivo, que debe hacerse cada 2-8 semanas. Si el callo se repica a un medio distinto y conveniente puede dar lugar a la llamada morfogénesis indirecta, es decir, a la regeneración de tallitos o raíces (organogénesis indirecta) o de embriones (embriogénesis indirecta). Los embriones somáticos regenerados, ya sea por embriogénesis directa o indirecta se transfieren a otros tubos para su desarrollo. En el caso de tallitos o raíces regeneradas, ya sea por organogénesis directa o indirecta se transfieren a tubos o cajas con un medio adecuado de enraizamiento o de caulinogénesis (Véase figura 4.1 de Lindsei).

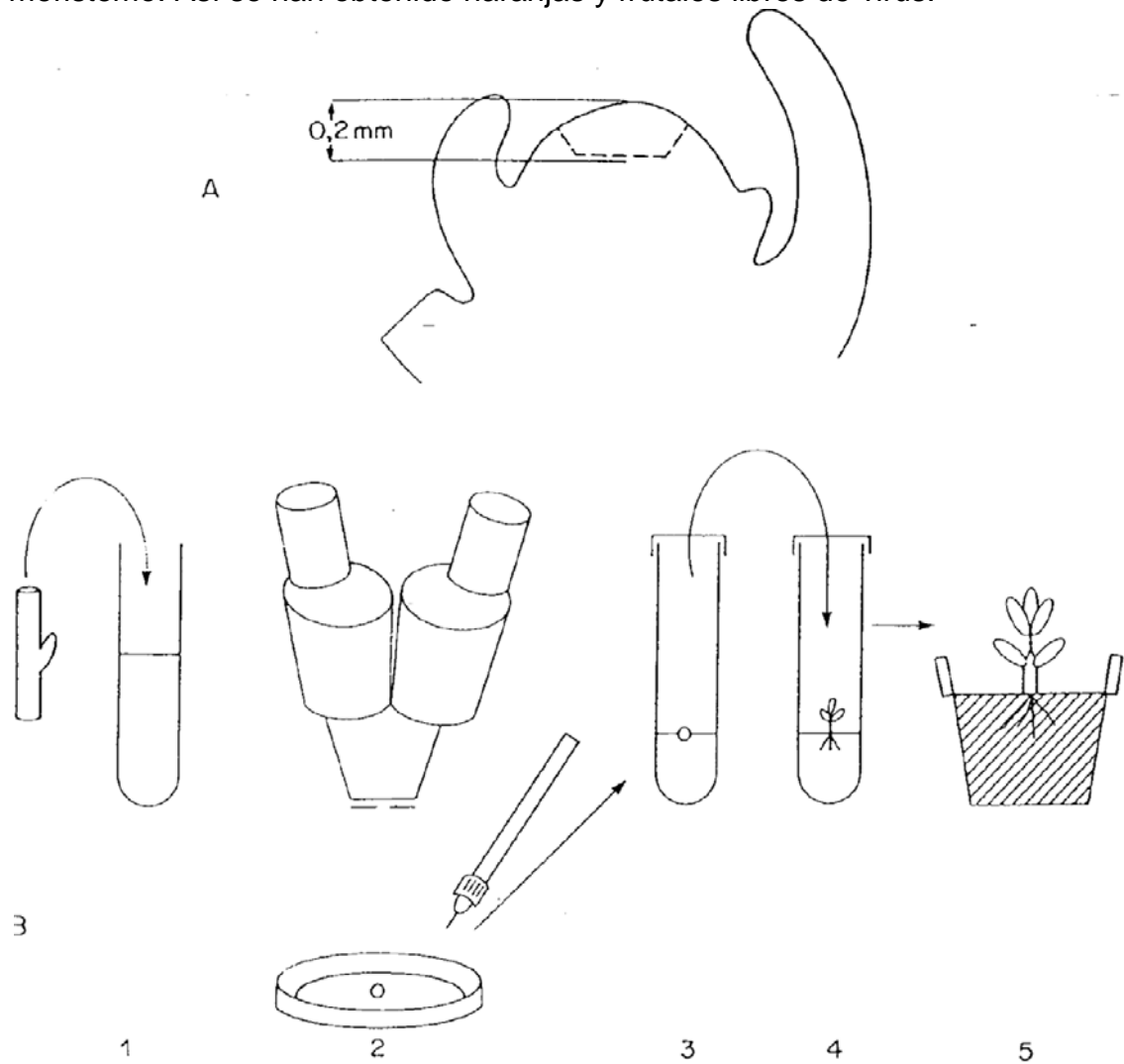


Cuando a partir del embrión, tallito enraizado o raíz con tallo se desarrolla una plantita que alcanza un tamaño adecuado, ésta se transfiere a maceta, se coloca en un ambiente con alta humedad, transportándole luego a invernadero, eliminando poco a poco su protección para permitir una gradual adaptación al medio ambiente. Este paso es crítico, y existe un alto riesgo de mortandad.

