

CAPÍTULO **17**

**SELECCIÓN IN VITRO
PARA ESTRESSES
ABIÓTICOS**

José Luis Couelo

Ana M. Vieitez

Antonio Ballester

SELECCIÓN IN VITRO PARA ESTRESSES ABIÓTICOS

José Luis Couselo, Ana M. Vieitez y Antonio Ballester

Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC

Apartado 122, 15080 Santiago de Compostela. E-mail: aballester@iiag.cesga.es

17.1. INTRODUCCIÓN

Los estreses abióticos, como salinidad, sequía, temperaturas extremas, toxicidad química, etc., son la causa primaria de la pérdida del 50% de los cultivos en todo el mundo (Bray et al., 2000). Las respuestas de las plantas a estos tipos de estreses provocan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan de forma negativa al crecimiento de las plantas y a su productividad y mediante programas específicos de mejora vegetal se trata de conseguir el desarrollo de plantas capaces de soportar el efecto adverso de los estreses abióticos.

El cultivo in vitro de tejidos vegetales es una herramienta que se utiliza no sólo en la propagación clonal a gran escala de especies con características determinadas sino también en la generación de variabilidad genética mediante procesos como el de la variación somaclonal, la mutagénesis in vitro, el desarrollo de haploides e híbridos somáticos, el rescate de embriones y la transformación genética (Dita et al., 2006). El uso del cultivo in vitro en la selección para estreses abióticos proporciona, de forma fundamental, variabilidad y esta variabilidad debe ser explotada en toda su amplitud en los programas de mejora convencional. Por tanto, la correcta identificación de la variabilidad originada bajo condiciones de in vitro, es un aspecto importante al objeto de evitar la posible eliminación de material valioso que podía integrarse en los programas clásicos de mejora (Zhu et al., 2000). Para que pueda aplicarse con eficacia, es condición necesaria que el cultivo in vitro de tejidos vegetales sea capaz de regenerar plantas completas que puedan ser aclimatadas y cultivadas en el exterior. Desgraciadamente, hay especies (entre ellas muchas leguminosas, especies leñosas, etc.) que son realmente recalcitrantes a la regeneración, un proceso que aún hoy en día se basa en aproximaciones empíricas por combinación de diferentes medios de cultivo, reguladores de crecimiento, pH del medio, condiciones ambientales de crecimiento, etc. Sin embargo, sin un sistema de regeneración apropiado y que esté bien definido, la aplicación de las técnicas de selección in vitro (independientemente del tipo de estrés que se estudie) podrían ser totalmente ineficaces.

La selección in vitro se utilizó con profusión en los años 80 pero no llegaron a desarrollarse cultivares resistentes o tolerantes a estreses abióticos que fueran utilizados por los agricultores (Rowland et al., 1989). Posiblemente este hecho sea consecuencia del carácter multigénico de las respuestas de las plantas al estrés abiótico, al contrario de lo que sucede en el caso del estrés biótico, dependiente en muchos casos de caracteres monogénicos. Las complejas respuestas genéticas del estrés abiótico son difíciles de controlar, por ello, el uso de variantes dentro de los programas de mejora (Zhu et al., 2000; Flowers, 2004) y la transformación genética pueden ser de gran ayuda y parecen ser los caminos más prometedores (Vinocur y Altman, 2005).

Se describen a continuación algunas de las técnicas del cultivo in vitro de tejidos vegetales que pueden utilizarse en la selección de variantes para estreses abióticos.

17.2. VARIACIÓN SOMACLONAL

El término de variación somaclonal fue acuñado por Larkin y Scowcroft (1981) para explicar la variación que se genera en el cultivo de células somáticas, en las plantas regeneradas y en sus progenias. Según sea el origen de las células o los tejidos cultivados la variación puede tener diferentes nominaciones: la variación protoclonal (producida por el cultivo de protoplastos), variación gametoclinal (anteras y microsporas), variación calliclinal (callos), variación mericlinal (meristemas apicales), variación somaclonal (mediante el cultivo de hojas, tallos, raíces u otros tejidos somáticos). La variación somaclonal puede inducirse por diferentes métodos, entre los que se incluyen:

- I) el cultivo de callos y suspensiones celulares durante varios ciclos;
- II) mediante la regeneración de un gran número de plantas derivadas de cultivos desarrollados durante largos períodos de tiempo;
- III) sometiendo los cultivos a tratamientos de estrés tanto abiótico como biótico;
- IV) mediante la multiplicación durante largos ciclos de especies que pueden originar variantes.

La variación es impredecible y puede ser heredable (genética) o no heredable (epigenética). No se conoce si la variación somaclonal es el resultado de la existencia de diferencias genéticas en algunas células somáticas o es inducida por componentes específicos del medio de cultivo. El desarrollo de variación somaclonal está asociado a mutaciones puntuales, reordenamiento y recombinación cromosómica, metilación del DNA, alteración en el número de secuencias, etc. y parece estar influenciada por el genotipo, el tipo de explanto, el medio de cultivo, la edad de la planta de donde se iniciaron los cultivos, etc. (Veilleux y Jonson, 1998). La especie vegetal y el número de subcultivos al que se someten los explantos durante el cultivo in vitro son otros aspectos que afectan al proceso. El propio sistema de cultivo puede actuar como un sistema mutagénico ya que las células pasan por una experiencia traumática una vez que son aisladas y pueden reprogramarse durante la regeneración de una forma diferente a como lo hacen en condiciones naturales. La reprogramación de eventos puede crear un amplio rango de variación epigenética (Jain, 2000) y aunque la variación somaclonal es difícil de controlar, hay especies (por ejemplo plantas solanáceas) que tienen una mayor tendencia a producirla; el tipo de cultivo afecta de forma notable a la variación: el cultivo de células aisladas o callos no diferenciados es más proclive a la variación que el cultivo de meristemas ya formados (yemas apicales y axilares) y la reducción del número de subcultivos reduce también la probabilidad de la inducción de variabilidad. Es posible que una combinación de las condiciones del cultivo y los factores genéticos den como resultante la aparición de la variación somaclonal (Brar y Jain, 1998).

