

MEJORA GENÉTICA DE ESPECIES VEGETALES

Luis Navarro

*Centro de Protección Vegetal y Biotecnología
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
Miembro de la Academia de Agricultura de Francia
Premio Rey Jaime I de Nuevas Tecnologías*

Una parte importante de la sociedad y de los medios de comunicación están convencidos de que la mejora genética o transformación genética de las plantas cultivadas es un proceso reciente que se realiza mediante la utilización de la biotecnología, particularmente mediante técnicas de ingeniería genética. Sin embargo, esta idea está totalmente alejada de la realidad ya que este proceso se ha producido de forma ininterrumpida desde el inicio de la agricultura hace unos 10.000 años. Lo que es cierto es que durante este periodo la mejora ha tenido distintas fases y los actores encargados de la misma han ido cambiando. Los primeros “mejoradores” fueron los recolectores-cazadores que realizaron la domesticación de especies silvestres e iniciaron la agricultura. Posteriormente los agricultores sometieron a las plantas a un proceso de selección empírica durante varios milenios creando las variedades locales. Los descubrimientos sobre la hibridación, la herencia y la genética hacen que los científicos tomen el relevo en la mejora de las plantas, tímidamente durante el siglo XIX y de forma generalizada durante el siglo XX creando las variedades de alto rendimiento más resistentes a plagas y enfermedades. Los desarrollos biotecnológicos de la segunda mitad del siglo XX incorporaron una nueva pléyade de científicos en diversas disciplinas al proceso de mejora genética de las plantas cultivadas con nuevas estrategias que abren horizontes insospechados en el desarrollo de la agricultura, especialmente con la irrupción de las plantas transgénicas. La domesticación de las especies y su mejora a través de las distintas fases constituyen un proceso evolutivo totalmente artificial desde sus orígenes que nunca hubiese sucedido de forma espontánea en la naturaleza (García Olmedo, 1998).

La domesticación de las plantas cultivadas

La especie humana pasó unos dos millones de años alimentándose de la recolección de plantas silvestres y de la caza, hasta que hace tan solo unos 10.000 años inició la domesticación de distintas es-

pecies vegetales y con ella la agricultura, que probablemente es la revolución tecnológica más importante de la historia de la humanidad. No se conocen las causas de este cambio tan radical del sistema de vida. De los datos arqueológicos y del estudio de tribus primitivas que han permanecido aisladas hasta tiempos recientes se deduce que los recolectores-cazadores tenían una dieta muy variada y se alimentaban de centenares de plantas, aunque probablemente unas pocas de ellas constituían el sustento principal en cada una de las distintas zonas geográficas habitadas. Debían tener un conocimiento detallado sobre la botánica de las planas de su habitat. Además debieron desarrollar procedimientos basados en el fuego y la maceración para eliminar o disminuir la toxicidad de muchas de ellas, lo que les permitía aumentar el alimento disponible. Los datos existentes parecen indicar que el tiempo que necesitaban para buscarse el sustento no debía ser superior a unas cuatro horas diarias, lo que no representa un gran esfuerzo. La población de cada zona probablemente estaba controlada por la cantidad de alimentos disponibles, por lo que en circunstancias normales la escasez de alimentos no debió ser un desencadenante para el inicio de la agricultura, que además se realizó de forma independiente en distintas zonas del planeta. Se puede especular que grandes cambios climáticos redujeron la cantidad de alimentos disponibles, lo que indujo a nuestros antepasados a realizar algo tan trascendente como recolectar semillas de plantas silvestres de las que se alimentaban habitualmente, sembrarlas en un campo preparado, cuidarlas y protegerlas y recoger la cosecha para alimentarse guardando una parte de la semilla para repetir el ciclo.

El simple hecho de sembrar semillas de una especie silvestre supone cambios muy importantes en su ambiente natural. Las semillas se siembran a más profundidad en un suelo más mullido, lo que le da más protección y facilita la germinación. La planta probablemente tiene más agua disponible y no tiene la competencia de otras plantas que se eliminan. La simple adaptación a las condiciones de cultivo causa modificaciones genéticas y consecuentemente cambios en la información hereditaria.

En el proceso de domesticación el hombre indujo modificaciones genéticas de gran importancia que cambiaron totalmente el comportamiento y características de las plantas en distintos aspectos. Por ejemplo, en las especies silvestres hay una gran variabilidad en la época de maduración con la finalidad de que existan semillas maduras en un periodo prolongado de tiempo que faciliten la supervivencia de la especie ante condiciones adversas. Cuando se cultivan estas especies se produce la misma variabilidad, pero la recolección se realiza en una época determinada en la que hay plantas cuyas semillas no han madurado y no se recolectan y otras que han madurado con anterioridad y cuyas semillas se han diseminado. Esto implica que de la población inicial solo se recolectan las plantas que maduran en la época de recolección. Una parte de la semilla recolectada se dedica a alimentación y otra se siembra para la cosecha del año siguiente. Este ciclo se repite en años sucesivos ejerciendo una fuerte presión de selección sobre la población primitiva hasta que se consiguen poblaciones cada vez más homogéneas que maduran de forma sincrónica.

Algo parecido se repitió con la dehiscencia de los frutos de las espigas. En las especies silvestres los frutos se desprenden y se dispersan en el momento de la maduración para favorecer la supervivencia de las mismas, lo que es un desastre para la agricultura, ya que en el momento de la recolección los granos estarían dispersos en el suelo en vez de en las espigas. Durante la domesticación se seleccionaron de forma generalizada poblaciones con frutos indehiscentes, que favorecen la agricultura pero dificultan la supervivencia natural de las especies.

Los caracteres que se modificaron de forma general durante la domesticación, denominada selección automática, fueron la maduración sincrónica, la formación de frutos o infrutescencias indehiscentes, la pérdida del periodo de latencia de las semillas, el aumento del tamaño de las inflorescencias, el aumen-

to (trigo, cebada) o la disminución (maíz, girasol) del número de inflorescencias, el aumento del tamaño de las semillas (Cubero, 2003).

Un aspecto muy interesante es el estudio del lugar de domesticación de las plantas cultivadas. Este tema no se aborda hasta la mitad del siglo XIX. Darwin fue el precursor de estos estudios y en su obra "El origen de las especies" describe la selección artificial en plantas y animales realizada por agricultores y ganaderos y posteriormente especuló con el posible origen a partir de especies silvestres. El botánico Alfonso De Candolle, contemporáneo de Darwin, escribió por primera vez un tratado sobre el tema titulado "El origen de las plantas cultivadas", publicado en 1882. En sus estudios utilizó datos botánicos, arqueológicos, históricos y etnográficos para determinar las zonas de origen de las plantas cultivadas. El ruso Nikolai Vavilov realizó extensísimos estudios sobre el origen de las plantas cultivadas basándose en criterios fitogeográficos y al servicio de la mejora vegetal, creando el concepto de Centros de Origen de cada especie cultivada y proponiendo siete centros de origen de las especies cultivadas: China, Sudeste asiático, Sudoeste asiático (creciente fértil), el Mediterráneo, Etiopía, Mejico y los Andes (Vavilov, 1926). Estos estudios pioneros se han completado posteriormente con utilización de técnicas genéticas, de biología molecular y genómicas, que son herramientas muy poderosas para explicar la domesticación y la evolución de las plantas cultivadas (Burger et al., 2008). La mayoría de los Centros de Origen no son tan localizados y concretos como se creía y se ha creado el concepto de Centros de Origen Difusos, ya que hay evidencias de que la domesticación de algunas especies se realizó de forma simultánea e independiente en distintas zonas próximas. Actualmente se considera que el número de especies domesticadas en cada zona responde esencialmente a las necesidades y la actividad humana, más que a la riqueza de especies de potencial interés agrícola.