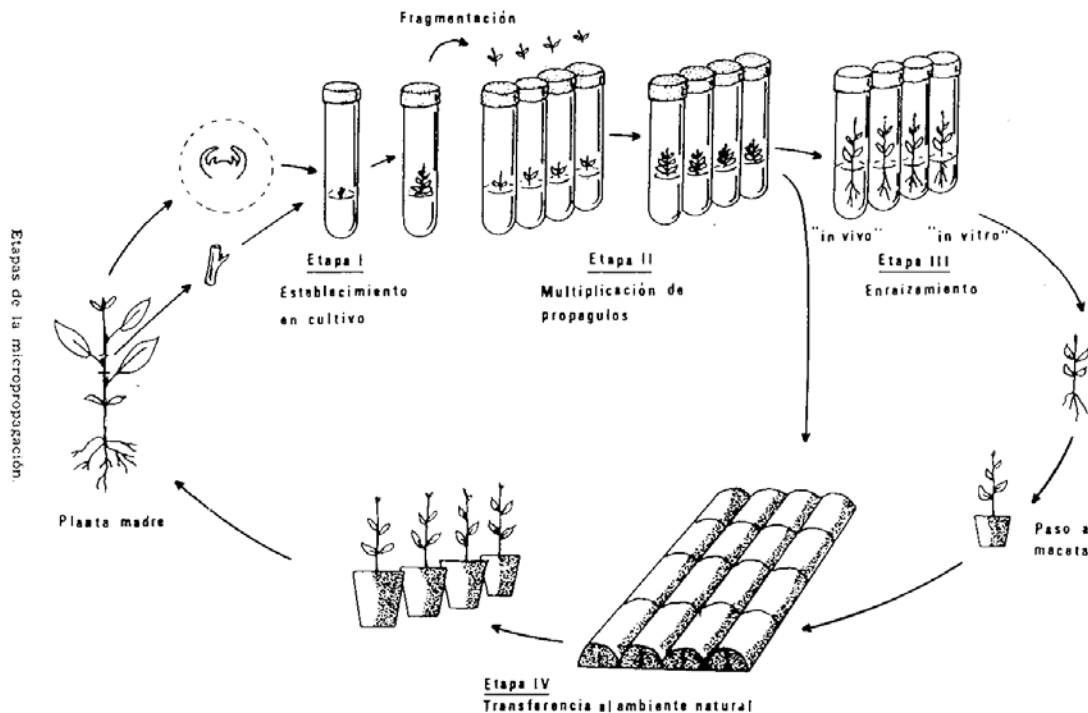
2.2 Cultivo de meristemos, micropropagación y selección sanitaria

El meristemo es totipotente. Lo forman células embrionarias a partir de las cuales se puede regenerar todas las partes del vegetal. Necesita un medio simple ya que el meristemo aporta las hormonas. Aunque el meristemo se tome de una planta contaminada por virus o bacterias, éste este libre de los mismos, por lo que la planta regenerada está sana (lo cual no ocurre en la **multiplicación vegetativa** convencional). En este aspecto se basa el interés de esta técnica: la obtención de progenies libres de patógenos a partir de parentales contaminados. Piénsese que no es raro, sobre todo en especies de multiplicación vegetativa, que todos los individuos disponibles de una variedad o genotipo estén infectados por un virus. La técnica se ha aplicado para el saneamiento de variedades en cultivos importantes como el fresón, la patata, la caña de azúcar, ornamentales, etc.

Una variante es el microinjerto, que consiste en colocar un ápice meristemático sobre plántulas de semilla recién germinadas en un medio *in vitro*, cuyo ápice se decapita y se **escinde** longitudinalmente, introduciendo el meristemo. Así se han obtenido naranjas y frutales libres de virus.



La micropropagación es una propagación clonal *in vitro*. Consiste en tomar de una planta madre un explante (que podrá ser un meristemo pero no necesariamente, ya que puede ser ápice caulinar, o un trozo de órgano, como por ejemplo un nudo aislado). Se cultiva *in vitro* para regenerar plántulas que repicadas a otro medio adecuado se les provocará el desarrollo de yemas, y éstas, una vez separadas y repicadas a otro medio, darán una nueva plantita que o bien se utilizará directamente, o será empleada para obtener nuevas yemas vegetativas, que a su vez darán nuevas plantitas (figura folleto Consejería Agricultura Murcia). Mediante este procedimiento se pueden obtener gran cantidad de plantas a partir de una sola planta madre en poco tiempo en condiciones asépticas. Esta técnica subsana el problema de que una planta madre no tiene más que un corto número de meristemos.



La micropropagación no sana, ya que no utiliza como explantes simples meristemos. No se debe confundir con el cultivo de meristemos. Aquella entra en la segunda fase de la selección sanitaria. Una vez que tenemos un cabeza de clon libre de virus es necesario multiplicarlo al abrigo de contaminación. Toda técnica que disminuye el tiempo de multiplicación del clon antes de la entrega al agricultor es beneficiosa puesto que los riesgos de recontaminación serán disminuidos. La micropropagación efectúa en algunos metros cúbicos de laboratorio la producción de plantas que ocuparía varias **decenas** de áreas durante varios años.