Aunque la naturaleza heredable de la variación somaclonal se ha puesto de evidencia, también puede existir, como hemos dicho, la variación debida a cambios epigenéticos. La tecnología del cultivo in vitro no ha sido incorporada rutinariamente a los programas de mejora ya que algunos investigadores temen que la ocurrencia incontrolada de la variación somaclonal pueda arruinar sus valiosos stocks genéticos. Sin embargo, un mejor control y conocimiento de los mecanismos de la variación somaclonal puede ser de gran ayuda en los programas de mejora por la gran variabilidad que se origina a través del proceso (Jain, 2001).

El control y aprovechamiento de la variación somaclonal tienen a día de hoy un apoyo notable en el uso de las técnicas moleculares que permiten una identificación eficaz de los somaclones. Aparte los caracteres morfológicos, los marcadores bioquímicos (isoenzimas) y/o moleculares (RAPD, SSR, RFLP, AFLP, etc.) pueden ser utilizados en los programas de mejora a través de la selección asistida por marcadores.

Entre las posibilidades que ofrece la existencia de la variación somaclonal pueden citarse el aumento de la variabilidad genética de caracteres agronómicos, la posibilidad de hacer una selección de somaclones in vitro, el desarrollo de germoplasma élite y nuevos cultivares comerciales, el aumento de la introgresión de genes foráneos en especies cultivadas y la mejora de plantas ornamentales. Por el contrario también se han identificado algunas desventajas entre las que pueden citarse la pobre capacidad de regeneración de cultivos viejos (muchos años de subcultivos), la capacidad de regeneración es restringida y no es factible en todos los genotipos, algunos somaclones son inestables después de los cruzamientos convencionales, algunos desarrollan características indeseables como aneuploidía, esterilidad, etc., muchas veces la variación obtenida no es novedosa y, finalmente, la variación somaclonal es difícil de predecir (Brar y Jain, 1998).

La investigación futura debería dirigirse a descifrar los mecanismos que regulan la variación somaclonal, de tal forma que, por una parte, puedan producirse somaclones deseables y, por otra, pueda minimizarse la variación somaclonal durante la propagación clonal y durante el desarrollo de plantas transgénicas. Debería darse un impulso especial para tratar de aislar un mayor número de somaclones con uno o dos cambios en los caracteres deseados que, por otra parte, estén ausentes en cultivares bien adaptados de cultivos importantes. También sería interesante explorar la variación somaclonal en especies que se propagan vegetativamente, especialmente aquellas que tienen una base genética muy estrecha y aquellas que son difíciles de mejorar mediante los sistemas convencionales de mejora.

17.3. MUTAGÉNESIS

La mayoría de la variación genética explorada en programas de mejora ha ocurrido de forma espontánea y esta variabilidad suele almacenarse en colecciones de germoplasma. Sin embargo, cuando estas colecciones no facilitan un alelo determinado o la especie que porta el carácter deseado está filogenéticamente muy distante para utilizar en los programas de mejora, las mutaciones inducidas suministran una herramienta muy útil en el desarrollo de caracteres deseados. Alrededor de 2385 variedades mutantes se han liberado de forma oficial, el 70% fueron liberadas como mutantes directos y el 30% después de un programa de cruzamientos (Maluszynski et al. 2000). La mutagénesis causa cambios aleatorios en el DNA nuclear o en los orgánulos citoplásmicos originando mutaciones a nivel de secuencia, cromosomas o del genoma (deleciones, translocaciones, duplicaciones, aneuploidía, etc.), creando de esta forma la correspondiente variabilidad (Donini y Sonnino, 1998).

Aunque las semillas son las dianas más comunes en los tratamientos mutagénicos, el cultivo in vitro de microsporas y posterior conversión en embriones somáticos es el método más utilizado en cultivo in vitro. Dirigiendo el tratamiento de mutagénesis a células gaméticas aisladas y posteriormente induciendo embriogénesis y la producción de plantas doble haploides, es posible el desarrollo directo de mutantes homocigotos (Szarejko y Foster, 2006). Se evita así el efecto de enmascaramiento de quimeras posibilitando la expresión e identificación de caracteres recesivos y dominantes en las células, tejidos y plantas haploides. Los tratamientos de mutagénesis pueden ser físicos (radiación ionizante, UV) o químicos (etil-metil-sulfonato, EMS, derivados nitrosos, azidas), los primeros ofrecen menos riesgos al manipulador que los segundos, que suelen ser compuestos tóxicos y cancerígenos.