Los numerosos estudios recientes sobre diversos aspectos de la domesticación están dando resultados muy interesantes (Burger et al., 2008). Una de las preguntas sin respuesta concreta es el periodo que cada especie necesitó para su domesticación. Tradicionalmente se había considerado que el proceso había sido extraordinariamente lento durante milenios, pero diversos estudios sugieren que en algunas especies, como el maíz, el proceso se llevó a cabo en apenas unos pocos centenares de años. También se están identificando genes relacionados con la domesticación y curiosamente se están encontrando genes equivalentes en distintas especies que han tenido un papel fundamental en la misma (Paterson et al., 1995).

Como ejemplo se puede citar el caso del maíz. Gracias a la integración de diversas metodologías, desde la arqueología y la paleontología a la biología molecular, es la especie de la que mejor se conoce el proceso de domesticación (Matsuoka et al., 2002; Piperno et al., 2009). Tuvo lugar hace 9.000 años a partir de la especie silvestre teosinte en el valle del río Balsas en México (Figura 1).

Desde que se inició la domesticación se produjo una continua evolución artificial de las especies cultivadas para adaptarlas a las necesidades de la agricultura, que generalmente fue en dirección distinta de la evolución natural que favorece su supervivencia en condiciones naturales. Las modificaciones genéticas que se realizaron en esta época fueron muy superiores a las producidas en los milenios posteriores cuando se seleccionaron numerosas variedades a partir de las poblaciones iniciales. La pérdida de diversidad genética también fue muy superior en el proceso de domesticación.

Selección de variedades locales

La agricultura se estableció como actividad permanente después de la domesticación y apareció la figura del agricultor, que es clave en la evolución de las especies cultivadas. La agricultura se fue extendiendo paulatinamente y de forma lenta en nuevos territorios fundamentalmente como consecuencia de

la presión demográfica, difundiendo simultáneamente las especies domesticadas. Las grandes conquistas aceleraron la expansión de las especies a nuevos territorios, ya que los pueblos llevaban consigo su más valiosa tecnología, que era el conocimiento del cultivo de las plantas para producir alimentos. La difusión de las especies se aceleró enormemente con los grandes viajes de exploración, fundamentalmente a partir del siglo XV, ya que sistemáticamente se transportaban semillas y plantas entre zonas muy alejadas. De esta forma las especies salieron de sus centros de origen para implantarse en todos los territorios que tenían condiciones adecuadas para su cultivo.

En este periodo de varios milenios los agricultores sembraban semillas de las distintas especies y de la cosecha obtenida reservaban una parte de las semillas para cultivo del año siguiente, que además pasaban de generación en generación. Durante el cultivo se produce una variación continua como consecuencia de la recombinación de genomas por cruzamientos sexuales espontáneos y por mutación de genes. En consecuencia en cualquier campo aparecerían individuos distintos que el agricultor seleccionaba para cultivar el año siguiente en base a sus propios criterios que debían estar relacionados con los gustos de la población y por la adaptación a los distintos ambientes. Al cabo de los años los caracteres se fijan formando plantaciones de plantas bastante homogéneas, es decir, se han creado las variedades locales. Este tipo de mejora o selección artificial continua realizada por millones de agricultores en el mundo, llamada selección masal, dio lugar a las innumerables variedades locales de las distintas especies (Figura 1). Aunque el fenotipo de estas variedades sea bastante diverso, en realidad la variabilidad genética de las variedades locales es muy inferior a la de las especies silvestres originales, ya que se originan a partir de poblaciones mucho más homogéneas.

En la actualidad la selección de sus propias semillas por los agricultores se produce fundamentalmente en la agricultura de subsistencia. No obstante, los agricultores siguen hoy seleccionando nuevas variedades en algunos cultivos altamente tecnificados. Por ejemplo, en los cítricos, que son el principal cultivo frutal del mundo, la mayor parte de las variedades cultivadas se han producido por mutaciones espontáneas en campo, que son detectadas e incluso protegidas o patentadas por los agricultores y luego propagadas por injerto masivamente en modernos viveros. En la figura 2 se muestran como ejemplo diversas variedades de mandarino clementino producidas por mutación espontánea en campo y seleccionadas por los agricultores en función del tamaño y época de maduración. También cabe destacar que las variedades más apreciadas son aquellas cuyos frutos no producen semillas, que se cultivan de forma generalizada. Se da la paradoja que se han seleccionado variedades por métodos considerados "naturales" que no tienen ninguna posibilidad de sobrevivir en la naturaleza por que no disponen de un sistema de reproducción. La agricultura las mantiene mediante métodos de clonación masiva por injerto. Este ejemplo nos indica una vez más que la evolución de las especies cultivadas se ha realizado de forma totalmente artificial por la intervención del hombre muchas veces contra natura.

Las variedades de alto rendimiento

La mejora genética de las especies vegetales toma un nuevo rumbo con los descubrimientos científicos iniciados a finales del siglo XVII que se materializan en el siglo XX con la obtención generalizada de variedades de alto rendimiento en la mayoría de las especies cultivadas a gran escala. La hipótesis de la reproducción sexual de las plantas no se plantea hasta finales del siglo XVII y los primeros cruzamientos para probar esta teoría se realizan en 1717 entre distintas variedades de clavel. Kölreuter (1733-1806) realizó una gran cantidad de cruzamientos entre variedades de distintas especies para confirmar la sexualidad de las plantas. Las primeras hibridaciones dirigidas a la obtención de nuevas variedades se realizaron a finales del siglo XVIII y principios del XIX. En 1859 Mendel hizo públicos sus descubrimientos sobre la

herencia de caracteres en las plantas. Posteriormente se identifican los cromosomas como sedes de la información genética. A finales del siglo XIX la mejora de plantas mediante cruzamientos controlados es utilizada en diversos países, e incluso se realizaron los dos primeros Congresos Internacionales Mejora.

