

LUIS F. GARCÍA DEL MORAL GARRIDO

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL  
FUNDAMENTOS Y APLICACIONES

Granada, 2021

COLECCIÓN MANUALES MAJOR  
Serie Ciencias

© LUIS F. GARCÍA DEL MORAL GARRIDO  
© UNIVERSIDAD DE GRANADA  
ISBN: 978-84-338-6896-1  
Depósito legal: GR./1080-2021  
Edita: Editorial Universidad de Granada  
Campus Universitario de Cartuja. Granada  
Telf.: 958 243930-958 246220 ♦ editorial.ugr.es  
Maquetación: CMD Granada  
Diseño de cubierta: Tarma. Estudio Gráfico  
Imprime: Gráficas La Madraza, S.L. Albolote. Granada  
*Printed in Spain* *Impreso en España*

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley.

*Para Asma,  
mi maestra en tantas cosas*



# Índice de contenidos

	<u>Pág.</u>
PREFACIO .....	19
1 CONCEPTO Y ACTUALIDAD DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL. ....	21
Breve descripción histórica de los principales descubrimientos de la Biotecnología Vegetal .....	21
Objeto de la Biotecnología Vegetal. ....	24
Aplicaciones de la Biotecnología Vegetal.. ....	26
Situación actual de la Biotecnología vegetal. ....	26
2 BASES FISIOLÓGICAS DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	29
Diferenciación en células y tejidos vegetales .....	29
Totipotencia de las células vegetales . ....	30
Determinación celular.. ....	30
Competencia celular. ....	31
Control por las fitohormonas del crecimiento y desarrollo de los vegetales...	32
Regeneración <i>in vitro</i> .....	38
Influencia del material vegetal sobre el crecimiento y la regeneración ..	38
3 TÉCNICAS CONVENCIONALES DE SELECCIÓN VEGETAL: LOGROS Y LIMITACIONES. ....	41
Especies autóгамas, alógamas y con multiplicación vegetativa o clonal...	42
Caracteres genéticos sencillos y poligénicos . ....	45
Herencia cuantitativa... ..	46
Número de cromosomas y poliploidía .. ....	46
Métodos convencionales de mejora genética vegetal... ..	49
Heterosis, androesterilidad y producción de híbridos F <sub>1</sub> .. ....	51
Limitaciones de los métodos convencionales de mejora genética de plantas...	52
Aportaciones de la biotecnología a las técnicas de mejora genética vegetal...	54

4	ORGANIZACIÓN Y TÉCNICAS DE CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES. ....	57
	Tipos de cultivo <i>in vitro</i> .....	57
	Requerimientos para el cultivo <i>in vitro</i> .....	58
	Composición de los medios nutritivos .....	59
	Preparación de los medios de cultivo .....	67
	Esterilización de los medios nutritivos .....	68
	Factores fisicoquímicos de los medios de cultivo. ....	69
	Preparación y esterilización de los explantes .....	70
	Influencia de los factores físicos sobre el cultivo <i>in vitro</i> . ....	72
5	CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS VEGETALES <i>IN VITRO</i> .....	73
	Características fisicoquímicas del ambiente <i>in vitro</i> . ....	73
	Cultivo de callo. ....	75
	Fases del crecimiento <i>in vitro</i> .....	75
	Cuantificación del crecimiento <i>in vitro</i> .....	77
	Cultivo de células en suspensión .....	79
	Cultivo de células aisladas .....	80
	Cultivo de células fotoautótrofas .....	82
	Consecuencias del cultivo <i>in vitro</i> : alteraciones metabólicas .....	83
	Consecuencias del cultivo <i>in vitro</i> : alteraciones en células y tejidos .....	83
	Pardeamiento oxidativo .....	85
	Hiperhidratación o vitrificación .....	85
6	CONSECUENCIAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS: VARIACIÓN SOMACLONAL .....	87
	Variación somaclonal .....	87
	Algunos ejemplos de variación somaclonal .....	88
	Causas de la variación somaclonal. ....	88
	Cambios genéticos .....	89
	Cambios epigenéticos .....	91
	Factores que afectan a la variación somaclonal .....	92
	Aplicación de la variación somaclonal a la mejora vegetal. ....	94
7	MICROPROPAGACIÓN VEGETAL .....	97
	Ventajas e inconvenientes de la micropropagación .....	98
	Etapas de la micropropagación vegetal. ....	100
	Métodos de micropropagación .....	102
	Multiplicación de meristemos existentes .....	102
	Regeneración de explantes mediante organogénesis .....	104