Selección sanitaria: cultivo de meristemos + micropropagación

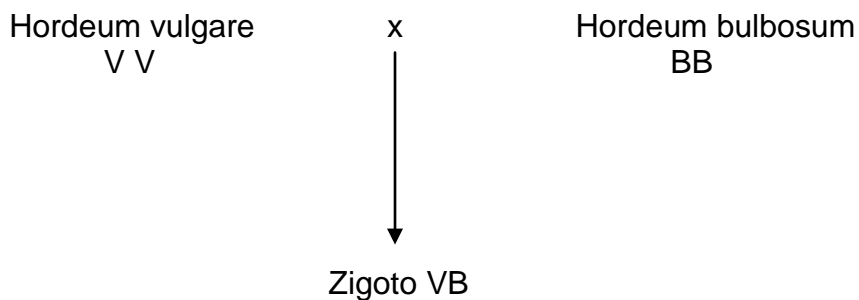
2.3 Cultivo de embriones

Consiste en aislar el embrión maduro de una semilla o inmaduro (proembrión), cultivarlo *in vitro* en un medio adecuado y regenerar planta entera a partir de él.

Aplicaciones:

- Superan las barreras de incompatibilidad postcigótica en ciertos cruces interespecíficos, en los que el embrión de la semilla aborta por incompatibilidad con el endospermo. Si el proembrión se separa del endospermo antes de que aborte y se cultiva en un medio adecuado, su desarrollo es posible, obteniéndose así un híbrido interespecífico. Buena parte de los híbridos interespecíficos que se han logrado por vía sexual se han obtenidos gracias a esta técnica. Estos híbridos sirven de puente genético entre una especie cultivada y otras silvestres relacionadas. Como ejemplos de híbridos interespecíficos así logrados podemos citar:
Lactuca sativa (lechuga) x *L. virosa*
L. sativa x *L. saligna*
 Girasol x Especies perennes de su género
Phaseolus vulgaris (judía) x *P. acutifolius*
P. vulgaris x *P. parvifolius*

- Obtención de haploides por el método bulboso.



En el proceso de desarrollo desde el cigoto al proembrión todo el genoma de B se elimina por repulsión cromosómica, obteniéndose un proembrión haploide. El problema es que *in vivo* este proembrión aborta. *In vitro* se puede rescatar y regenerar planta entera haploide, útil para obtener líneas pura duplicando con colchicina.

- Acortamiento de los programas de mejora. En algunas especies la semilla sufre un largo letargo (dormición) durante el cual la germinación queda inhibida. Los factores del letargo se ubican frecuentemente en el endospermo o en las cubiertas seminales. Si separamos el embrión de la semilla y lo cultivamos *in vitro* puede acelerarse la germinación del mismo. De ese modo se pueden acortar notablemente los programas de mejora en los que están implicadas estas semillas. Esta estrategia se ha utilizado, por ejemplo, en coles de bruselas, rosa, manzano, palma de aceite y lirio.

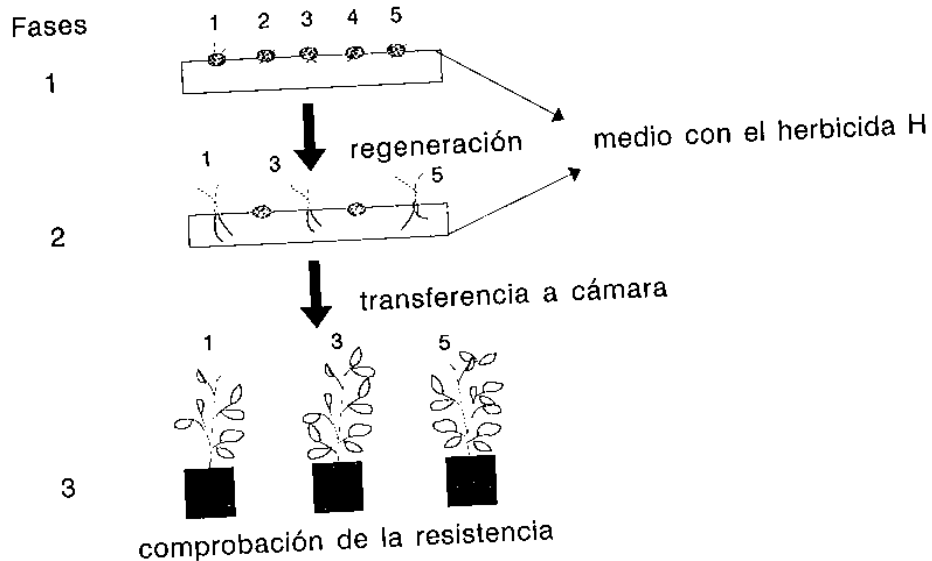
2.4 Aprovechamiento de la variabilidad intraespecífica mediante variación somaclonal: selección somaclonal y selección *in vitro*

Cuando el proceso de regeneración de plantas en cultivo *in vitro* implica una fase de callo relativamente larga, o un número de subcultivos suficiente, se

produce una alta tasa de mutación a la que se denomina variación somaclonal. La tasa es elevadísima. Algunos autores la estiman entre 10^{-2} y 10^{-4} /célula y generación. Teniendo en cuenta que se pueden cultivar varios millones de células en pequeños recipientes, y por tanto en espacio relativamente limitado, el número de mutantes que pueden obtenerse es casi ilimitado. Ya que la mayor parte de los procesos de regeneración se verifican a partir de una sola célula, los mutantes obtenidos suelen ser sólidos, es decir, no suele haber problema de quimerismo. Básicamente existen dos métodos para aprovechar la variación somaclonal: la “selección somaclonal” y la “selección *in vitro*”.