Un hecho de gran trascendencia en la mejora genética de plantas fue la creación de empresas de producción de semillas. La primera fue Vilmorin en Francia, que se estableció en 1727. La implantación de las empresas de semillas fue muy rápida, ya que facilitaban al agricultor semillas de calidad y además este no tenía que preocuparse de recolectar y conservar sus propias semillas. Inicialmente las empresas producían semillas de variedades existentes, pero rápidamente iniciaron programas de selección y mejora y de hecho crearon la profesión de "mejorador genético".

A principios del siglo XX se "redescubrieron" las leyes de herencia de Mendel, que además se integraron con las teorías de evolución de Darwin. Se descubrió la mutagénesis artificial, que permitía mutar genes y la poliploidía que permitía crear nuevas especies. En otras palabras, se podía imitar a la naturaleza creando de forma dirigida variabilidad por recombinación de genomas y mutación de genes. Todo ello supuso un gran avance de la genética que se aplica de forma generalizada para la mejora de variedades y que tiene su punto álgido en la llamada revolución verde con la obtención de variedades de alto rendimiento (Figura 1).

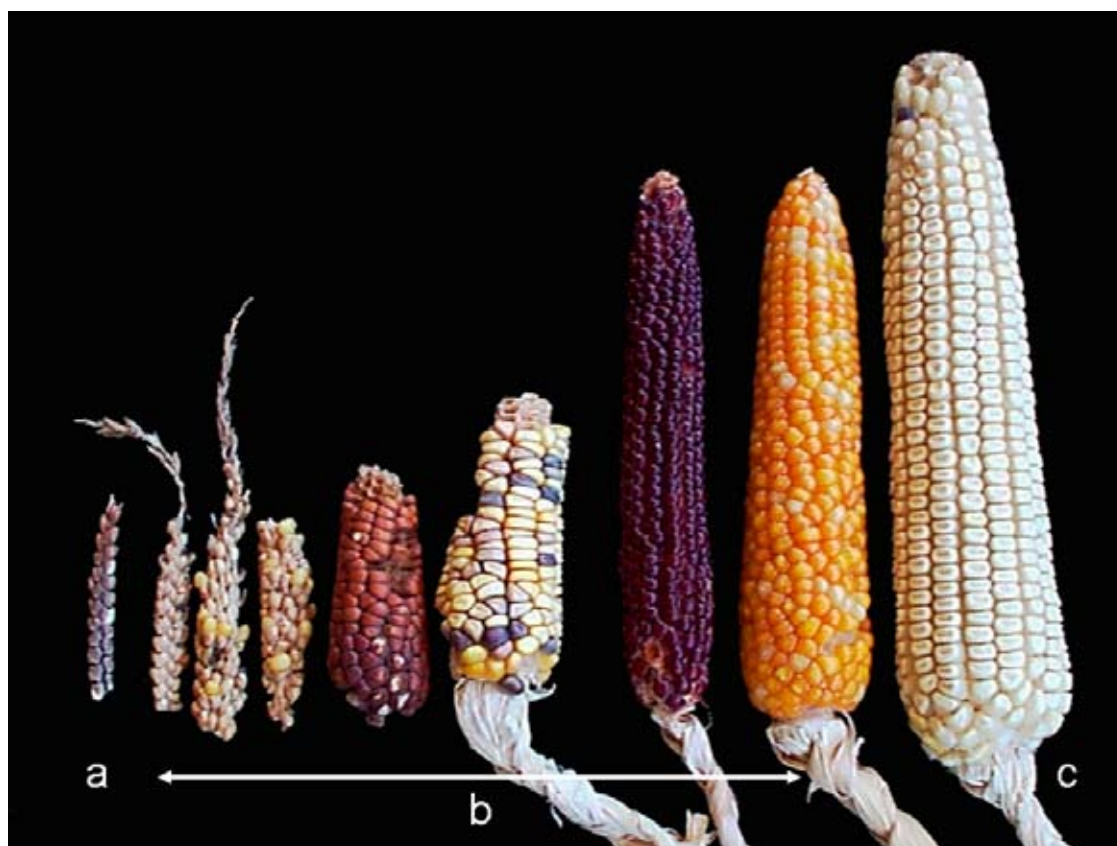


Figura 1. Evolución de las variedades de maíz. a) Teosinte o maíz silvestre original; b) variedades locales; c) variedades actuales de alto rendimiento



Figura 2. Variedades de mandarino clementino producidas por mutación espontánea en campo y seleccionadas por agricultores

Desde las pesimistas predicciones de Malthus (1978) de crecimiento lineal de la producción de alimentos y exponencial de la población, se estimaba que la producción de alimentos limitaría de forma drástica el crecimiento de la población mundial y que habría grandes hambrunas a partir de la mitad del siglo XX. El crecimiento de la demanda de alimentos se cubrió hasta esta época con incrementos de la superficie cultivada y mejoras en las técnicas agrícolas. La necesidad de incrementar los rendimientos agrícolas se abordó a nivel internacional con la creación de grandes programas de mejora en los centros auspiciados por el Grupo Consultivo Internacional para la Investigación Agrícola (CGIAR) para obtener variedades más productivas de los principales cultivos que contribuyen a la alimentación.

En el Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT) en Méjico se inició en 1943 un programa de mejora de estas dos especies dirigido por Norman Borlaug con el objetivo de obtener variedades más productivas, más resistentes a plagas y enfermedades y con buen comportamiento agronómico en ambientes diversos. Con la misma aproximación, en 1958 se inició en el Centro Internacional de Investigación del Arroz (IRRI) en Los Baños, Filipinas un programa de mejora de esta especie.

En estos programas se obtuvieron variedades de alto rendimiento en las tres especies que se adaptan muy bien a condiciones de suelo y clima diferentes. Las variedades de trigo son además más resistentes a plagas y enfermedades. Las nuevas variedades de arroz son de ciclo corto y floración independiente de la duración del día, lo que permite dos cosechas al año, son resistentes a plagas y enfermedades y tienen buenas propiedades culinarias.