Formación de raíces adventicias (rizogénesis).. .. .	105
Formación de vástagos adventicios (caulogénesis).. .. .	106
Embriogénesis somática .. .. .	107
Semillas sintéticas, artificiales o clonales... .. .	109
<b>8 OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE ENFERMEDADES . . . . .</b>	<b>113</b>
Obtención de plantas libres de virus . . . . .	113
Termoterapia. . . . .	114
Cultivo de meristemos. . . . .	114
Medio y condiciones de cultivo.. . . .	117
Termoterapia y cultivo de meristemos .. . . .	118
Formación de vástagos adventicios, seguida de cultivo de meristemos	119
Microinjerto de meristemos sobre plántulas libres de virus ... .. .	119
Crioterapia .. . . .	120
Electroterapia .. . . .	120
Identificación de los virus vegetales .. . . .	121
Obtención de plantas libres de hongos y bacterias .. . . .	122
<b>9 PRODUCCIÓN DE HAPLOIDES <i>IN VITRO</i> . . . . .</b>	<b>123</b>
Obtención de haploides mediante cultivo de anteras.. . . .	125
Factores de cultivo .. . . .	126
Problemas asociados .. . . .	128
Cultivo de granos de polen. . . . .	129
Albinismo .. . . .	130
Ginogénesis... .. .	130
Duplicación cromosómica de haploides .. . . .	132
Interés de la obtención de individuos haploides.. . . .	133
<b>10 CULTIVO Y RESCATE DE EMBRIONES.. . . .</b>	<b>137</b>
Escisión y aislamiento.. . . .	138
Composición del medio nutritivo... .. .	139
Aplicaciones prácticas del cultivo de embriones.. . . .	142
Cultivo de tejido nucelar . . . . .	144
La doble fecundación en las Angiospermas.. . . .	145
Cultivo de endospermo triploide ... .. .	146
<b>11 PROTOPLASTOS VEGETALES E HIBRIDACIÓN SOMÁTICA . . . . .</b>	<b>147</b>
Fuente de material vegetal.. . . .	147
Obtención y purificación . . . . .	149

Cultivo de protoplastos .....	150
Composición del medio de cultivo. ....	151
Factores fisicoquímicos .....	152
Viabilidad de los protoplastos aislados <i>in vitro</i> .....	152
Los protoplastos como sistema experimental .....	154
Regeneración de plantas a partir de protoplastos .....	154
Hibridación somática o parasexual .....	155
Fusógenos.. .....	155
Tipos de híbridos somáticos .....	157
Procedimientos de selección después de la hibridación somática.. ....	158
Aplicaciones de la fusión de protoplastos. ....	160
Desventajas y problemas de la hibridación somática .....	163
12 PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE METABOLITOS SECUNDARIOS .....	165
Rutas metabólicas primarias y secundarias .....	165
Metabolitos secundarios y diferenciación celular. ....	168
Principales metabolitos secundarios producidos por los vegetales y sus aplicaciones .....	169
Terpenos o isoprenoides.. .....	169
Fenoles... .....	171
Alcaloides.. .....	173
Cultivo <i>in vitro</i> para la producción de metabolitos secundarios .....	175
Biotransformaciones. ....	175
Síntesis multienzimáticas .....	176
Selección de líneas celulares altamente productivas .....	178
Estrategias para modificar el metabolismo secundario mediante modificación genética. ....	179
13 MÉTODOS DE CULTIVO PARA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN BIORREACTOR .....	181
Células en suspensión.. .....	181
Células inmovilizadas.. .....	181
Sistemas de inmovilización de células... .....	182
Imbibición . ....	183
Atrapamiento .....	183
Viabilidad de las células inmovilizadas .....	184
Sistemas de producción... .....	185
Características de los sistemas de producción.. .....	187
Optimización del sistema de producción .....	188
Viabilidad para la producción a nivel industrial.. .....	189
Permeabilización de células y remoción del producto .....	193

Cultivo de raíces...	194
Cultivo de tallos ...	194
Elicitación..	195
Conclusiones. ....	195
14 CONSERVACIÓN DE MATERIAL VEGETAL. ....	197
Conservación mediante cultivo <i>in vitro</i> . ....	197
Técnicas de crecimiento lento. ....	199
Criopreservación y crioprotección. ....	200
Genotipo, edad y naturaleza del material. ....	201
Precultivo ..	202
Velocidad de enfriamiento ..	203
Agentes crioprotectores ...	203
Descongelación. ....	205
Temperatura de almacenamiento ...	205
Técnicas de almacenamiento del material a criopreservar ..	206
Conservación de material genético ...	207
Semillas..	207
Callos. ....	208
Ápices de tallo ..	208
Embriones cigóticos y somáticos ...	209
Protoplastos ..	209
Anteras ..	210
Polen .	210
Bancos de ADN o genotecas ...	211
15 EL GENOMA VEGETAL. ....	213
Genoma nuclear ...	213
Genes ARNr nucleolares .	215
Los genes vegetales en comparación con los animales ...	216
Estructura y función del plastoma. ....	218
ADN cloroplastidial. ....	218
Ribosomas de cloroplastos y síntesis de proteínas...	220
Herencia citoplasmática cloroplastidial. ....	221
Regulación de la expresión de genes del cloroplasto...	221
Organización y función del ADN mitocondrial de las plantas...	222
Expresión génica mitocondrial ...	223
ADN promiscuo ...	224
Elementos transponibles y transposones...	225
Control de la expresión génica en plantas. ....	227