El fundamento del primero es sencillo. Consiste en regenerar plantas en cultivo de callos y evaluar los caracteres deseables que puedan haber surgido por mutación, lo cual se hace directamente en las plantas regeneradas (generación SC1) o en la descendencia de autofecundación de estas plantas (generación SC2). Así se han obtenido algunos clones (somaclonales) de caña de azúcar resistentes a enfermedades, procedentes de clones susceptibles. También hay somaclones comerciales de patata, ajos, ornamentales.

El fundamento de la selección “*in vitro*” consiste en combinar la variación somaclonal del cultivo *in vitro* con el establecimiento de una presión de selección para un carácter que se desea mejorar, por ejemplo, añadiendo una sustancia tóxica, como un herbicida o sal. Las células que sobrevivan teóricamente serán resistentes al agente añadido y probablemente lo sean las plantas que se regeneren a partir de ellas (figura 14.4a del Cubero). Se han conseguido así resistencias a herbicidas en tabaco, maíz, soja, arroz y colza.



2.5 Cultivo de anteras y de microsporas

El cultivo de anteras consiste en colocar una antera en un medio de cultivo *in vitro* y regenerar plantas enteras, cada una de ellas procedente de un grano de polen. El cultivo de microsporas consiste en colocar en un medio de cultivo *in vitro* los productos de la meiosis del meiocito masculino (las microsporas, que son granos de polen) y regenerar plantas completas procedentes cada una de una microspora. En ambos casos, las plantas regeneradas son haploides, puesto que lo es el grano de polen a partir del cual se han regenerado. El método sirve, por tanto, para obtener haploides de forma

artificial, y en consecuencia tiene las aplicaciones propias de dicha obtención. La principal es la obtención de dobles haploides. Si se logra duplicar el número de cromosomas utilizando colchicina, obtendremos una planta diploide y homocigota en todos sus genes, puesto que cada cromosoma es la duplicación exacta del único existente en el grano de polen o en la microspora. La línea así obtenida se denomina doble haploide (figura 6.9 de Cubero).

El método tiene la enorme ventaja de obtener líneas puras totalmente homocigotas en un solo paso. El inconveniente es que la técnica del cultivo de anteras está puesta a punto en pocas especies (menos para el cultivo de microsporas) por el momento, aunque el conseguirlo es cuestión de técnica, dinero y tiempo.