Las microsporas son la fuente ideal de la inducción de mutagénesis in vitro pero también se han utilizado otros tejidos haploides, células, órganos, explantos. En una reciente revisión, se puede encontrar un resumen de las técnicas de mutagénesis utilizadas en diferentes especies (Szarejko y Foster, 2006). Estas técnicas suelen estar estrechamente relacionadas con el desarrollo de haploides, doble haploides y posterior selección in vitro, ya que una de las mayores dificultades de la aplicación de la mutagénesis es el gran número (miles) de líneas embriogénicas mutantes que suelen generarse en cada proceso. En otros muchos casos y en plantas propagadas vegetativamente, la mutagénesis es eficaz mediante la irradiación de cultivos in vitro a gran escala suministrando una herramienta sencilla, rápida y eficiente en la mejora de especies hortícolas (Ahloowalia, 1998).

17.4. CULTIVO DE ANTERAS Y MICROSPORAS. PRODUCCIÓN DE HAPLOIDES. RESCATE DE EMBRIONES Y FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

Los haploides son plantas autónomas, esporofíticas que tienen el número cromosómico gametofítico ya que se originan a partir de una célula gamética en el saco embrionario o en el polen. El embrión haploide puede derivar de una célula huevo (gimnogénesis), de una célula gametofítica distinta de la célula huevo (apogamia) o de un gameto masculino (androgénesis). Puede también originarse a partir del núcleo de la microspora antes de la primera mitosis del grano de polen, cuando el polen o las anteras se cultivan in vitro (Khus y Virmani, 1996). La tecnología de doble haploides se refiere, fundamentalmente, al uso del cultivo in vitro de anteras y microsporas para la obtención de embriones haploides que, mediante técnicas de duplicación cromosómica, pueden convertir los haploides estériles en líneas fértiles, homocigotas. Por tanto, esta tecnología ofrece a los mejoradores una herramienta eficaz para la producción de líneas homocigotas que pueden multiplicarse y liberarse como cultivares o usarse como líneas recombinantes en los programas de mejora. Una eficiente producción de doble haploides puede reducir de forma notable el tiempo y los costos del desarrollo de un cultivar y se han generado mediante esta tecnología algunas variedades mejoradas con respecto a algún tipo de estrés (Qian et al., 2000). Ya que esta metodología depende del cultivo de tejidos, su aplicación sólo es de interés en aquellas especies/genotipos que muestran una eficaz capacidad de regeneración. Por otra parte, y puesto que todas las líneas homocigotas no tienen porque ser de interés, se hace necesario realizar una selección posterior para elegir los individuos portadores de caracteres deseados. Actualmente, además de los sistemas de selección in vitro se han producido grandes avances en los métodos de selección asistida por marcadores moleculares.

En general, las plantas haploides se regeneran a partir de las microsporas que contiene la antera y aunque la tecnología se utiliza ampliamente, los mecanismos involucrados en el proceso no son del todo conocidos. Debe evitarse, por ejemplo, la formación de callo como una etapa previa a la embriogénesis a fin de evitar, en lo posible, la aparición de variación gametoclinal. El cultivo de microsporas aisladas tiene sus ventajas sobre el cultivo de anteras ya que, eliminando la pared de la antera, se pueden evitar los posibles efectos de tejidos esporofíticos. Más de 1000 embriones por mililitro pueden producirse a partir de cultivos de microsporas a alta densidad una vez sincronizados y, puesto que no existe tejido esporofítico, los componentes del medio de cultivo y los distintos tratamientos inciden directamente sobre las microsporas. En un medio rico en sacarosa las microsporas aisladas derivan en granos de polen maduro y fértil, mientras que bajo tratamientos de estrés, las microsporas inducen la embriogénesis y los granos de polen inmaduro, después de una transferencia a un medio rico en componentes, desarrollan embriones (Foster et al., 2007). Cualquier forma de estrés es necesario para inducir embriogénesis mediante el cultivo de microsporas. Como una especie de estrategia de supervivencia, el cultivo de microsporas, comprometido a desarrollarse en granos de polen, deja la vía gametofítica y toma el modo esporofítico de desarrollo produciendo embriones haploides o doble haploides y plantas completas (Shariatpanahi et al., 2006). Plantas haploides de cereales, derivadas del cultivo de microsporas, tienen con frecuencia un carácter albino aunque es posible reducir su número controlando las condiciones de cultivo u otros factores ambientales (Cistué y Kasha, 2006). Por otra parte, mediante gimnogénesis (cultivo de las células haploides del gametofito femenino, usualmente la célula huevo no fertilizada) es posible también el desarrollo de embriones haploides. El proceso, que inicialmente no necesita un pretratamiento de estrés para su inducción, sí requiere de un tratamiento de duplicación cromosómica para producir doble haploides (Foster et al., 2007).

El éxito en el cultivo de anteras y microsporas está relacionado con el genotipo de la planta donadora, las condiciones de crecimiento de estas plantas donadoras, el estado del desarrollo de la microspora, el pretratamiento al que se ha sometido el material antes de su puesta en cultivo (generalmente un tratamiento de estrés) así como el medio y las condiciones del cultivo. Para una primera y exhaustiva información sobre los aspectos fundamentales y las aplicaciones de la producción de plantas haploides mediante técnicas in vitro se remite al lector a consultar la serie de 3 volúmenes: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants* (SM Jain, SK Sopory y RE Veilleux, editores), publicada por Kluwer Academia Publishers (1996).