16	ANÁLISIS DEL GENOMA Y MARCADORES MOLECULARES EN PLANTAS .....	231
	<i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo genético y fisiológico.. ..	231
	Marcadores genéticos y moleculares en plantas... ..	232
	Marcadores morfológicos .....	233
	Marcadores citológicos .....	233
	Marcadores bioquímicos.. ..	233
	Marcadores moleculares o de ADN .....	234
	Características de los marcadores de ADN... ..	234
	Aplicaciones de los marcadores de ADN.. ..	235
	Principales marcadores de ADN más usados en plantas .....	235
	RFLPs ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> , polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción). .....	235
	RAPDs ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (polimorfismo de productos de ADN amplificados al azar).. ..	238
	AFLPs ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphisms</i> , polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados aleatoriamente).. ..	239
	SSRs Minisatélites y microsátélites ( <i>Simple Sequence Repeats</i> ) o STRs ( <i>Short Tandem Repeats</i> ).. ..	241
	Comparación de marcadores genéticos .....	243
	Análisis de caracteres de herencia cuantitativa (Quantitative Trait Loci o QTLs) .....	243
	Mejora genética asistida por marcadores moleculares (MAS) .....	245
	Genómica... ..	246
	Genómica estructural: aproximaciones al análisis del genoma .....	247
	Mapas genéticos y su utilidad .....	248
	Resultados de la comparación de genomas... ..	248
	Genómica funcional .....	249
	Transcriptómica .....	250
	Proteómica. ....	250
	Metabolómica .....	251
	Fenómica .....	251
	Bioinformática... ..	251
17	MODIFICACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS .....	253
	Genética convencional e ingeniería genética. ....	253
	Plantas transgénicas. ....	254
	Tipos de modificaciones de plantas mediante ingeniería genética. ....	254
	Diseño de genes para la transformación .....	256
	Gen promotor .....	256
	Secuencia de terminación .....	257
	Gen marcador, reportero o testigo .....	259

Gen seleccionador .....	260
Secuencias auxiliares.....	260
Casete de expresión.....	261
Obtención de una planta transgénica. ....	261
18 AGROBACTERIUM Y EL PLÁSMIDO TI.....	265
Infección por <i>Agrobacterium</i> .....	265
Naturaleza del plásmido Ti. ....	266
Origen de los genes localizados en el ADN-T .....	270
Transferencia del ADN-T a la célula vegetal .....	270
Observaciones importantes respecto a la infección por <i>Agrobacterium</i>	273
Esquema general de la transferencia del ADN-T .....	
19 AGROBACTERIUM Y VIRUS COMO VECTORES DE GENES .....	275
El plásmido pGV3850 .....	276
Vectores cointegrativos o recombinativos. ....	277
Vectores binarios .....	278
Ventajas de los vectores binarios .....	279
Vectores super-binarios .....	280
Vectores con el transgen, marcador y seleccionador en plásmidos dife-	
rentes .....	280
Métodos de transformación con <i>A. tumefaciens</i> . ....	281
Ventajas y dificultades de los vectores con <i>Agrobacterium</i> .....	282
Otros métodos con <i>Agrobacterium</i> .....	283
Sistema <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	284
Virus ADN como vectores de genes .....	285
Caulimovirus .....	286
Geminivirus.....	286
20 MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DIRECTA DE ADN .....	289
Vectores de clonación para transformación directa .....	289
Transformación de protoplastos. ....	290
Transferencia de ADN mediada por compuestos químicos .....	290
Transferencia de ADN mediada por liposomas .....	291
Electroporación. ....	292
Microinyección .....	293
Transformación de células completas .....	293
Abrasión con fibras de carburo de silicio .....	294
Transformación mediada por microláser .....	294
Ultrasonificación o sonoporación .....	294

