

CULTIVO IN VITRO Y TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS

Breve descripción de la asignatura incluyendo las prácticas

Esta asignatura tiene como objetivo que el alumno conozca los fundamentos de los procesos de regeneración en células vegetales, así como los principios básicos para la manipulación genética de plantas. La posibilidad de aislar y cultivar células, tejidos y órganos, sin los efectos de correlación de la planta madre, con perfecto control de las condiciones ambientales y de nutrición, ofrece unas enormes posibilidades en el campo de la investigación y tiene además una gran cantidad de aplicaciones prácticas. El alumno podrá conocer las bases fisiológicas bioquímicas y moleculares de las dos rutas de regeneración, a saber, la organogénesis adventicia y la embriogénesis somática. Asimismo, se hace especial énfasis en el uso de esta tecnología en la mejora de plantas (obtención de haploides, selección de variantes somaclonales) así como en la propagación clonal (micropropagación). La transformación genética es hoy día una herramienta indispensable para los estudios de genómica funcional; por otra parte, desde un punto de vista aplicado, permite a los mejoradores elegir genes específicos, incorporando a la nueva planta sólo aquellos caracteres que son deseables. Dada su importancia, el conocimiento de las distintas técnicas para modificar las células vegetales, mediante tecnología de ADN recombinante, y la posterior regeneración de plantas transgénicas, es objetivo prioritario en esta asignatura.

Las clases prácticas programadas permitirán al alumno familiarizarse con el cultivo de explantos de origen diverso para abordar la regeneración de plantas mediante las vías organogénica o embriogénica, y el cultivo de microsporas para obtención de plantas haploides. También podrán adquirir los conocimientos necesarios para llevar a cabo la transformación de plantas mediante biobalística o tras la infección con *Agrobacterium tumefaciens*. Los alumnos deberán asimismo realizar un trabajo dirigido en el que tendrán la oportunidad de abordar un proyecto específico, que les ayude a desarrollar su actividad profesional mediante el análisis y la interpretación de datos de investigación.

Conocimiento previo necesario

Los antecedentes científicos del Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales son la biología celular, botánica y fisiología vegetal. Por tanto, conocimientos en algunas de esas materias resultarán importantes para la participación en este curso. Según los estudios de grado cursados, el alumno necesitará actualizaciones previas que serán orientadas por los profesores de la asignatura, de manera que, en general, los grados de ciencias en los que se incluyan algunas de las disciplinas mencionadas anteriormente, son apropiados para cursar esta asignatura.

Programa actualizado de la asignatura

Tema 1. RUTAS DE REGENERACIÓN: ORGANOGENESIS. Determinación y competencia morfogénica. Sistemas experimentales para estudiar el proceso. Citodiferenciación y ciclo celular. Polaridad celular. Comunicación intercelular. Organogénesis directa e indirecta. Sistemas experimentales. Aspectos fisiológicos, histológicos y moleculares del proceso.

Tema 2. RUTAS DE REGENERACIÓN: EMBRIOGENESIS SOMÁTICA. Definición. Ocurrencia *in vivo* e *in vitro*. Embriogénesis directa e indirecta. Aspectos fisiológicos, histológicos y moleculares del proceso.

Tema 3. VARIACIONES EN CULTIVO Y PLANTAS REGENERADAS. Variación espontánea in vitro. Bases de los cambios genéticos: Alteraciones en la planta madre y alteraciones que aparecen durante el cultivo. Uso de los variantes somaclonales en la mejora de plantas.

Tema 4. PRODUCCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES. Introducción. Cultivo de anteras y microsporas. Factores que afectan a la androgénesis. Ontogenia de haploides androgénicos. Regeneración de plantas a partir de embriones haploides. Ginogénesis. Diploidización. Aplicaciones prácticas. Producción de plantas dihaploides de trigo mediante cruzamiento con maíz.

Tema 5. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA (I) Transformación mediada por *Agrobacterium*. Mecanismos moleculares de la transferencia del T-DNA al genoma vegetal. Ventajas e inconvenientes del sistema de transformación por *Agrobacterium*. Desarrollo de un protocolo de transformación mediado por *Agrobacterium*.

Tema 6. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA (II) Transferencia directa de genes. Electroporación de tejidos y protoplastos. Transformación por biobalística. Parámetros del sistema biobalístico. Ventajas e inconvenientes del sistema biobalístico. Desarrollo de un protocolo de transformación.

Tema 7. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA (III). Nuevas metodologías en transformación genética: eliminación de genes marcadores; transformación de cloroplastos; silenciamiento génico mediante RNAi; edición del genoma. Aplicaciones agrícolas de la transformación: Maduración retardada de frutos, tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos, virus y hongos. Otras aplicaciones.

Bibliografía recomendada

Bhojwani , S.S., Dantu, P.K. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer, London

Francis, D., Finer, J.J., Grotewold, E., 2017. Challenges and opportunities for improving food quality and nutrition through plant biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44, 124–129.

Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., Sangwan, R.S. 2011. De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends in Plant Science*, 16:597-606

Dunwell, J.M., Wetten, A.C. 2012. Transgenic Plants: Methods and Protocols. Springer, New York

Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E., Endo, S., Yamada, K., Komamine, A., 2001. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep.* 20, 383–392.