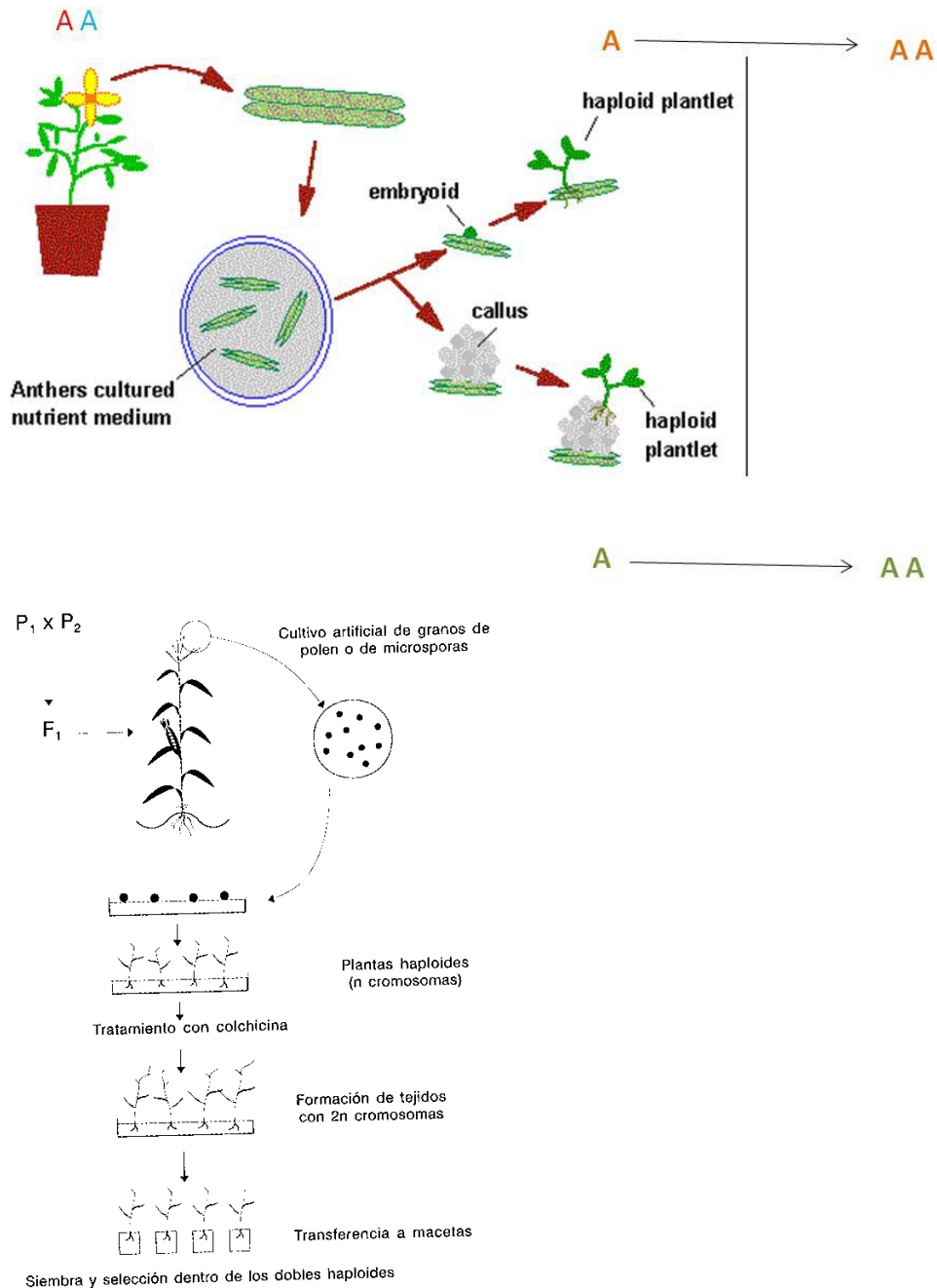


Fig. 6.9. Dobles haploides.

2.6 Hibridación celular somática vía fusión de protoplastos

Una célula vegetal desprovista de la pared celular es un protoplasto. La pared celular se puede eliminar mediante enzimas hidrolíticas, ajustando la presión osmótica para que la membrana plasmática no se rompa. Los protoplastos aislados y cultivados *in vitro* pueden dar lugar a un callo del que se pueden regenerar plantas enteras por morfogénesis indirecta.



Fundamentalmente los protoplastos aislados tienen dos aplicaciones:

a) permiten la transformación genética de forma más controlada que si se hace sobre un callo o un meristemo (véase apartado siguiente)

b) permite la fusión somática entre dos protoplastos ya sean de la misma especie o de distintas especies. Si de estas fusiones se regeneran plantas enteras obtenemos un híbrido somático.

Mediante fusión de protoplastos podemos obtener híbridos somáticos interespecíficos que serían imposibles por vía sexual. Estos híbridos se ha utilizado como puente genéticos para transferir genes desde especies silvestres a cultivadas tales como melón, calabaza, petunia, tomate, tabaco, petunia y lechuga.

3.- Organismos modificados genéticamente (OMG) y plantas transgénicas

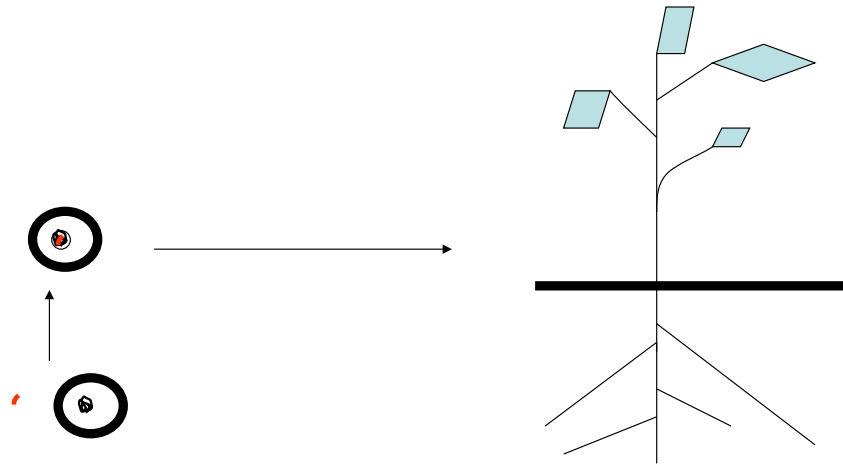
Una célula bacteriana admite la entrada de ADN a través de sus paredes en condiciones fisiológicas adecuadas. Este proceso de entrada de ADN foráneo a través de las paredes celulares de un organismo procarionte recibe el nombre de transformación. El producto de la transformación es una célula transformada.

También las células eucarióticas animales y vegetales pueden captar del medio externo DNA (DNA foráneo) a través de sus membranas celulares. Para ello también deben darse unas condiciones celulares adecuadas. La célula eucariótica que ha captado dicho ADN externo también se llama célula transformada, pero el proceso que conduce a ello en los eucariontes recibe el nombre de transfección.

Cuando un organismo eucariótico se desarrolla a partir de una célula eucariótica transformada dicho organismo se denomina organismo eucariótico genéticamente modificado. Una planta OMG sería por tanto la desarrollada a partir de una célula vegetal transformada. Un organismo transgénico es un OMG en el que el ADN foráneo que se incorpora pertenece a otra especie.

El desarrollo de plantas transgénicas ha sido posible gracias al advenimiento de las técnicas de ADN recombinante, introduciéndose así una nueva dimensión en la mejora vegetal, ya que permiten introducir en una especie vegetal DNA de otra especie cualquiera, vegetal o no. Valga un ejemplo. Si en una bacteria se descubriera un gen que produjera resistencia a un herbicida, mediante estas técnicas podríamos identificarlo, cortarlo e injertarlo en una especie vegetal de interés agrícola. Las plantas que hubieran