Femtoinyección. ....	295
Biolística o biobalística ....	295
Principales limitaciones de las técnicas de transformación. ....	297
Transformación de cloroplastos: Plantas transplastómicas. ....	297
Ventajas de la transformación de cloroplastos. ....	299
Transformación de mitocondrias ....	300
21 APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL A LA MEJORA DEL METABOLISMO FOTOSINTÉTICO Y DEL NITRÓGENO. ....	301
Modificación del metabolismo vegetal .....	302
Metabolismo fotosintético .....	303
Actuaciones sobre la actividad enzimática .....	304
Introducción de la vía $C_4$ en cultivos $C_3$ .....	306
Ingenierización de carboxisomas de cianobacterias o pirenoides de algas en plantas $C_3$ .....	307
Actuaciones sobre los componentes del sistema fotoquímico .....	308
Relajación más rápida del mecanismo de fotoprotección .....	308
Aumento del Complejo citocromo <i>b<sub>f</sub></i> .....	309
Ampliación del espectro de absorción de luz fotosintéticamente activa .....	309
Cambios en el tamaño de la antena de los fotosistemas.. ....	310
Aumento de la captación de $CO_2$ .....	310
Metabolismo del nitrógeno. ....	312
Transferencia directa de la nitrogenasa bacteriana a cereales y otras plantas de cultivo .....	313
Ingeniería de la biosíntesis de nitrogenasa en células vegetales .....	313
Ingeniería de la nitrogenasa para prevenir su inactivación por oxígeno...	315
Simbiosis de leguminosas en la ingeniería en cereales .....	315
Utilización de endófitos bacterianos asociados naturalmente a los cereales .....	317
22 APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA A LA MEJORA DE LOS PRODUCTOS VEGETALES .....	319
Mejora del contenido proteico .....	319
Mejora del contenido lipídico .....	322
Biofortificación de cultivos.. ....	324
Biofortificación con Fe .....	325
Biofortificación con Zn. ....	325
El arroz dorado. ....	326
Otras mejoras nutricionales. ....	327
Mejora para cualidades organolépticas .....	329
Mejora para las industrias de transformación .....	329
Mejora de la calidad tecnológica .....	330



Resistencia a virus ... ..	367
Agronobioteconología ... ..	368
Resistencia frente a estreses abióticos ... ..	368
26 IMPLICACIONES AMBIENTALES Y SOCIALES DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL ... ..	373
Transgénicos y sociedad.. ..	374
Argumentos en contra de los cultivos modificados genéticamente ... ..	374
Seguridad alimenticia de los transgénicos ... ..	375
La resistencia a antibióticos ... ..	376
Efectos medioambientales... ..	377
El escape de genes ... ..	377
La contaminación génica ... ..	377
La coexistencia de cultivos GM, convencionales y ecológicos ... ..	380
Presión selectiva del cultivo transgénico sobre los patógenos a controlar...	381
Efectos secundarios potenciales sobre organismos no perjudiciales.. ..	382
Pérdida de biodiversidad agrícola . ... ..	383
Los transgénicos no son antinaturales... ..	384
El control por las grandes multinacionales ... ..	384
Crítica no justificada científicamente en contra de los cultivos GM .. ..	385
Conclusiones . ... ..	386
BIBLIOGRAFÍA... ..	389
ÍNDICE DE TABLAS ... ..	399

# Prefacio

*Vivimos en una sociedad absolutamente dependiente  
de la ciencia y la tecnología y, sin embargo,  
nos las hemos arreglado para que casi  
nadie entienda la ciencia y la tecnología.  
Y esa es una receta clara para el desastre*

Carl Sagan

ESTE texto está dirigido a quienes estudian Biotecnología Vegetal y asignaturas afines en la Universidad de Granada y recoge las lecciones y mi experiencia acumuladas durante veintitrés años de docencia de esta disciplina, primero en la titulación y luego en el grado de Bioquímica y, modernamente, en el Grado de Biotecnología, así como en los Programas de Doctorado y Másteres del Instituto de Biotecnología y del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Granada.

Por ello, en la mayoría de ocasiones, el texto está estructurado de acuerdo a las lecciones explicadas en clase, siguiendo un esquema didáctico que procura ofrecer la mayor claridad y concisión en cada apartado, con objeto de facilitar su comprensión y asimilación por el estudiantado, aunque sin descuidar la necesaria profundidad y rigor científico en cada uno de los temas, donde se ha puesto al día la información más relevante.

El término Biotecnología comenzó a utilizarse en los años 70 para referirse a una serie de aplicaciones derivadas especialmente de la Genética, Fisiología, Bioquímica, Microbiología, Biología Molecular y Tecnología del ADN recombinante, técnica comúnmente conocida como Ingeniería Genética. En un contexto amplio, por Biotecnología se entiende «la aplicación de sistemas biológicos y organismos a los procesos técnicos e industriales» y como Biotecnología Vegetal «la aplicación de los fundamentos y técnicas del cultivo *in vitro* de material vegetal, de la Biología Molecular y de la Ingeniería Genética al conocimiento, mejora y productividad de las plantas con fines agrícolas e industriales». En este libro, se tratarán las materias

fundamentales de la Biotecnología Vegetal, incluyendo el cultivo *in vitro* de células y tejidos, la transformación de plantas mediante ingeniería genética y sus principales aplicaciones, su repercusión sobre la sociedad y sus perspectivas de futuro.