También pueden producirse embriones haploides en plantas después de polinización entre especies distantes y aunque los mecanismos involucrados no se conocen, en la mayoría de los casos tiene lugar una doble fertilización formando un cigoto híbrido y un endosperma. Después de la división celular en el cigoto, se eliminan los cromosomas paternos originándose un embrión haploide; el endosperma también sufre eliminación cromosómica y normalmente aborta antes del desarrollo de la semilla. Como consecuencia, debe utilizarse la técnica del rescate de los embriones antes de su aborto para que puedan cultivarse in vitro y regenerarse plantas a partir de ellos. Utilizando esta técnica es necesaria también la adición de tratamientos químicos para la duplicación cromosómica y el desarrollo de plantas doble haploides (Foster et al., 2007). Caracteres relacionados con la tolerancia a estrés abiótico disponible en germoplasma de especies salvajes podrían, utilizando esta metodología, introducirse en especies de interés agronómico. El uso del rescate de embriones se ha desarrollado con éxito en la producción de algunos híbridos interespecíficos habiéndose llevado a cabo algunos ensayos de tolerancia a estrés (Tonguc y Griffiths, 2004).

Una alternativa al empleo de los híbridos obtenidos por técnicas convencionales entre especies alejadas es el uso de la hibridación somática mediante la fusión de protoplastos. Esta tecnología tiene una aplicación potencial en la mejora ya que puede traspasar la incompatibilidad sexual o las barreras reproductivas generando nuevas combinaciones nucleares o citoplásmicas. Sin embargo ocurre con frecuencia una pérdida de cromosomas útiles o incorporación de cromosomas no deseables en el producto final de la fusión; además, la aneuploidía de los híbridos somáticos derivados de fusiones simétricas o asimétricas tiene un efecto negativo sobre los híbridos debido a su baja fertilidad y desarrollo aberrante y anormal (Liu et al., 2006). Una dificultad añadida que suele tener esta técnica es la baja capacidad de regeneración de plantas completas a partir del cultivo de protoplastos, aspecto que se ha observado en muchas de las especies ensayadas.

17.5. SELECCIÓN IN VITRO

La variación somaclonal sólo es evidente cuando las plantas regeneradas expresan modificaciones fenotípicas o citológicas. Desde un punto de vista práctico, la frecuencia de la variación somaclonal debería ser alta para poder seleccionar caracteres deseables y las líneas generadas deberían desarrollarse bien bajo diferentes regímenes medioambientales. La selección en condiciones de campo necesita algunos años y diferentes generaciones para que los mejoradores puedan seleccionar por caracteres deseados. La selección in vitro puede acortar considerablemente el tiempo de selección ya que los cambios ambientales del cultivo son mínimos bajo estas condiciones y de esta manera se puede ahorrar tiempo en el desarrollo de líneas resistentes a estreses abióticos bien entendido que los variantes seleccionados deberán ser ensayados en campo para confirmar la estabilidad genética y la funcionalidad del carácter seleccionado. Además, las líneas resistentes a estrés derivadas de procesos de mejora convencional o de los programas de transformación genética, pueden ser estudiadas mediante la selección in vitro y esto es particularmente atractivo para algún estrés abiótico donde los métodos convencionales de selección son poco eficientes. La variación somaclonal y la mutagénesis in vitro seguidos de una selección eficaz pueden ser un complemento interesante en los programas de mejora convencional.

Cualquier experimento de selección in vitro debe apoyarse en ensayos apropiados que faciliten la medida de la resistencia o tolerancia obtenida. Estos ensayos deben ser reproducibles, sencillos y ofrecer la máxima eficacia y una dependencia mínima de factores ambientales y su eficacia debe basarse en los resultados obtenidos a través del estudio de muchos genotipos. En los ensayos de selección deberían incluirse tanto tejidos diferenciados como hojas, tallos y raíces y tejidos desdiferenciados como callos, suspensiones celulares o protoplastos, lo que permitiría determinar si la expresión de un carácter determinado es comparable a nivel celular, de callo o de órgano. Existe la controversia sobre si la selección debe hacerse antes o después de la regeneración de la planta completa, pero eso dependerá de la capacidad disponible para evaluar el mayor número de individuos con el mínimo esfuerzo y la máxima eficacia. La selección in vitro ofrece la posibilidad de evaluar miles de individuos en una placa Petri, pero el número de plantas regeneradas después de una fuerte presión de selección, es limitado. Por eso, a veces, es preferible hacer el proceso de selección después de la regeneración. Cuando se dispone de un agente selectivo adecuado y bien definido, la selección in vitro es altamente recomendable, en caso contrario la evaluación de los regenerantes es la opción más aconsejable (Remotti, 1998).

Dentro de los estreses abióticos, la salinidad ha sido el más estudiado mediante selección in vitro (Zair et al., 2003). Para ello, cultivos de células aisladas o de callos se someten a concentraciones salinas elevadas bien durante un período corto de tiempo o durante un cierto número de subcultivos. Algunos autores estiman que la selección durante el primer subcultivo podría ser la mejor estrategia para evaluar la tolerancia a salinidad o a cualquier otro tipo de estrés ya que una exposición prolongada podría promover la adaptación al estrés y las plantas regeneradas podrían no mostrar la tolerancia deseada (Santos et al., 2000).