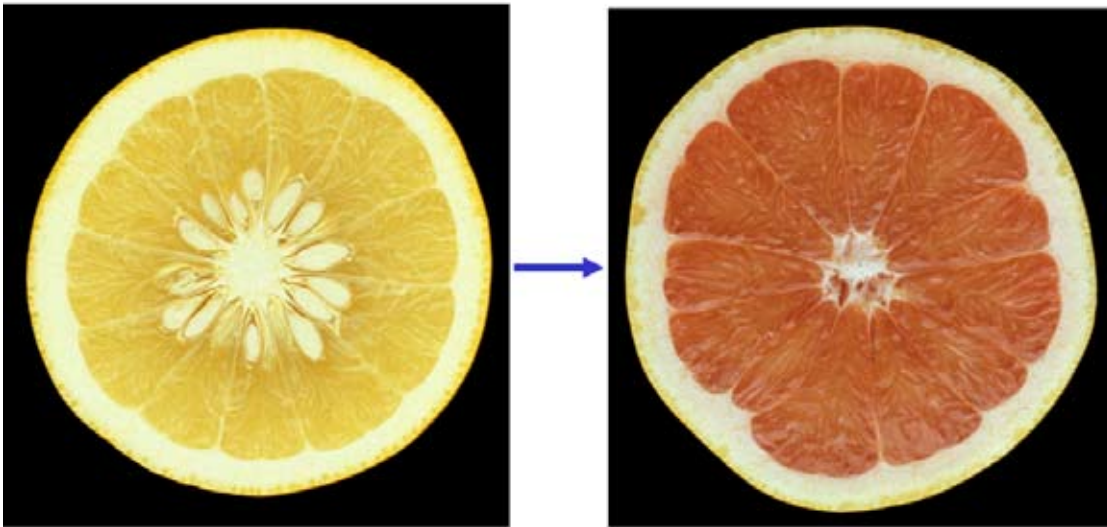


Figura 3. Ejemplo del uso de la irradiación para la inducción de mutaciones. La irradiación de semillas del pomelo Hudson de pulpa amarilla dio lugar al pomelo Star Ruby, sin semillas y de pulpa roja, que se cultiva ampliamente en distintos países

Las nuevas variedades empezaron a cultivarse en 1959, inicialmente a pequeña escala y con una implantación global en unos diez años. Entre 1965 y 1969 la superficie sembrada con las nuevas variedades de trigo y arroz pasó de menos de 100 hectáreas a más de 15 millones.

La utilización de las nuevas variedades produjo aumentos espectaculares de las cosechas. Por ejemplo, la producción de trigo en la India pasó de 11,3 millones de toneladas en 1967, a 33 millones en 1971 y 73 millones en la actualidad. El rendimiento de arroz en China pasó de 2 a 4,7 toneladas por hectárea. Entre 1940 y 1980 la producción de maíz en EE.UU. pasó de 64 millones de toneladas con 36 millones de hectáreas cultivadas a 185 millones de toneladas con 29 millones de hectáreas. A nivel global la productividad de la tierra era 2,4 veces superior en 2005 que en 1961. Se estima que alrededor del 70% del incremento de la productividad se debe a la utilización de variedades mejoradas de alto rendimiento y más tolerantes a plagas y enfermedades.

Un hecho de especial relevancia es que Norman Borlaug, recientemente fallecido, recibió el Premio Nobel de la paz en 1970 por la obtención de los trigos de alto rendimiento por su enorme contribución al bienestar de la humanidad.

La mejora genética ha impedido que se cumplan las pesimistas previsiones maltusianas. Actualmente la producción de alimentos es suficiente para alimentar a toda la humanidad. No obstante la distribución de alimentos es irregular por causas fundamentalmente políticas y 1.000 millones de personas tienen escasez de alimentos y están subnutridas y 200 de ellos padecen hambre. Una de las paradojas de nuestra humanidad es que probablemente el número de personas con problemas de obesidad está alcanzando al número de seres humanos que pasan hambre. En EE.UU. los problemas de obesidad ocasionan el 9% de los gastos sanitarios y algunas fuentes estiman que en España superan el 6%.

Actualmente la agricultura moderna está basada en la utilización generalizada de variedades obtenidas por mejora genética, que se distribuyen a los agricultores por empresas de semillas y viveros. Además de forma paulatina se está produciendo la protección o patente de las nuevas variedades, particularmente en la hortofruticultura intensiva.

Banco de germoplasma de cítricos del IVIA



Figura 4. Ejemplo de genotipos del banco de germoplasma de cítricos del IVIA donde se conservan variedades actuales, variedades locales y variedades de especies silvestres

Una de las consecuencias de esta situación es que las variedades locales están desapareciendo rápidamente, con lo que se produce una nueva disminución de la biodiversidad, lo que hace que los bancos de germoplasma adquieran mayor importancia como reservorio de la biodiversidad de las especies cultivadas y de sus parientes silvestres (Figura 4).

Las variedades biotecnológicas

La biotecnología de plantas surge a partir de la hipótesis revolucionaria en su tiempo de Haberland que en 1902 consideró que las células vegetales eran totipotentes, es decir que cultivadas en los medios adecuados serían capaces de regenerar plantas enteras. Esta hipótesis se ha cumplido con creces y en la actualidad es posible el aislamiento y cultivo *in vitro* de células vegetales de muchas especies para regenerar plantas enteras y en la mayoría de las especies es posible regenerar plantas a partir de diversos órganos cultivados *in vitro*. Además, las plantas pueden clonarse *in vitro* con relativa facilidad para regenerar en poco tiempo miles de ejemplares idénticos a partir de células o tejidos iniciales. Estos logros han permitido el desarrollo de varias técnicas basadas en el cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* que son muy importantes para la mejora genética de plantas. La conjunción de estas técnicas con la biología molecular ha permitido también el desarrollo de la ingeniería genética en plantas. Las técnicas

biotecnológicas en plantas están ampliamente revisadas en distintas publicaciones, entre las que puede citarse la serie de 64 monografías sobre la biotecnología en agricultura y silvicultura publicadas entre 1988 y 2009 (Widholm et al., 1988-2009). A continuación se hace una breve discusión sobre las principales de estas técnicas.

Obtención de plantas libres de virus

Los virus producen importantes pérdidas en la agricultura, ya que disminuyen la producción y la calidad de la fruta y causan decaimientos, pérdida de vigor y vida comercial corta de las plantas e incluso en casos graves la muerte de las mismas. En consecuencia, pueden potencialmente convertirse en los factores limitantes más importantes de la producción. El problema es especialmente grave en los frutales, ya que si la propagación en los viveros se realiza con material infectado, todos los árboles de las plantaciones resultantes estarán también infectados y las pérdidas que, en cultivos como los cítricos pueden suponer el 15-25% de la producción, se acumulan durante toda la vida comercial de los árboles, que puede ser de 15 a 25 años. El control de estas enfermedades sólo puede hacerse con medidas preventivas, en las que es imprescindible usar plantas sanas en las nuevas plantaciones.

En muchas ocasiones no es posible encontrar árboles sanos de una determinada variedad, por lo que es necesario recurrir a la utilización de técnicas que permitan la obtención de plantas sanas a partir de plantas enfermas. Los virus no se distribuyen en las plantas infectadas de forma homogénea en todos sus tejidos y es bien conocido que los ápices caulinares (meristemo apical más 1-3 primordios foliares con tamaño comprendido entre 0,1 y 0,3 mm) están normalmente libres de patógenos aunque el resto de las células de la planta estén infectados. Se desconocen las causas por las que los ápices caulinares permanecen libres de patógenos, pero están relacionadas con el hecho de en los ápices caulinares no hay diferenciaciones vasculares que los conecten con el resto de la planta, por lo que los patógenos no los pueden infectar a través del sistema conductor y además hay cada vez más resultados que indican que en estos tejidos los mecanismos de silenciamiento de virus son muy activos e impiden su replicación.