Finalmente, quisiera dejar constancia de mi agradecimiento a mis estudiantes de Bioquímica, de Biotecnología y de Máster y Doctorado. A lo largo de todos estos años de docencia, su espíritu crítico, sus preguntas, sus sugerencias, sus discusiones y debates, me han enriquecido y han supuesto para mí un constante estímulo de superación y de estudio, para tratar de ofrecerles la mejor docencia posible. A todas ellas y ellos, muchas gracias.

# 1 Concepto y actualidad de la Biotecnología Vegetal

ENTRE las muchas definiciones de Biotecnología Vegetal, considero como la más ajustada a los objetivos de este texto la siguiente: «Aplicación de los fundamentos y técnicas del cultivo *in vitro* de material vegetal, de la Biología Molecular y de la Ingeniería Genética al conocimiento, mejora y productividad de las plantas». Esta definición no sólo tiene en cuenta las aplicaciones de la Biotecnología Vegetal a la mejora de las plantas, sino que también enfatiza su aplicación al progreso del conocimiento de procesos fisiológicos de los vegetales tan complicados como la floración, el crecimiento y desarrollo de los tejidos y órganos, la respuesta a las fitohormonas, la fructificación o la senescencia y la apoptosis celular, por citar sólo algunos. De esta manera, el objetivo de la Biotecnología Vegetal lo constituye la «modificación de las plantas con propósitos de investigación o de obtención de individuos mejorados». En efecto, gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* y de transformación genética y a la adopción de *Arabidopsis thaliana* como modelo en Fisiología y Genética de plantas, el conocimiento de los procesos fisiológicos de los vegetales ha experimentado un avance tan espectacular que, en apenas veinte años, los modernos tratados de Fisiología Vegetal son muy diferentes de sus predecesores. De hecho, puede afirmarse que la obtención de cultivos transgénicos constituye aproximadamente sólo un 10% de las aplicaciones de la Biotecnología Vegetal, orientándose el resto a la investigación y a las diferentes aplicaciones del cultivo *in vitro*.

## BREVE DESCRIPCIÓN HISTÓRICA DE LOS PRINCIPALES DESCUBRIMIENTOS DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

La posibilidad de cultivar células y tejidos vegetales *in vitro* parte de los trabajos de Sachs y Knop en 1860, quienes establecieron las bases químicas de la nutrición vegetal, al descubrir que las plantas podían vivir en una solución de diferentes sales minerales. El cultivo celular, como se conoce en la actualidad, se inicia con los trabajos de Haberlandt en 1902, quien utilizando la solución de

Knop, fue el primero que cultivó células aisladas completamente diferenciadas de diversos tejidos vegetales, observando que estas células crecían en extensión y grosor, pero no se dividían. Igualmente, enuncia la teoría de la totipotencia de la célula vegetal, inherente en la famosa Teoría Celular propuesta por Schleiden (1838) y Schwann (1839). Posteriormente, numerosos investigadores, bien individualmente o trabajando en equipo, han contribuido a elaborar los conocimientos que han permitido desarrollar la moderna Biotecnología Vegetal. A continuación, presentamos una breve cronología, necesariamente incompleta, de los avances más significativos a lo largo de su historia.

- 1860 Sachs y Knop establecen las bases químicas de la nutrición vegetal, al descubrir que las plantas podían vivir sin suelo en una solución de diferentes sales minerales.
- 1902 Haberlandt, usando la solución de Knop, cultiva por primera vez células aisladas de diversos tejidos vegetales.
- 1904 Hannig cultiva embriones aislados de crucíferas.
- 1922 Knudson consigue germinar *in vitro* semillas de orquídeas sin necesidad de su micorriza simbiótica.
- 1925 Laibach demuestra la utilidad del cultivo de embriones inmaduros para obtener híbridos en especies de lino sexualmente compatibles.
- 1934 Kögl y Haagen-Smith identifican el ácido indol acético (AIA) como la sustancia descubierta por Went en 1926 y que provocaba la curvatura de coleoptilos de avena.
- 1935 Snow demuestra que el AIA estimulaba *in vitro* la actividad del cambium, mejorando la proliferación de los tejidos y haciendo posibles los subcultivos.
- 1937 White formula el primer medio sintético para cultivo *in vitro* (WM).
- 1939 White con tejido de tabaco, y Nobecourt y Gautheret con tejido de zanahoria, anuncian el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales por períodos de tiempo ilimitados.
- 1943 White observó que en algunos casos, subcultivos de raíces de tomate infectadas desarrollaban tejidos sanos, con meristemas libres de virus.
- 1943 White publica "*A handbook of plant tissue culture*", primer manual de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.
- 1944 Skoog descubre que callos de tabaco podían regenerar tallos y raíces, mediante regulación hormonal.
- 1944 Avery, McLeod y McCarty identifican el ADN como el material portador de la información genética.
- 1948 Bárbara McClintock descubre los elementos móviles o transposones en el maíz.
- 1952 Morel y Martin desarrollan la técnica del cultivo de meristemas y consiguen obtener plantas de dalia libres de virus.
- 1953 Watson y Crick describen la estructura tridimensional de la doble hélice del ADN.
- 1955 Miller y cols. descubren la primera citoquinina (quinetina) al autoclavar esperma de peces.