17.6. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Excepto en casos puntuales (*Arabidopsis*) los sistemas de transformación genética tienen su sustento en el cultivo in vitro de tejidos vegetales. Antes de iniciar cualquier proyecto de transformación es necesario disponer de un sistema eficaz y reproducible que permita la regeneración completa de las plantas transformadas. Sin este sistema, sólo se conseguirá estudiar el efecto de la inserción de los genes a nivel celular pero no podrá explotarse todo el potencial que esta tecnología puede suministrar a nivel aplicado. Para la transformación genética (mediante métodos tan conocidos como son los métodos biolísticos o mediante co-cultivo con suspensiones de *Agrobacterium*), se han utilizado meristemos ya formados (yemas apicales o axilares), células aisladas, callos en suspensión, microsporas y protoplastos y embriones somáticos. El uso de meristemos ya formados tiene la gran ventaja de que la regeneración de plantas completas no es, en la mayoría de los casos, difícil. Sin embargo, tiene la gran desventaja de la inestabilidad de los transgenes y de la formación de un gran número de quimeras. Mejor alternativa parece a día de hoy la transformación a partir del cultivo de entrenudos o secciones de hojas o raíces, que bajo ciertas condiciones y en determinadas especies, permite el desarrollo de brotes adventicios transformados. El problema reside en que el proceso organogénico por esta vía no es factible en muchas especies. La utilización del cultivo de células aisladas o callos en suspensión es otra alternativa aunque ya se ha mencionado anteriormente que se puede producir variación somaclonal, no deseable, en este tipo de cultivos. Sin duda el sistema de embriogénesis somática parece ser, a día de hoy, el más eficaz para utilizar en los sistemas de transformación genética. La selección del tipo de explanto es de gran importancia ya que se ha observado que los embriones somáticos en estado globular o cotiledonar temprano tienen un mayor número de células embriogénicas en división que en estadios de desarrollo posteriores, como el cotiledonar (Yeung, 1995). El genotipo de las líneas embriogénicas es otro factor a tener en consideración (Corredoira et al., 2007).

La transformación genética se está utilizando en la búsqueda de tolerancia a estreses abióticos y posiblemente compita con ventaja con los sistemas clásicos de mejora debido al carácter poligénico de la tolerancia y a la falta de fuentes naturales de tolerancia apropiadas (Foolad, 2004).

Todas las tecnologías basadas en el cultivo in vitro de células, órganos o tejidos vegetales utilizadas para la selección para estreses abióticos se están empleando en mayor o menor grado. Sin embargo debe recordarse que estas tecnologías deben emplearse como etapas intermedias en un proceso de mejora genética pues ningún carácter de resistencia o tolerancia ha de seleccionarse, de forma definitiva, a nivel del cultivo in vitro. La transmisión del carácter a la descendencia y los estudios agronómicos correspondientes determinarán de forma definitiva la eficacia de la mejora en la producción final.

A continuación se exponen algunos ejemplos concretos sobre el uso de la tecnología del cultivo in vitro de tejidos vegetales en la selección de variantes para estreses abióticos.

17.7. TOLERANCIA A SALINIDAD

La selección *in vitro* se aplicó de forma rutinaria en los años 80 del siglo pasado para la consecución de cultivos tolerantes a salinidad, pero en aquella época no fue posible la liberación de cultivares apropiados para los agricultores (Flowers, 2004). A pesar de ello, se han conseguido algunos avances. Zair et al. (2003) concluyen que la regeneración de plantas a partir del cultivo de callos bajo elevadas concentraciones de ClNa puede ser un método válido de selección a salinidad. Por otra parte, el cultivar de arroz Pokkali es altamente tolerante a salinidad, produce una cosecha baja pero, a través del cultivo de células en suspensión, ha sido posible la inducción de variación somaclonal, identificados algunos variantes como agrónomicamente mejorados y algunos de ellos capaces de retener elevada tolerancia a salinidad. El somaclón TCCP 266-2-49-B-B-3 es un parental muy popular que ha producido líneas altamente productivas y tolerantes. El desarrollo de estas líneas (a través de hibridación y selección) suele llevar un promedio de 8-10 años pero este período puede acortarse con el cultivo de anteras (líneas AC). Algunas de estas líneas se generaron en 3 años, la mayoría de ellas se utilizaron como parentales en los programas de mejora en diferentes países y una de ellas (IR51500-AC11-1) fue la primera línea AC liberada como el primer cultivar de arroz recomendado para el cultivo en condiciones adversas (Gregorio, 2002; Senadhira et al., 2002).

A pesar del gran esfuerzo llevado a cabo en la sobre-expresión de genes que puedan conferir tolerancia a salinidad, no es posible concluir en este momento que se hallan obtenido cultivares auténticamente tolerantes mediante transformación genética (Cuartero et al., 2006). Según estos autores, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en plantas modelo (*Arabidopsis*, tabaco) y trasladar los resultados obtenidos a plantas de interés agronómico no es sencillo. En muchas ocasiones, la evaluación de las plantas transgénicas tiene lugar mediante condiciones de *in vitro* y, aunque suele existir alguna relación entre la tolerancia *in vitro* a nivel de callo y de las plantas crecidas en invernadero, la selección *in vitro* debe tomarse sólo como un criterio de pre-selección y no como el único criterio para determinar el grado de tolerancia a salinidad en las plantas transformadas (Cuartero et al., 2006).