La regeneración de plantas enteras a partir de ápices caulinares mediante cultivo o microinjerto *in vitro* permite la obtención de plantas sanas a partir de plantas infectadas. Como ejemplo cabe citar el caso de los cítricos, que están afectados por diversos patógenos que causan pérdidas muy importantes. La técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (Navarro y Juárez, 2007) se usa de forma rutinaria en los principales países citrícolas para obtener plantas sanas. Consiste en aislar ápices caulinares de la variedad infectada e injertarlos sobre un portainjertos obtenido por germinación de semillas *in vitro* para regenerar plantas sanas por crecimiento del ápice injertado (Figura 5). En España, que es el cuarto productor del mundo y el primero en exportación de fruta fresca, esta técnica se ha aplicado en gran escala y ha permitido obtener plantas sanas de todas las variedades comerciales de interés y su propagación en viveros comerciales para plantar en los últimos 30 años unos 130 millones de árboles libres de virus que representan más del 95% de la citricultura. Este programa ha producido beneficios multimillonarios en nuestra citricultura y además no se ha limitado a las variedades comerciales, sino que se ha ampliado a variedades locales y especies silvestres para establecer un banco de germoplasma de plantas sanas que conserva una amplia representación de la diversidad de los cítricos (Figura 4).

Cultivo de embriones

El cultivo de embriones es la técnica de cultivo *in vitro* más antigua. Los primeros ensayos se iniciaron dos años después de las hipótesis de Haberland. Actualmente es posible regenerar con facilidad

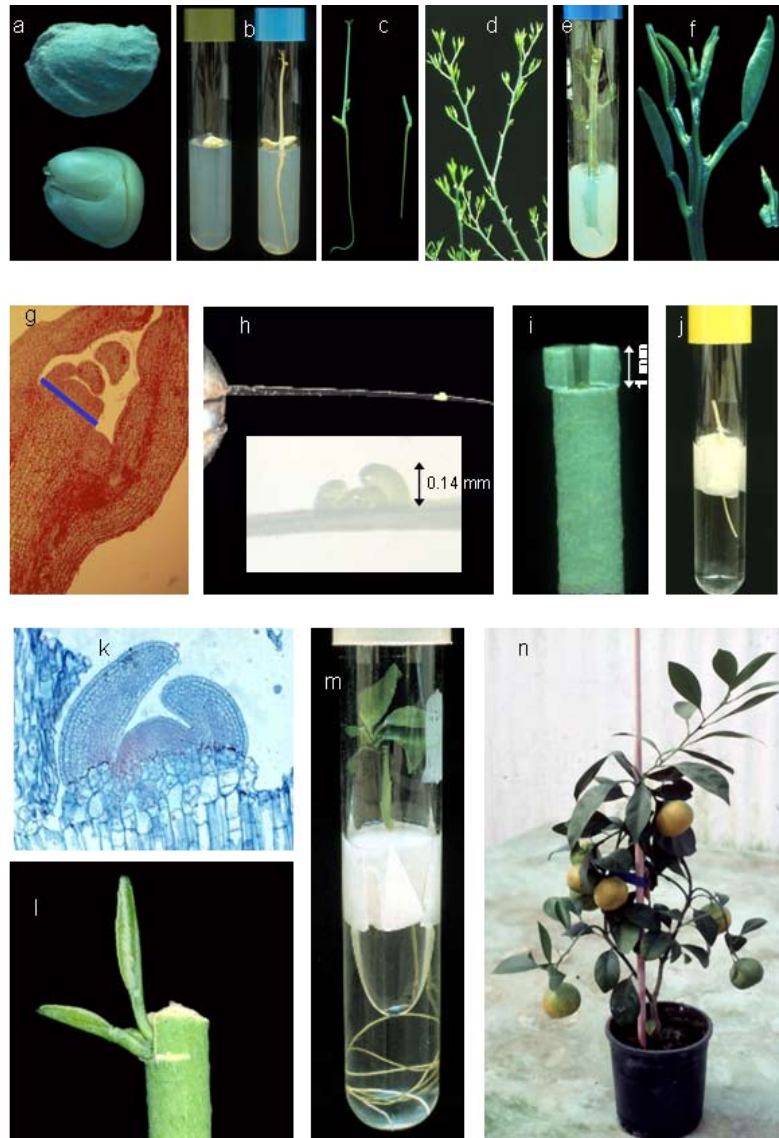


Figura 5. Técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. a) semillas del portainjertos intactas (arriba) y sin tegumentos (abajo); b) semilla recién sembrada (izquierda) y plántula resultante al cabo de dos semanas (derecha); c) plántula de dos semanas de edad (izquierda) y portainjertos preparado para el injerto (derecha), con el epicotilo decapitado, los cotiledones y el ápice de la raíz eliminados y una incisión tipo T-invertida realizada en la parte superior del epicotilo decapitado; d) brotes producidos por una planta infectada defoliada y cultivada en una cámara de cultivo a 32°C durante dos semanas; e) brotes producidos por una varetta de una variedad infectada cultivada *in vitro* a 32°C durante dos semanas; f) brote vegetativo intacto (derecha) y preparado para la desinfección (derecha); g) sección histológica de un brote vegetativo de naranjo dulce en la que se indica la zona de corte para el aislamiento del ápice, h) ápice de naranjo dulce sobre el microbisturí usado para el aislamiento; i) detalle de un injerto recién hecho mostrando el ápice en el interior de la incisión del portainjertos; j) injerto recién hecho en un tubo de ensayo; k) sección histológica de un ápice de naranjo dulce 5 días después del injerto; l) naranjo dulce sobre el portainjertos 3 semanas después del microinjerto; m) naranjo dulce sobre el portainjertos 6 semanas después del microinjerto; n) mandarino libre de patógenos a los 2 años de la realización del microinjerto.

plantas a partir de embriones maduros de la mayoría de las especies, aunque es mucho más difícil la regeneración a partir de embriones inmaduros. La principal aplicación es la obtención de híbridos a partir de cruces interespecíficos que presentan incompatibilidad endospermo-embrión que impide el desarrollo de este último. Varias especies cultivadas se originaron por cruzamientos espontáneos entre distintas especies que generalmente son incompatibles y por tanto no se forman embriones y semillas viables después de la polinización y fertilización. Ocasionalmente entre millones de cruzamientos se puede producir una semilla que se desarrolle y de lugar a un híbrido que puede originar una nueva especie. Los cruzamientos entre especies próximas pero incompatibles se pueden abordar en programas de mejora mediante el rescate y cultivo *in vitro* de los embriones producidos para regenerar plantas híbridas. En algunos casos el objetivo es la creación de nuevas especies y en otros incorporar caracteres deseables de especies silvestres en especies comerciales. Este último caso es muy frecuente en programas de mejora de plantas hortícolas que pretenden la introducción de resistencia a patógenos. Cuando esta resistencia no se encuentra en la especie cultivada se recurre a especies silvestres próximas. El primer paso es la consecución de un cruce interespecífico, que normalmente es muy difícil por problemas de incompatibilidad. En algunos tipos de incompatibilidad se produce un embrión que en condiciones normales aborta, pero que es posible rescatar y cultivar *in vitro* antes del aborto para producir híbridos. Estos híbridos se usan como puentes genéticos y a partir de sucesivos retrocruzamientos se fijan en la especie cultivada los caracteres deseables de las especies silvestres. Es interesante destacar aquí, que en este tipo de procesos de mejora se aumenta la diversidad genética de la especie cultivada por la incorporación de genes de la especie silvestre.