- 1957 Skoog y Miller describen el control químico de la organogénesis *in vitro* de raíces y tallos mediante la modificación de la concentración relativa de auxinas y citoquininas.
- 1958 Steward (USA) y Reinert (Alemania), trabajando independientemente, informan de la formación de embriones por células somáticas de zanahoria (embriogénesis somática).
- 1960 Morel describe un método para clonar rápidamente orquídeas *in vitro* (micropropagación).
- 1960 Cocking aísla protoplastos vegetales utilizando una mezcla de enzimas fúngicas.
- 1962 Murashige y Skoog publican el medio más conocido y difundido para el cultivo de tejidos vegetales (medio MS).
- 1964 Guha y Maheshwari obtienen las primeras plantas haploides de *Datura* mediante cultivo de anteras.
- 1965 Vasil y Hildebrand consiguen la regeneración de plantas completas a partir de células aisladas de tabaco.
- 1970 Power y cols. publican la primera fusión de protoplastos vegetales.
- 1970 Borlaug recibe el Nobel de la Paz por su contribución a la Revolución Verde mediante introducción de genes de enanismo en los cereales.
- 1970 Werner, Smith y Nathans descubren las endonucleasas de restricción.
- 1971 Heinz and Mee informan de variación somaclonal en plantas regeneradas desde cultivo de callo de caña de azúcar.
- 1971 Takebe y cols. consiguen regenerar plantas desde protoplastos aislados de tabaco.
- 1972 Carlson y cols. obtienen los primeros híbridos somáticos mediante fusión de protoplastos aislados de diferentes especies, abriendo el camino a la hibridación somática como herramienta para la mejora vegetal.
- 1974 Zaenen y cols. identifican el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* como el factor causante de la enfermedad de la agalla de cuello.
- 1976 Seibert consigue la regeneración de tallos desde meristemas criopreservados.
- 1977 Chilton y cols. demuestran que sólo una parte del plásmido Ti de *A. tumefaciens* es responsable de la formación de la agalla de cuello.
- 1977 Bolívar y Rodríguez obtienen el plásmido pBR322, una de las construcciones más difundidas en la elaboración de vectores para transformación genética.
- 1978 Melchers y cols. obtienen “pomates”, plantas resultantes de la hibridación somática entre patata y tomate.
- 1981 Larkin and Scowcroft introducen el término variación somaclonal.
- 1981 Zimmermann consigue la electrofusión de protoplastos.
- 1982 Krens y cols. informan de la incorporación de ADN desnudo por los protoplastos, haciendo posible la transformación con ADN aislado.
- 1983 Los grupos de Mary Dell Chilton (USA) y Marc van Montagu (Bélgica) publican, con sólo un mes de diferencia, la expresión de genes quiméricos en tejido vegetal mediante un vector basado en el plásmido Ti de *Agrobacterium*.

- 1984 Horsch y cols. producen la primera planta transgénica de tabaco mediante co-cultivo de discos de hoja con *Agrobacterium tumefaciens*.
- 1985 Weinberg publica un método para la clonación de genes, avance trascendental para la ingeniería genética.
- 1986 Mullis y cols desarrollan la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 1986 Abel y cols. obtienen las primeras plantas transgénicas con caracteres agronómicos útiles.
- 1987 Sanford y cols. describen la técnica de bombardeo con microproyectiles (biolística) para transferir ADN directamente a células vegetales.
- 1987 Fujita y Tabata desarrollan un proceso comercial para la producción de shikonina por cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon*.
- 2000 Potrykus y cols. obtienen el arroz dorado.
- 2000 Secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana*.
- 2002 Secuenciación del genoma de las dos subespecies *indica* y *japonica* del genoma del arroz (*Oryza sativa*).
- 2004 Se autoriza por la UE el uso de maíz Bt, resistente al taladro.
- 2007 Más de 100 millones de Has de transgénicos en 22 países.
- 2008 Se secuencian por primera vez una planta transgénica (papaya resistente a virus).
- 2010 Se aprueba por la UE el cultivo de una patata transgénica (Amflora) para la producción industrial de almidón con amilopectina pura.
- 2011 Publicado el primer "Interactoma" (mapa sistemático de interacciones entre proteínas) en *Arabidopsis*, por el *Arabidopsis Interactome Mapping Consortium* (AIMC).
- 2012 Se aprueba en USA el primer medicamento producido por zanahorias genéticamente modificadas para uso en pacientes con enfermedad de Gaucher.
- 2015 CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*): Técnica para edición de genomas y sustitución o eliminación de genes en plantas.
- 2015 Kyndt y cols. informan que el genoma de la batata contiene genes Ti de *Agrobacterium*, siendo el primer ejemplo de un cultivo naturalmente transgénico.
- 2016 Secuenciación del genoma del té, compuesto en un 67% por retrotransposones
- 2017 Secuenciación del genoma del *Pinus taeda*, el mayor genoma jamás secuenciado con 22.180 millones de bases, es decir, siete veces mayor que el genoma humano.
- 2018 Secuenciación del genoma del trigo.
- 2019 Se aprueba en Filipinas el consumo del arroz dorado
- 2020 Charpentier y Doudna galardonadas con el Nobel de Química por desarrollar la técnica de edición genética CRISPER/Cas9.