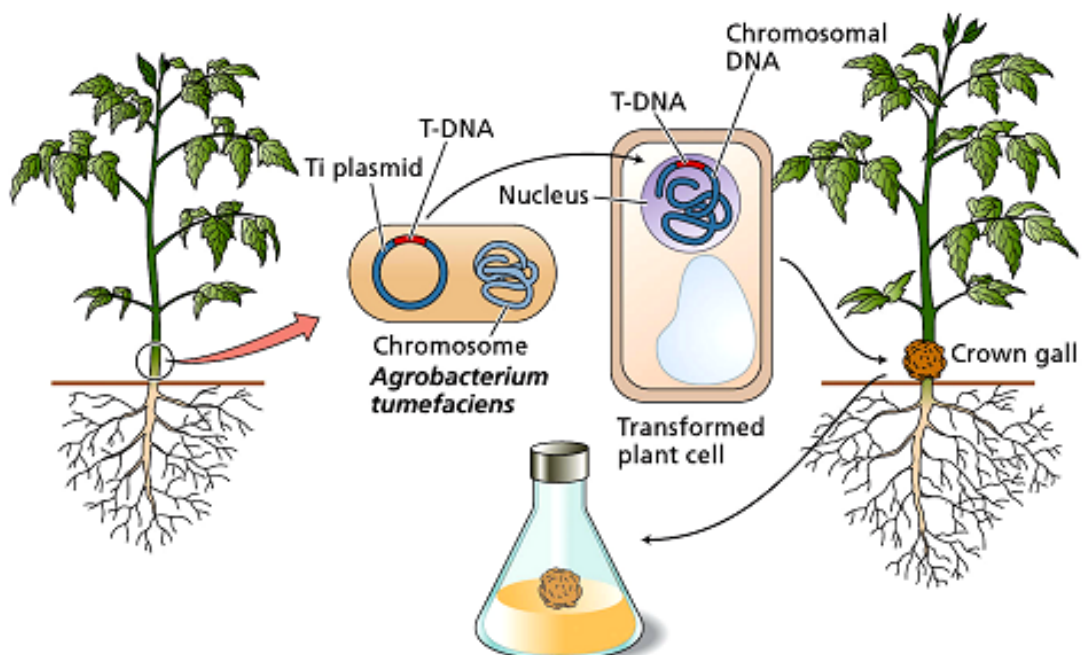
incorporado dicho gen serían resistentes al herbicida y además lo transmitirían como si hubiera sido realmente suyo. Esto se consiguió en 1986, obteniéndose la transferencia al tabaco de un gen bacteriano resistente al glisofato.



Planta Transgénica

3.1.- La bacteria fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens*

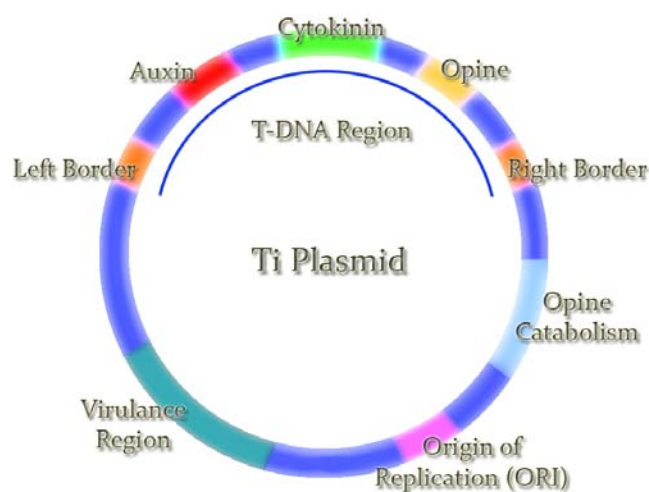
A. tumefaciens produce la enfermedad conocida como agalla de la corona, caracterizada por un crecimiento incontrolado (tumor o agalla) de la planta infectada (figura 15.14 Griffiths). La clave de la aparición del tumor es un plásmido circular grande (200 Kb), el plásmido Ti (inductor de tumor). Cuando la bacteria infecta una célula de la planta, parte del plásmido Ti, una región llamada DNA-T, se transfiere e inserta en uno o más de los cromosomas del huésped. Una vez instalado en el genoma de la planta huésped el DNA-T pone a trabajar los genes ubicados en él, haciendo que el huésped ponga su maquinaria metabólica al servicio de la bacteria.



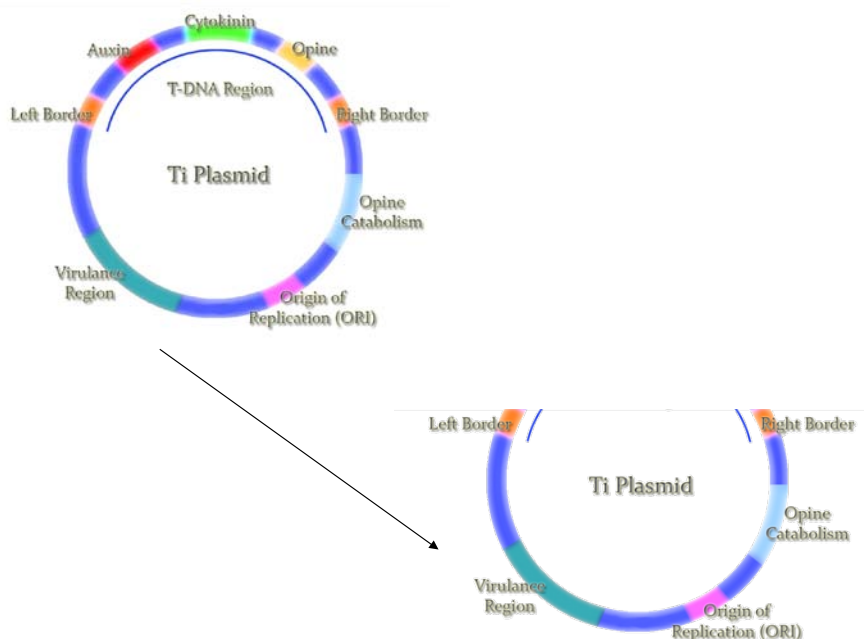
Este DNA-T contiene los genes denominados *onc* (oncogenes), cuya expresión da como resultado un mayor nivel endógeno de auxinas y citoquininas la planta huésped. Estos reguladores del crecimiento estimulan las divisiones celulares que conducen a la formación del tumor o agalla. El DNA-T contiene también un gen que codifica una enzima involucrada en la síntesis de una opina, que es un aminoácido que será exudado por la planta huésped como resultado de la expresión de dicho gen, y que la bacteria necesita para su metabolismo. Otras regiones características del DNA-T son sus extremos derecho e izquierdo, designados Bd y Bi respectivamente. En el plasmido Ti pero fuera del DNA-T se localiza una región llamada de *virulencia*, que contiene ciertos genes (genes *vir*) implicados en la transferencia del DNA-T desde el plásmido bacteriano a los cromosomas del huésped.