George, E.F., Hall, M.A., De Klerck, G.J. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. Springer Verlag.

Germaná, M.A., Lambardi, M., 2016. In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Humana Press

Gordon, S.P., Heisler, M.G., Reddy, G.V., Ohno, C., Das, P., Meyerowitz, E.M. 2007. Pattern formation during the new assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development*, 134: 3539-3548.

Karami, O., Esna-Ashari, M., Karimi Kurdistani, G., Aghavaisi, B., 2009. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: The role of host. *Biol. Plant.* 53, 201–212.

Lee, L.-Y., Gelvin, S.B., 2008. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol.* 146, 325–32.

Loyola-Vargas,V., Ochoa-Alejo, N. (eds.) 2016. Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications, Springer-Verlag.

McCullen, C. a, Binns, A.N., 2006. Agrobacterium tumefaciens and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22, 101–27.

Meng, L., Zhang, S., Lemaux, P. 2010. Toward molecular understanding on *in vitro* and *in planta* shoot organogenesis. Critical Reviews in Plant Sciences, 29:108-122.

Neelakandan, A.k., Wang, K. 2012. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. Plant Cell Report: 31: 597-620

Thomson, J.A., 2018. The pros and cons of GM crops. Funct. Plant Biol. 45, 297.

Trigiano, R.N., Gray, D. 2011. Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology. CRC Press, London.

Tzfira, T., Citovsky, V., 2006. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 17, 147–54. **Yang, X., Zhang, X. 2010.** Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. Critical Reviews in Plant Science, 29:36-57.

Editorial especializada en Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales: Agritech Consultants, Inc. PO Box 255. Shrub Oak, NY 10588, U.S.A. Phone/Fax: (914) 528-3469. E-mail: agritech@agritechpublications.com. Website: www.agritechpublications.com

PRÁCTICAS

Inducción de organogénesis adventicia en segmentos de tallo de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y hojas de *Begonia* spp.

Embriogénesis somática en olivo (*Olea europaea*)

Micropropagación de olivo vía secciones nodales

Cultivo de microsporas de *Brassica* para obtención de plantas haploides

Transformación genética de fresa (*Fragaria x annanassa*)

Trabajo dirigido sobre un tema de libre elección

Especialidad del profesorado

Fernando Pliego Alfaro

Ingeniero agrónomo por la Universidad de Córdoba y Ph.D. por la Universidad de California, Riverside, USA (1981). Durante el curso académico 1991-1992 trabajó en el Tropical Research Experimental Station, Homestead, Universidad de Florida, estudiando las bases fisiológicas del proceso de embriogénesis somática en frutales subtropicales. En la actualidad, es catedrático de Fisiología Vegetal de la Universidad de Málaga y Director del Instituto Andaluz de Biotecnología. Ha sido Presidente de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Su línea de investigación se centra en el desarrollo de protocolos

eficientes de regeneración y transformación genética en dos especies recalcitrantes de interés hortofrutícola, olivo y aguacate, con objeto de poder abordar su mejora mediante métodos biotecnológicos. Así, se han desarrollado protocolos eficientes de regeneración en ambas especies, vía embriogénesis somática, y de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, a partir de explantos juveniles. En la actualidad, se están transformando con genes que inducen floración precoz, con objeto de acortar el periodo juvenil y acelerar el proceso de mejora, y genes que inducen tolerancia a hongos de suelo (<http://hortofruit.biotec.uma.es/>).

José A. Mercado

Es licenciado en Ciencias Biológicas y doctorado por la Universidad de Málaga en 1994. Durante su etapa predoctoral realizó una estancia en la Universidad de California en Davis. Fue investigador postdoctoral del IFAPA, Centro de Churriana, durante los años 1994-1997. En 1997 se incorporó a la Universidad de Málaga como Profesor Asociado. En la actualidad es Catedrático de Fisiología Vegetal en el Departamento de Biología Vegetal. Su investigación actual se centra en la mejora biotecnológica de especies de interés agronómico mediante técnicas de cultivo in vitro y transformación genética, principalmente en aspectos relacionados con la maduración del fruto y la tolerancia a patógenos fúngicos en fresa (<http://hortofruit.biotec.uma.es/>).

Francisco Barro Losada

Es licenciado y doctor en Ciencias Biológicas (1992) por la Universidad de Córdoba. Ha sido becario postdoctoral del Ministerio de Agricultura en Rothamsted Research, Harpenden, (Reino Unido) desde 1994 hasta 1996. Posteriormente se incorpora al IAS (CSIC, Córdoba), con un contrato de doctor, y posteriormente (1998) como Científico Titular. Desde 2003 es Investigador Científico en el IAS. Ha sido jefe del departamento de mejora genética en el IAS. Ha sido adjunto de ANEP para el área de agricultura desde 2010 a 2015. Sus investigaciones sobre mejora genética incorporan técnicas como la transformación genética, ARNi, edición del genoma y cultivo de microsporas para la obtención de variedades vegetales de alto valor añadido. Entre las investigaciones destacan la técnicas de obtención de doble haploides en mejora vegetal y las aplicaciones del ARNi para la obtención de variedades de trigo libres de gluten apta para celíacos. <http://www.ias.csic.es/mejora-genetica-vegetal/biotecnologia-vegetal/francisco-barro-losada/>