Otra aplicación del cultivo de embriones es la obtención de híbridos triploides, que tienen muy baja fertilidad y como consecuencia producen frutos sin semillas que son muy apreciados por los consumidores. En la mayoría de los cruces interploides para obtener triploides se producen embriones, pero las semillas no se desarrollan debido a problemas derivados de las anormales relaciones de ploidía entre el embrión y el endospermo. En estos casos es posible cultivar los embriones *in vitro* para regenerar plantas triploides. En cítricos estamos aplicando de forma rutinaria esta técnica en un amplio programa de mejora para obtener mandarinos sin semillas, que ha permitido la protección y el inicio de la propagación comercial de nuevas variedades (Figura 6).

Obtención de plantas haploides

Las plantas haploides tienen grandes aplicaciones en mejora clásica, ya que por simple duplicación cromosómica permiten obtener de forma directa líneas puras homocigóticas, que facilitan y acortan en varios años los periodos necesarios para la obtención de variedades. Las líneas homocigóticas son también muy importantes en los programas de mejora por irradiación, ya que permiten identificar fácilmente los mutantes, particularmente los que portan genes recesivos de interés. En los últimos años, el desarrollo de la genómica estructural ha creado nuevas aplicaciones de las plantas haploides. La utilización de líneas totalmente homocigotas o líneas monoploides presenta una mayor ventaja para la realización de proyectos de secuenciación ya que facilita enormemente el ensamblaje, así como para el análisis del número de copias de genes candidatos.

La consecución de líneas puras por métodos convencionales se realiza por autofecundaciones sucesivas de varias generaciones (8-12) hasta fijar los caracteres deseados. Esto requiere muchos esfuerzos y además sólo se obtienen líneas casi puras.

La obtención de haploides se puede realizar de forma mucho más sencilla en un considerable número de especies mediante técnicas de cultivo *in vitro*. La mayoría de los haploides se obtienen por

cultivo de anteras o granos de polen,. También se pueden obtener plantas haploides mediante partenogénesis inducida por diversos sistemas y posterior cultivo *in vitro* de óvulos. En ambos casos las plantas se obtienen por una embriogénesis directa o mediante una fase intermedia de formación de callo y posterior regeneración indirecta. Como ejemplo de estas aplicaciones se puede citar que en el proyecto del Consorcio Internacional de Genómica de Cítricos se ha elegido una planta haploide de mandarina obtenida en nuestro laboratorio por el procedimiento de partenogénesis inducida por polen irradiado y cultivo de óvulos (Aleza et al., 2009) para la secuenciación de la especie que ya se ha iniciado en diversos laboratorios.

Hibridación somática

La hibridación somática o fusión de protoplastos es una herramienta biotecnológica que ha sido ampliamente empleada en la mejora genética de vegetales. La técnica se basa en el aislamiento y posterior unión de dos células no sexuales (somáticas) privadas de pared celular (protoplastos), para formar una única célula híbrida, denominada heterocarionte o híbrido somático, a partir de la cual se puede regenerar una planta entera empleando técnicas de cultivo *in vitro*. La fusión entre las células somáticas se induce

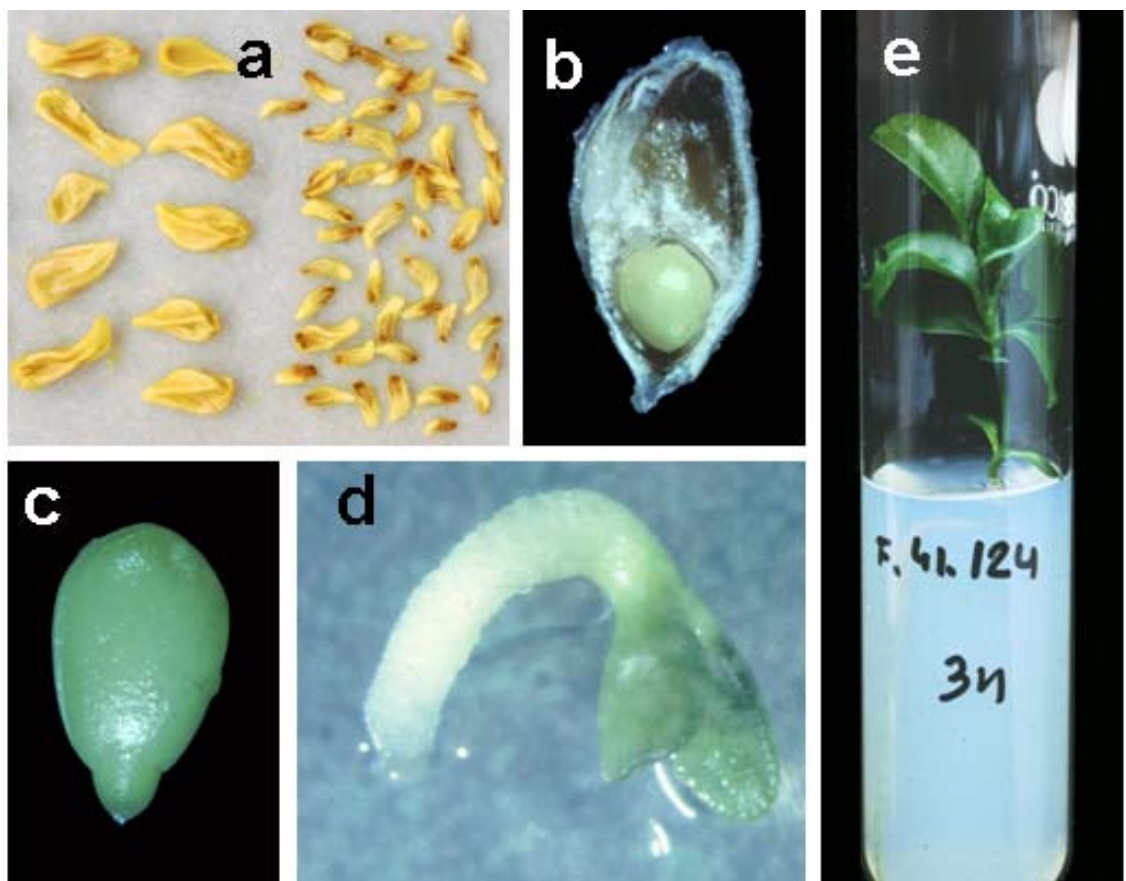


Figura 6. Rescate de embriones *in vitro* para la obtención de híbridos triploides de cítricos. a) semillas poco desarrolladas o abortadas en la que están los embriones triploides; b) semilla con los cotiledones degenerados con un embrión de 1 mm aproximadamente en su interior; c) embrión extraído de la semilla; d) embrión germinando *in vitro*; e) plántula triploide procedente del embrión.

mediante la adición al medio de cultivo de polímeros de alto peso molecular para producir la agregación y una solución rica en iones calcio a pH elevado para inducir la fusión. También hay métodos alternativos que inducen la fusión celular mediante la aplicación de campos eléctricos de corriente continua y alterna.