17.8. TOLERANCIA A TEMPERATURA Y SEQUÍA

Se han utilizado diferentes aproximaciones *in vitro* para la selección de cultivares tolerantes a temperaturas elevadas. El más sencillo es la evaluación de la germinación de los granos de polen y el crecimiento del tubo polínico *in vitro* y la selección de genotipos tolerantes. Esta técnica ha sido empleada en cacahuete y pimiento (Kakani et al., 2002; Reddy y Kakani, 2007) y algodón (Kakani et al., 2005; Liu et al., 2006), en este último caso los autores relacionaron los datos de temperatura con la retención de las cápsulas de las plantas crecidas al exterior. En el estudio se utilizaron modelos de regresión lineales y no lineales comúnmente utilizados en la respuesta del desarrollo de las plantas a los cambios de temperatura.

Por el contrario, para la obtención de plantas tolerantes a bajas temperaturas se ha descrito recientemente otra aproximación en colza, mediante la producción de mutantes generados a partir de radiación UV de microsporas cultivadas *in vitro* y posterior selección *in vitro* mediante análisis bioquímicos de moléculas señal como ácido salicílico, ácido jasmónico, etc. Posteriormente las plantas haploides mutantes seleccionadas fueron tratadas con colchicina para la obtención de doble haploides que finalmente fueron evaluadas en campo y seleccionadas las líneas más tolerantes y las de mejores características agronómicas (McClinchey y Kott, 2007).

La selección in vitro sobre tolerancia a sequía suele llevarse a cabo mediante el cultivo en medios con diferentes concentraciones de sorbitol o polietilenglicol, examinándose las características de las raíces de las plantas regeneradas. Los ensayos se han realizado con éxito en trigo y patata (Ye et al., 2002; Gopal y Iwama, 2007). Sin embargo, no hay información sobre el comportamiento agronómico de los genotipos seleccionados. Otra alternativa, aplicada a trigo, ha sido el desarrollo de haploides y mutantes y posterior cultivo de un número limitado de plantas, que se evaluaron bajo distintas condiciones ambientales, habiéndose seleccionado algunas líneas tolerantes a sequía (Khan et al., 2001).

Mediante transformación genética se han insertado genes en especies de cultivo que producen líneas tolerantes a cambios de temperaturas y sequía pero, en nuestro conocimiento, los resultados están todavía a nivel de laboratorio (Zhang et al., 2004)

17.9. RESISTENCIA A HERBICIDAS

Las técnicas de cultivo in vitro han sido de gran interés en el desarrollo de cultivos tolerantes a herbicidas del tipo imidazolinona (que incluyen a imazapir, imazapic, imazethaphyr, imazamox, imazamethabenceno e imazaquin).

El desarrollo de maíz tolerante a imidazolinona comenzó en 1982 mediante la selección de líneas celulares cultivadas in vitro a partir de callos de maíz híbrido tolerantes al herbicida y posterior introducción de alguna de estas líneas en variedades de maíz comercial (Tan et al., 2005). Se introdujeron en el mercado en 1992 como maíz IMI y hoy son conocidos como maíz Clearfield®. Alternativamente, se obtuvieron algunas líneas resistentes mediante mutagénesis del polen a través del uso de etyl-metasulfonato (EMS). En el caso de la colza, se aislaron microsporas de la variedad Topas, se sometieron a mutagénesis con etil-nitrosourea y se regeneraron embriones y eventualmente plántulas haploides que posteriormente se duplicaron con colchicina (Swanson et al., 1989) y dos de las líneas doble-haploides mostraron tolerancia a imidazolinona. Se introdujeron en el mercado en 1995 y se les conoce como colza Clearfield®. Por otra parte, semillas de arroz de la variedad AS3510 se sometieron a mutagénesis con EMS y plantas M₂ se pulverizaron con imazetapyr aislándose una planta resistente de la que salieron dos variedades resistentes (CL121 y CL141) que se introdujeron inicialmente en el mercado en 2001 (Webster y Masson, 2001). En el caso del trigo, semillas del cultivar Fidel se sometieron a mutagénesis con azida sódica y las semillas M₂ fueron tratadas con el herbicida. Se seleccionaron cuatro plantas tolerantes que fueron las donantes del carácter de resistencia y las primeras variedades de trigo resistentes a imidazolinona se liberaron al mercado en 2001 (Pozniak y Hucl, 2004). Finalmente, en 1998 se descubrió en Kansas una población de girasol salvaje tolerante a imazetapyr que fue la fuente de genes para introducir el carácter de tolerancia a imidazolinona en el girasol cultivado (Al-Khatib y Miller, 2000), introducido para su comercialización en 2003 (Tan et al., 2005), aunque en este caso, no ha sido necesaria la aplicación de las técnicas de cultivo in vitro.

Ni que decir tiene que plantas tolerantes a herbicidas se han obtenido también mediante transformación genética, sobre todo plantas tolerantes a glifosato (Dill, 2005). Sin embargo, este apartado es tratado con más profundidad en otro capítulo de este libro.