Los métodos biológicos de transformación de células vegetales (deberíamos decir transfección) son los que emplean vectores de ADN recombinante construidos a partir del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium rhizogenes* es otra bacteria que se utiliza en el proceso de transformación, pero su uso no es tan común.

El comportamiento natural del plasmido Ti lo convierte en un elemento muy adecuado para actuar de vector en plantas. Si el DNA que nos interesa pudiera insertarse entre los bordes Bd y Bi del DNA-T, parece lógico que el conjunto completo pudiera insertarse de forma estable en el cromosoma de la planta. Así es, básicamente, como se ha puesto este sistema en funcionamiento, aunque con algunas modificaciones.



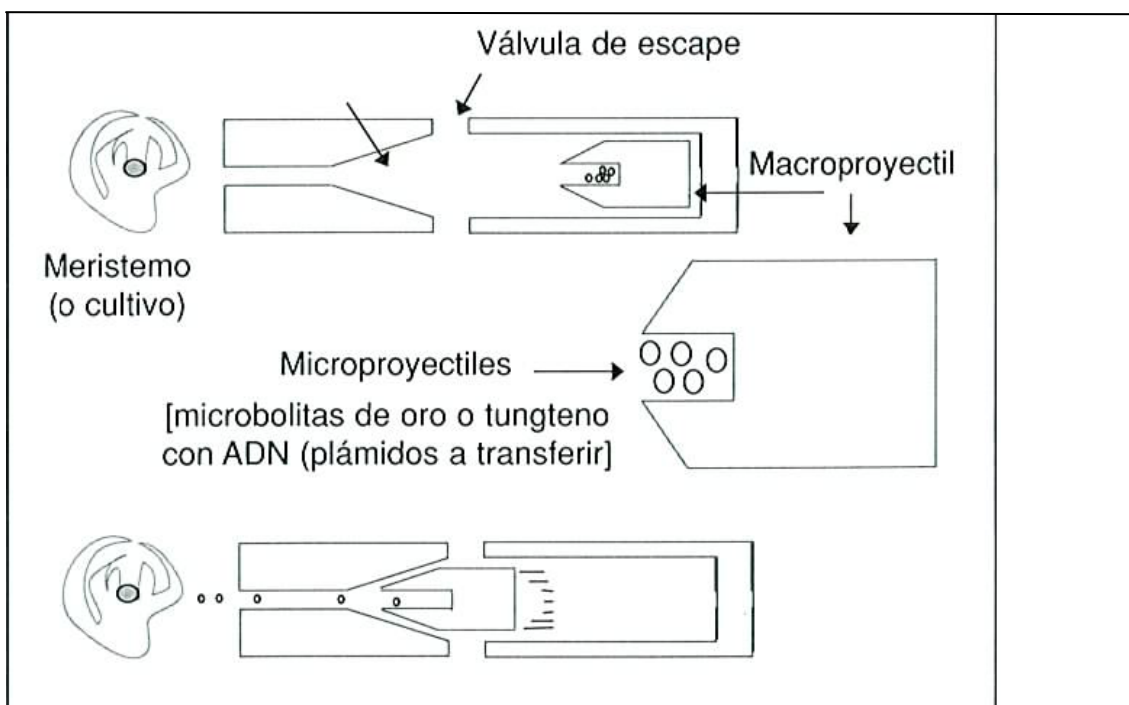
Los tejidos vegetales transformados por un plásmido salvaje se caracterizan por su crecimiento tumoral y son incapaces de regenerar plantas normales. Para que ello sea posible, ha sido necesario eliminar las propiedades oncogénicas de DNA-T, eliminando los oncogenes pero manteniendo los bordes Bd y Bi. El resultado de todo ello es el plásmido Ti desarmado. Si el plásmido desarmado lo cortamos con un enzima de restricción justamente en medio de los bordes Bd y Bi, y ahí se integra el DNA que queremos transferir (transgen), el conjunto situado entre ambos bordes (DNA-T con el transgen insertado) se transferirá al cromosoma de la planta, pues la información para su transferencia (genes vir) y las secuencias necesarias para su integración (extremos Bd y Bi) las hemos dejado intactas. Pero en este caso no se producirá un crecimiento tumoral, pues el DNA-T del plásmido desarmado carece de oncogenes. Si él de la opina se ha mantenido intacto, las células vegetales transformadas son detectables gracias a la producción de la opina correspondiente. Otras veces el transgen se inserta en medio del gen para la opina, con lo cual esta no se produce, pues se ha roto el gen que codifica su síntesis. Habrá que introducir en estos casos un gen marcador que permita seleccionar las células transformadas, por ejemplo un gen de resistencia a antibióticos o a herbicidas. El gen marcador permite sobrevivir a las células portadoras (transformadas) en medios en los que no sobreviven células no portadoras.