En la hibridación sexual los gametos (o células sexuales) se originan tras un proceso de meiosis que reduce a la mitad el número de cromosomas y además induce recombinación entre los cromosomas homólogos. La unión de los dos gametos (con número "x" de cromosomas) da origen a un nuevo individuo que presentará un número de cromosomas igual al de sus parentales (2x, diploide). La diferencia principal entre la hibridación sexual y la hibridación somática es que en esta última se suman los genomas de dos células somáticas, que no han sufrido la recombinación y reducción previa. Esto significa que si los parentales de partida son diploides, la planta híbrida obtenida tras la fusión de protoplastos será tetraploide. Los híbridos así obtenidos contienen el genoma nuclear de ambos parentales y pueden expresar los caracteres de ambos parentales, formando los denominados híbridos somáticos simétricos.

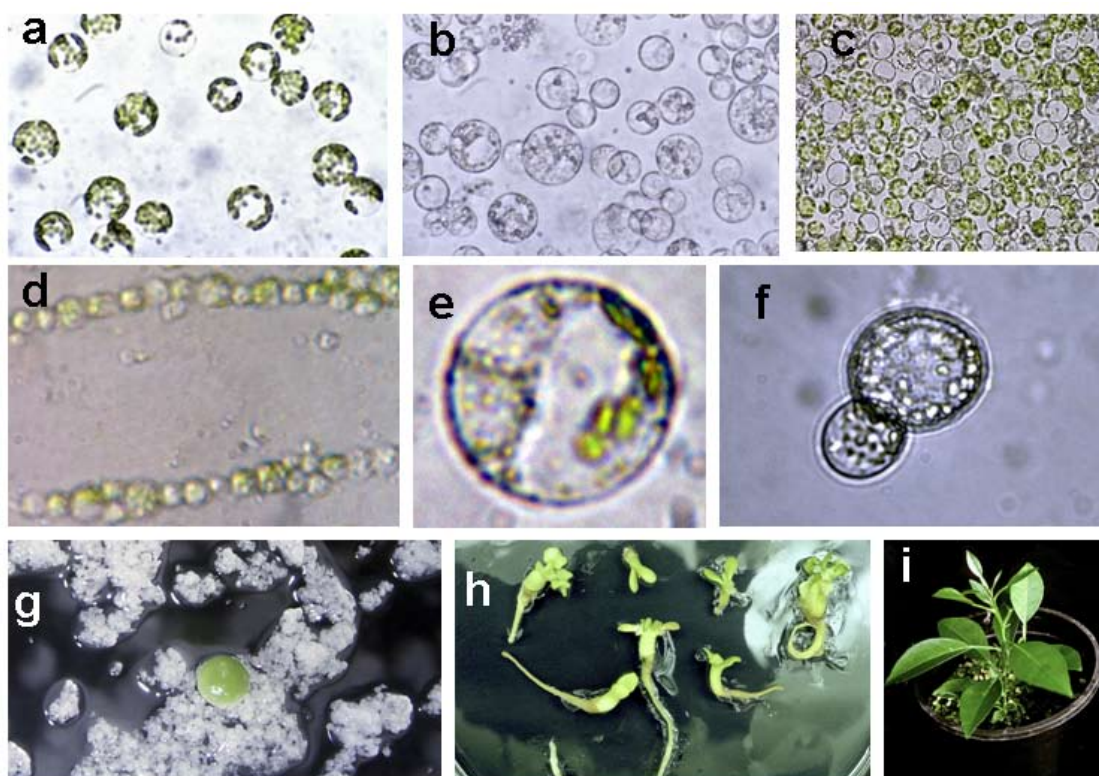


Figura 7. Hibridación somática en cítricos. a) protoplastos aislados de mesófilo hoja; b) protoplastos aislados de callo; c) protoplastos de ambos tipos aglutinados por acción del polietilenglicol; d) protoplastos de ambos tipos alineados por acción de la corriente eléctrica alterna; e) heterocarionte formado tras la fusión de protoplastos; f) primera división del heterocarionte; g) formación de embriones somáticos en el callo híbrido; h) germinación de embriones somáticos; i) híbrido somático.

También se pueden obtener híbridos somáticos asimétricos que poseen toda la información genética de uno de los dos parentales y solamente una parte del otro. Entre este tipo destacan los que presentan el núcleo de uno de los dos parentales y el citoplasma del otro (o el resultante de la reorganización de los

dos citoplasmas parentales). A este tipo de híbridos se le denomina híbridos somáticos citoplasmáticos o cíbridos y tienen un gran interés en la mejora genética ya que permiten modificar solamente los caracteres que están controlados por el genoma citoplasmático o que dependen de la interacción núcleo-citoplasma, sin modificar los caracteres regulados exclusivamente por el genoma nuclear. Este tipo de aproximación no es posible en la hibridación sexual, ya que el genoma citoplásmico se hereda solo por vía materna.

Mediante fusión de protoplastos se pueden obtener híbridos entre especies sexualmente incompatibles, lo que permite aprovechar la variabilidad extraespecífica para la mejora de las especies, que no podrían usarse mediante métodos convencionales.

Transformación genética

Los alimentos transgénicos se tratan con detalle en otro capítulo de este libro (Ramón, 2009), por lo que aquí solo se hacen unos comentarios generales. La transformación genética de plantas ofrece enormes posibilidades, ya que permite introducir caracteres únicos en genotipos de élite sin alterar su fondo genético. Está basada en las características de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*. Es una bacteria común que infecta a las plantas en lugares donde hay heridas produciéndoles agallas. En la naturaleza, *Agrobacterium* transfiere un segmento de su ADN a las células vegetales y lo integra en su genoma. En el ADN transferido se encuentran varios genes que, una vez integrados en los cromosomas, la célula vegetal reconoce como suyos. De esta forma las células vegetales han sido transformadas. Entre ellos se encuentran genes implicados en la síntesis de hormonas, como auxinas y citoquininas. La producción de estas hormonas a gran escala por las células vegetales transformadas hace que se dividan y proliferen sin control y se formen las agallas típicas de la enfermedad causada por la bacteria. Utilizando técnicas de ingeniería genética, se pueden retirar esos genes “nocivos” del genoma de *Agrobacterium*, es decir desarmar a *Agrobacterium*, y sustituirlos por otros genes de interés que queramos introducir en las plantas que hemos clonado de otros organismos.