17.10. TOLERANCIA A METALES PESADOS

La técnica más utilizada para la inducción de líneas tolerantes a metales pesados es la selección de callos cultivados *in vitro* en medios que contienen elevadas concentraciones de metales. Las plantas regeneradas pueden someterse posteriormente o no a un nuevo programa de presión bajo niveles elevados de metales pesados e incluso puede determinarse la tolerancia en cultivos hidropónicos por períodos de tiempo más o menos largos. Las plantas utilizadas para este tipo de estudios son tanto plantas modelo como el tabaco (Rout y Sahoo, 2007) como especies de interés agronómico (Samantaray et al., 1999; Nehnevajova et al., 2007). Aunque los ensayos para determinar la tolerancia tengan lugar a nivel de invernadero, las plantas no se han incorporado a programas de mejora convencional por lo que no se conoce el carácter heredable de la tolerancia observada.

Los programas de transformación genética suelen estar orientados a la sobreexpresión de genes relacionados con el transporte de iones metálicos a través de las membranas y relacionados también con la síntesis de péptidos quelantes que juegan un importante papel en el secuestro y detoxificación de metales pesados (ver el Capítulo “Estrés por metales pesados”). Los resultados obtenidos son muy variados ya que dependen de la especie estudiada, el tipo de gen incorporado y el tipo de ensayo realizado después de la regeneración (*in vitro*, en cultivo hidropónico, en maceta o en campo). Muchas veces la expresión de gen permite a la planta tolerar elevadas concentraciones de metales pero no su acumulación (Gasic y Korban, 2007), por lo que estas plantas no son apropiadas para su uso en programas de fitorremediación.

17.11. CONCLUSIONES

Es indudable que el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ofrece unas herramientas que pueden ser de utilidad en la búsqueda de tolerancia o resistencia de especies de interés agronómico a estreses abióticos. Sin embargo es preciso también conocer los límites de su aplicación. Si no existe un protocolo eficaz y reproducible de regeneración de plantas a partir de un tipo de explanto determinado, la aplicación de la técnica está muy limitada; lo mismo ocurre si los métodos de selección *in vitro* no son adecuados. Pero aunque estos métodos de selección sean apropiados, el uso de la tecnología *in vitro* ha de considerarse como una etapa intermedia del proceso y no como una etapa final. Todo producto que salga de *in vitro* ha de utilizarse siguiendo las pautas de un programa de mejora convencional con los estudios de respuesta agronómica correspondientes. Sólo así se podrá determinar si la variabilidad originada y seleccionada *in vitro* tiene validez práctica para el desarrollo de nuevas variedades que puedan utilizarse a nivel comercial.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al MEC la ayuda económica recibida a través de los proyectos AGL2005-00709 y AGL2006-01387.

REFERENCIAS

- Ahloowalia, B.S (1998). In vitro techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. pp 293-309, in S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia (eds.) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Al-Katib, K. and Miller, J.F. (2000). Registration of four genetic stocks of sunflower resistant to imidazolinone herbicides. *Crop Sci.* 42: 869-870
- Brar, D.S. and Jain, S.M. (1998). Somaclonal variation: Mechanism and applications in crop improvement. pp 15-37, in S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia (eds.) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. pp 1158-1249, in W. Gruissem, B. Buchannan and R. Jones (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD, USA.
- Cistué, L. and Kasha, K.J. (2006). Gametic embryogenesis in *Triticum*: a study of some critical factors in haploid (microspore) embryogenesis. pp 321- 342, in A. Mujib and J. Samaj (eds.) *Plant Cell Monograph (2) Somatic Embryogenesis*. Springer, Berlin.
- Corredoira, E., San-José, M.C., Vieitez, A.M. and Ballester, A. (2007). Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 91: 281-288
- Cuartero, J., Bolarín, M.C., Asins, M. and Moreno, V. (2006). Increasing salt tolerance in tomato. *J. Exp. Bot.* 57: 1045-1058
- Dill, G.M. (2005). Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Manag. Sci.* 61: 219-224
- Donini, P. and Sonnino, A. (1998). Induced mutation in plant breeding: Current status and future outlook. pp 255-291, in S.M. Jain, D.S. Brar, B.S. Ahloowalia (eds.). *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Dita, M.A., Rispaill, N., Prats, E., Rubiales, D. and Singh, K.B. (2006). Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147: 1-24
- Flowers, T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319
- Foolad, M.R. (2004). Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 76: 101-119.
- Foste, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J. and Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci.* 12: 368-375
- Gasic, K. and Korban, S.S. (2007). Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta* 225: 1277-1285
- Gomal, J. and Iwama, K. (2007). In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Rep.* 26: 693-700