## OBJETO DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Como hemos comentado, la Biotecnología Vegetal se dirige a la modificación de las plantas con dos propósitos principales:

1. Estudiar las rutas metabólicas que determinan aspectos fisiológicos o morfológicos en los vegetales.

2. Obtener plantas mejoradas mediante adición de caracteres no propios, potenciando caracteres propios o suprimiendo caracteres no deseables.

Para llevar a cabo estas modificaciones se necesita:

1. La identificación y el aislamiento de genes adecuados y deseables para mejorar genéticamente las especies vegetales.
2. El diseño de sistemas que: (a) permitan introducir dichos genes deseables en las células receptoras y (b) seleccionar las células transformadas.
3. La regeneración de plantas completas y viables a partir de esas células transformadas.
4. La expresión estable en las células y plantas transformadas de la información genética transferida.

Para este propósito se requieren dos grandes grupos de técnicas:

Las basadas en la Biología Celular, la Fisiología Vegetal y la Bioquímica, que han posibilitado el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, permitiendo el control y la modificación del desarrollo y proliferación celular para conseguir la regeneración de plantas completas a partir de trozos de tejido o, incluso, desde células individuales. Este grupo de técnicas permite:

1. El desarrollo de medios y condiciones que facilitan el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, la obtención de metabolitos secundarios en biorreactor, la regeneración de órganos y organismos enteros (transformados o no genéticamente), y la obtención de individuos haploides, de gran utilidad en la mejora genética de plantas.
2. La multiplicación vegetativa de plantas *in vitro*, que permite obtener rápidamente y de forma indefinida, plantas exentas de enfermedades y homogéneas desde el punto de vista genético, a partir de fragmentos de yemas, tallos u otros órganos de variedades seleccionadas.
3. El aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos, que pueden: (a) incorporar ADN exógeno de igual o distinta especie (transformación de protoplastos) y (b) pueden fusionarse entre sí (hibridación somática), lo que permite obtener híbridos entre especies muy diferentes, y combinar el ADN nuclear de una especie o variedad con el ADN de los cloroplastos y mitocondrias de otras.

Las basadas en la Ingeniería Genética: Conjunto de técnicas que permiten aislar genes o fragmentos de ADN y transferirlos de un organismo a otro. La Ingeniería genética permite:

1. La Identificación y el aislamiento de genes de potencial interés agrícola (no necesariamente de plantas).
2. La caracterización estructural y la regulación de esos genes.

3. La construcción de genes cuya expresión pueda ser controlada en el tiempo (dentro del desarrollo de la planta) y en el espacio (el órgano o tejido vegetal elegido).
4. La introducción de los genes en la planta mediante técnicas de transformación genética.

Es importante indicar que ambos grupos de técnicas son complementarias y se condicionan unas a otras, ya que para obtener una planta transgénica, generalmente es necesario introducir los nuevos genes en una célula o conjunto de células y una vez comprobada que la transformación es estable, es necesario regenerar mediante cultivo *in vitro* una planta completa a partir de esas células transformadas. Por ello, antes de proceder con la ingeniería genética, es necesario poner a punto el protocolo de regeneración *in vitro* de la planta a transformar, ya que en caso contrario no es posible obtener la planta transgénica y los resultados de la transformación genética no pasarían del nivel celular o tisular. Precisamente, la independencia de la transformación genética de los métodos de regeneración mediante cultivo *in vitro*, es uno de los grandes desafíos que tiene planteados la obtención de plantas transgénicas en la actualidad.

#### APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

De todo lo anterior, podemos concluir que las principales aplicaciones de la Biotecnología Vegetal se pueden clasificar como:

- a) Investigaciones en el campo de la genética, fisiología, botánica, agronomía y mejora vegetal.
- b) Aplicaciones agrícolas. Plantas transgénicas resistentes a plagas, enfermedades y estreses abióticos; mejora de la productividad y calidad nutritiva de los cultivos; micropropagación y clonación de especies vegetales; obtención de individuos haploides; rescate de embriones; conservación de germoplasma vegetal y de la biodiversidad agrícola; obtención de plantas libres de enfermedades y selección asistida por marcadores moleculares.
- c) Aplicaciones industriales y farmacológicas. Colorantes; metabolitos secundarios de uso en la industria química y farmacéutica; fragancias y perfumes; aditivos agroalimentarios; insecticidas biológicos; aceites más cardiosaludables; bioplásticos biodegradables; enzimas de uso industrial; planticuerpos y vacunas de uso animal y humano.

#### SITUACIÓN ACTUAL DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Entre las prioridades que actualmente tiene planteadas la Biotecnología Vegetal podemos destacar:

- a) Independizar la transferencia de genes de los métodos de cultivo de células, bien mediante transferencia de polen transgénico a células reproductoras o por inyección directa o agroinfiltración a inflorescencias jóvenes. Ello economizaría tiempo, esfuerzo y medios en la producción de plantas transgénicas.
- b) El aislamiento y caracterización, en número creciente, de genes vegetales y reconocimiento de segmentos de ADN responsables de la expresión en plantas de genes específicos.
- c) La transferencia a plantas cultivadas de genes que confieran resistencia a virus, insectos, herbicidas, y factores de estrés (salinidad, sequía, altas o bajas temperaturas, fotooxidación, metales pesados y xenobióticos fitosanitarios), con objeto de incrementar su productividad y adaptación a las nuevas condiciones derivadas del cambio climático y de la creciente contaminación ambiental.
- d) La transformación estable de cloroplastos (transplastómica) y mitocondrias.
- e) El desarrollo de técnicas para optimizar la agricultura molecular.
- f) La implementación de estrategias de control biológico para reducir el uso de pesticidas y fitosanitarios.
- g) La producción por las plantas de compuestos de uso farmacológico y de vacunas y anticuerpos.
- h) La producción de cultivos energéticos no contaminantes.
- i) El desarrollo de sistemas de cultivo que permitan la producción vegetal en el espacio interestelar o en planetas cercanos.
- j) La aplicación de la técnica CRISPR-CAS al desarrollo de cultivos mejorados.

## LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL EN ESPAÑA

En nuestro país y de acuerdo a las diferentes estrategias y planes de I+D+i, las principales actuaciones pueden resumirse en:

- a) **Genómica estructural**, principalmente:
  - Secuenciación de genomas modelo o de transcriptomas de especies de interés agronómico para España.
  - Elaboración de mapas genéticos de alta resolución.
  - Genómica comparativa, incluyendo aproximaciones evolutivas, ecológicas, funcionales y con aplicaciones biotecnológicas.

**b) Genómica funcional**, específicamente:

- Utilización de los recursos genómicos resultantes de los proyectos de secuenciación para obtener cantidades masivas de datos sobre la regulación y la expresión en sistemas celulares completos.
- Predicción de genes, asignación de su función, detección de agrupaciones de genes y de sus regiones reguladoras.
- Identificación génica y clonaje posicional de genes en las especies de mayor relevancia económica en España.

**c) Proteómica**, con los objetivos de:

- Avanzar en la implementación de nuevas técnicas de identificación y análisis de proteínas en el contexto de los proyectos genómicos.
- Monitorización de los niveles y modificaciones de todas las proteínas de una célula o conjunto de células.
- Catálogo sistemático de las interacciones celulares entre proteínas.
- Desarrollo de la química combinatorial y de peptidotecas.
- Resolución estructural de sistemas de proteínas cuya importancia funcional haya sido caracterizada previamente, incluyendo la resolución por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), rayos X o microscopía electrónica de alta resolución.

**d) Agroalimentación**, específicamente:

- Potenciar actuaciones para la aplicación de la nanotecnología y bioinformática a la elaboración, transformación y conservación de productos agrícolas.
- Desarrollo de alimentos seguros para la salud y de nuevos alimentos funcionales y nutracéuticos.
- Calidad nutricional de alimentos y sustancias bioactivas en relación con la salud y bienestar de los consumidores.
- Desarrollo de nuevas fuentes de proteínas vegetales.

En España, entre las principales asociaciones relacionadas con la Biotecnología Vegetal figuran la Sociedad Española de Biotecnología (<http://www.sebiot.org>), la Sociedad Española de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales (<http://www.ivia.es/secivtv/>), la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (<http://www.sefv.net/>) y la Fundación Antama (<https://fundacion-antama.org/>). Estas instituciones publican periódicamente noticias, boletines y monografías sobre temas relacionados con la Biotecnología Vegetal.