Otra posibilidad de transformar las plantas es el “bombardeo” de tejidos de la planta con micropartículas de oro recubiertas con preparaciones de los genes que queremos introducir mediante la llamada pistola de genes, lo que permite la integración al azar de genes en los cromosomas de la planta. Tanto los tejidos tratados con *Agrobacterium* como los bombardeados con micropartículas se cultivan *in vitro* para regenerar plantas a partir de las células transformadas.

Esta tecnología supone un salto espectacular en la mejora genética. La variabilidad a utilizar para la mejora ya no está restringida a la especie a mejorar o a las especies próximas, sino que los genes de interés se pueden clonar de cualquier planta e incluso de otros organismos. Quizás debido a este hecho la técnica tiene importantes detractores, a pesar de que los alimentos transgénicos son los más seguros (Ramón, 2009). No obstante, el cultivo de plantas transgénicas está aumentando de forma continua y en el año 2008 se cultivaron unas 125 millones de hectáreas, fundamentalmente soja, maíz, algodón y colza, con resistencia a herbicidas e insectos. Se están empezando a cultivar otras plantas transgénicas como alfalfa, clavel, calabaza, papaya, tomate, álamo, remolacha, petunia y pimiento. Hay que destacar que la transformación genética es un complemento, aunque de gran importancia, a la mejora convencional. Mediante transformación se modifican aspectos puntuales de genotipos de élite obtenidos por mejora convencional. Por ejemplo, cualquier de las variedades de maíz de la figura 1 podría transformarse para introducir resistencia a herbicidas e insectos, pero lógicamente se han utilizado las variedades de alto rendimiento para este objetivo. Además, cuando disponemos de una planta transgénica con un gen determinado, se

utiliza como parental en programas de hibridación convencionales, ya que el gen introducido se comporta y hereda como un gen de la propia planta.

Perspectivas futuras

Según estimaciones de FAO la población mundial pasará de los 6.750 millones actuales a 9.200 millones en el año 2050. Además, la dieta está cambiando rápidamente en países como China para ingerir más alimentos de origen animal. Hay que tener en cuenta que para producir una caloría de pollo se necesitan 3 calorías de cereales, para una de cerdo 4-5 de cereales y para una de vacuno 7 de cereales. Esto implica que la demanda de alimentos agrícolas también va a aumentar para alimentar a la población existente. Debido a estos factores FAO estima que hay que duplicar la producción de alimentos para el año 2050.

Hay factores adicionales que causan preocupación. Actualmente las plagas, enfermedades y malas hierbas causan pérdidas del 40% de la producción. Además, debido a la intensificación de los intercambios agrícolas se prevé una mayor distribución de plagas y enfermedades transfronterizas, que de alguna forma tenderán a la globalización causando daños adicionales en áreas donde ahora no están presentes. El cambio climático producirá pérdidas de cosecha muy importantes debido a sequías, inundaciones y temperaturas extremas y también modificará el hábitat natural de muchas plagas.

Por otra parte se está produciendo un importante aumento de usos no alimentarios de los cultivos, como biocombustibles, biofactorías, obtención de sustitutos plásticos, etc, que pueden producir un importante incremento del precio de los alimentos, lo que puede tener efectos catastróficos para las poblaciones más desfavorecidas, como ya ha sucedido recientemente con la crisis de los precios de los alimentos, que aún no se ha solucionado totalmente.

Un problema fundamental es la situación de África. Aunque los problemas políticos tienen un papel importante en las situaciones de hambruna de importantes partes de la población, también es cierto que la revolución verde no estuvo en ningún momento dirigida a África, ya que las variedades de alto rendimiento de trigo, maíz y arroz no pueden cultivarse en las zonas áridas de la mayor parte del continente.

El incremento necesario de la producción de alimentos podría realizarse aumentando la superficie destinada a la agricultura. Actualmente se cultivan 1.400 millones de hectáreas en el mundo y la única superficie adicional disponible apta para la agricultura son los bosques tropicales, fundamentalmente en África y Sudamérica. Los incrementos de producción de alimentos deben basarse fundamentalmente en aumentos de rendimiento y la agricultura debe ser sostenible y conservar los recursos disponibles para generaciones futuras. Bajo ningún concepto se puede continuar aumentando la superficie de cultivo a costa de espacios naturales, ya que esto provocaría daños medioambientales incalculables. Los alimentos producidos deben ser cada vez más seguros y contribuir a la salud del consumidor.

La mejora genética de las especies cultivadas usando todas las tecnologías disponibles es la única solución al problema de producción de alimentos. Esto incluye la transformación genética, sin cuya contribución se producirían problemas medioambientales importantes. El objetivo general de la mejora genética debe ser el desarrollo de variedades de alto rendimiento, resistentes a plagas y enfermedades, que se adapten bien a cambios climáticos bruscos y que produzcan adecuadamente en suelos marginales y con escasez de agua.

Bibliografía

- Aleza P, Juárez J, Hernández M, Pina JA, Ollitrault P, Navarro L. 2009. Recovery and characterization of a *Citrus clementina* Hort. ex Tan. 'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole Citrus genome sequence. *BMC Plant Biology* 2009, 9:110.
- Burger JC, Chapman MA, Burke JM 2008. Molecular insights into the the evolution of crop plants. *American Journal Botany* 95: 113-122.
- Cubero JI 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. Ediciones Mundiprensa, Madrid, 567 pp.
- García Olmedo F, La tercera revolución verde. Plantas con luz propia. Editorial Debate, Madrid, 209 pp.
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez GJ, Buckler E, Doebley J, 2002 A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *PNAS* 2002 99:6080-6084.
- Navarro L, Juárez J. 2007. Shoot-tip grafting in vitro: impact in the citrus industry and research applications, pp.353-364. In: I. Khan (ed.), *Citrus Genetics, Breeding, and Biotechnology*. CAB International Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Paterson AH, Lin Y-R, Li Z, Schertz KF, Doebley JF, Pinson SRM, Liu SC, Stansel JW, Irvine JI, 1995. Convergent Domestication of Cereal Crops by Independent Mutations at Corresponding Genetic Loci. *Science* 269:1714-1718.
- Piperno DR, Ranere AJ, Holst I, Iriarte J, Dickau R, 2009. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico, *PNAS* 2009 106:5019-5024.
- Ramón D, 2009. *Biología de alimentos*. Este volumen.
- Vavilov NI, 1926. *Studies on the origin of cultivated plants*. Institut Botanique Appliqué et d'Amelioration des Plantes. State Press, Leningrad, USSR.
- Widholm JM, Nagata T, Lörz H, (Eds). 1988-2009. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer, London. Serie exhaustiva de 64 monografías sobre aplicaciones de la biotecnología en plantas.