- Gregorio, G.B., Senadhira, D., Mendoza, R.D. Manigbas, N.L., Roxas, J.P. and Guerta, C.Q. (2002). Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice. *Field Crops Res.* 76: 91-101
- Jain, S.M. (2000). Mechanisms of spontaneous and induced mutations in plants. *Radiation Res.* Vol. 2, Cong. Proc. 255-258
- Jain, S.M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166
- Kakani, V.G., Prasad, P.V.V., Craufurd, P.Q. and Wheeler, T.R. (2002). Response in vitro pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. *Plant Cell Environ.* 25: 1651-1661
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Koti, S., Wallace, T.P., Prasad, P.V.V., Reddy, V.R. and Zhao, D.. (2005) Difference in in vitro pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperatures. *Ann. Bot.* 96: 59-67
- Khan, A.J., Hassan, S., Tariq, M. and Khan, T. (2001). Haploidy breeding and mutagenesis for drought tolerance in wheat. *Euphytica* 120: 409-414
- Khush, G.S. and Virmani, S.S. (1996). Haploids in plant breeding. pp. 11-34, in S.M. Jain, S.K. Sopory and R.E. Veilleux (eds.) *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214
- Liu, Z., Yuan, Y-L., Liu, S-Q., Yu, X-N. and Rao, L-Q. (2006). Screening for high temperature tolerant cotton cultivars by testing in vitro pollen germination, pollen tube growth and boll retention. *J. Integr. Plant Biol.* 48: 706-714
- Maluszynski, M., Nichterlein, K., van Zanten, L. and Ahloowalia, B.S. (2000). Officially released mutant varieties – the FAO/IAEA database. *Mut. Breed. Rev.* 12: 1-84
- McClinchey, S.L. and Kott, L.S. (2007). Production of mutants with high cold tolerance in spring. *Euphytica.* 162: 51-67.
- Nehnevajova, E., Herzig, R., Erismann, K-L. and Schwitzguébel, J-P. (2007). In vitro breeding of *Brassica juncea* L. to enhance metal accumulation and extraction properties. *Plant Cell Rep.* 26: 429-437
- Pozniak, C.J. and Hucl, P.J. (2004). Genetic analysis of imidazolinone resistance in mutation-derived lines of common wheat. *Crop Sci.* 44: 23-30
- Qian, Q., Zeng, D.L., He, P., Zheng, X.W., Chen, Y. and Zhu, L.H. (2000). QTL analysis of rice seedlings cold tolerance in a double haploid population derived from anther culture of a hybrid between indica and japonica rice. *Chin. Sci. Bull.* 45: 448-453

- Reddy, K.R. and Kakani, V.G. (2007). Screening *Capsicum* species of different origins for high temperature tolerance by in vitro pollen germination and pollen tube length. *Sci. Horti.* 112: 130-135
- Remotti, P.C. (1998). Somaclonal variation and in vitro selection for crop improvement. pp 169-201 In: S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia (eds.) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Rout, G.R. and Sahoo, S. (2007). In vitro selection and plant regeneration of copper-tolerant plants from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. cv. 'Xanthi'. *Plant Breed.* 126: 403-409
- Rowland, G.G., McHughen, A. and McOnie, C. (1989). Field performance at saline-affected sites of a somaclonal variant of McGregor flax selected for salt tolerance in vitro. *Can. J. Plant Sci.* 69: 49-60
- Samantaray, S., Rout, G.R. and Das, P. (1999). In vitro selection and regeneration of zinc tolerant calli from *Setaria italica* L. *Plant Sci.* 143: 201-209
- Santos, C.L.V., Gomes, S. and Caldeira, G. (2000). Comparative responses of *Helianthus annuus* plant calli exposed to NaCl. II Selection of stable salt tolerant calli cell lines and evaluation of osmotic adjustment and morphogenic capacity. *J. Plant Physiol.* 156: 68-74
- Senadhira, D., Zapata-Arias, F.J., Gregorio, G.B., Alejar, M.S., de la Cruz, H.C., Padolina, T.F. and Galvez, A.M. (2002). Development of the first salt-tolerant rice cultivar through indica-indica anther culture. *Field Crops Res.* 76: 103-110
- Shariatpanahi, M.E., Bal U., Heberle-Bors, E. and Touraev, A. (2006). Stresses applied for the reprogramming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol. Plant.* 127: 519-534
- Swanson, E.B., Herrgesell, N.J., Arnoldo, M., Sippell, D.W. and Wong, R.S.C. (1989). Microspore mutagenesis and selection: canola plants with field tolerance to the imidazolinones. *Theor. Appl. Genet.* 78: 525-530
- Szarejko, I. and Foster, B.P. (2007). Doubled haploidy and induced mutation. *Euphytica* 158: 359-370.
- Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K. and Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.* 61: 246-267
- Tonguc, M. and Griffiths, P.D. (2004). Transfer of powdery mildew resistance from *Brassica carinata* to *Brassica oleraceae* through embryo rescue. *Plant Breed.* 123: 587-589
- Veilleux, R.E. and Johnson, A.A.T. (1998). Somaclonal variation: molecular analysis, transformation and utilization. *Plant Breed. Rev.* 16: 229-268
- Vinocur, B. and Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opi. Biotech.* 16: 123-132
- Webster, E.P. and Masson, J.A. (2001). Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone-tolerant rice. *Weed Sci.* 49: 652-657.

Ye, X., Du, L., Xu, H. and Xin, Z. (2002). Root characters of several wheat genotypes. *J Tritical Crops* 22: 43-46

Yeung, E.C. (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. pp 205–248, in T.A. Thorpe (ed.) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Zair, I., Chlyah, A., Sabounji, K., Tittahsen, M. and Chlyah, H. (2003). Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of in vitro selection pressure. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73: 237-244

Zhang, J.Z., Creelman, R.A. and Zhu, J-K. (2004). From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol.* 135: 615-621

Zhu, G.Y., Kinet, J-M., Bertin, P., Bouharmont, J. and Lutts, S. (2000). Crosses between cultivars and tissue culture-selected plants for salt resistance improvement in rice, *Oryza sativa*. *Plant Breed.* 119: 497-504