7.2 Métodos de transformación directa

La transformación mediada por *Agrobacterium* tiene limitaciones. Algunas plantas económicamente importantes, como los cereales, son sólo excepcionalmente susceptibles a la infección por *Agrobacterium*. Otras especies, aunque susceptibles, pueden ser sensibles al estrés fisiológico asociado al cocultivo con *Agrobacterium*. Por estos motivos se han desarrollado otros métodos de transformación, basados en la introducción directa de DNA en la célula vegetal. Sólo mencionamos a continuación uno de ellos, la transformación con cañón de partículas.

En un proyectil se sitúa una carga de microbolitas de oro o tungsteno que han adsorbido, en la solución adecuada, las cadenas de ADN que se quieren transferir. Al disparar, las bolitas penetran en las células y en los núcleos: la integración del ADN proyectado en el cromosoma receptor es una cuestión de azar, afinándose el resultado a base de ensayo y error. Así se pueden transformar cultivos de tejidos (evitando la especificidad de *Agrobacterium* por las dicotiledóneas) o meristemas, tanto en cultivo *in vitro*, como *in vivo* si se puede, en cuyo caso no sería necesario regeneración. Originalmente, el proyectil era una autentica bala. En la actualidad el disparo se hace con helio a presión. Se ha creado la palabra biolística para la transformación con cañón de partículas.



Los campos donde la transferencia horizontal ha sido por ahora más explotada son la resistencia a herbicidas, a plagas y a enfermedades. Existen variedades transgénicas de soja, maíz, algodón, colza y tabaco resistentes a herbicidas (principalmente glisofato, también glusofinato y bromoxinil). También se han desarrollado variedades transgénicas con genes Bt de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que confieren resistencia a lepidópteros, coleópteros y algunos dípteros. Como ejemplos podemos citar variedades de algodón resistentes al gusano de la capsula, de patata resistentes al escarabajo, de maíz al taladro y otros casos. En el campo de la resistencia a enfermedades se han desarrollado variedades de tomate resistentes a los virus del mosaico del tomate y del pepino, de patata al virus del enrollado y de soja y trébol a sus respectivos virus de mosaico, entre otros ejemplos. Otros logros destacables son las variedades transgénicas flavr sarv de tomate, a las que se les ha transferido un gen que bloquea la síntesis de galacturonasa, consiguiéndose así una más larga vida post-maduración. En cuanto a la mejora de la calidad nutritiva un ejemplo emblemático es el arroz dorado, rico en betacaroteno.

Estos ejemplos no deben inducir a error, en el sentido de entender que los campos a los que hacen referencia sólo son abordables mediante transferencia horizontal (transmisión de genes mediante transformación o transfección). Son muchas más las variedades resistentes a plagas y enfermedades que se han desarrollado utilizando exclusivamente las herramientas tradicionales de mejora, que son cruzamiento y la selección convencional. No así las resistentes a herbicidas, aunque también se trabaja en este carácter utilizando sólo herramientas tradicionales o selección *in vitro*.

Otro error muy común es hablar de métodos, programas o planes de mejora tradicionales (convencionales, clásicos o de campo) y métodos programas o planes especiales o de laboratorio. No cabe hablar de métodos clásicos o especiales. Si de herramientas clásicas (de campo) o especiales (de laboratorio). Las primeras son el cruzamiento y la selección convencional. Las segundas todo lo demás: cultivo *in vitro*, técnicas citogénicas, mutagénesis artificial, transferencia horizontal y uso de marcadores moleculares o de otro tipo. Un método, programa o plan es un conjunto de tareas programadas en el

tiempo y el espacio conducentes al desarrollo de una nueva variedad, en el que se pueden integrar diversas herramientas, entre las cuales rara vez faltarán las de campo. Parte del trabajo de la mejora puede hacerse en el laboratorio, pero no suele acabar ahí. En el campo hay que probar, depurar, adaptar, complementar, mejorar lo obtenido en el laboratorio. Muchas veces lo obtenido en el laboratorio es simplemente una fuente de variación (nada más y nada menos) que posteriormente tiene que ser manejada con herramientas de campo (el laboratorio la ha hecho asequible a las mismas) en un programa de mejora para llegar a obtener una variedad comercial.

Bibliografía

INTRODUCCIÓN A LA MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS

Cubero, J.I.

Mundi-Prensa. Madrid. 2003.

Capítulos 15, 16 y 17

MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LAS COSECHAS

Poehlman, J. M., Sleper, D. A.

Editorial Limusa. Mexico. 2003

Capítulos 5 y 8