

Utilización del rescate de embriones en programas de mejora vegetal

Apellidos,
nombre

Gisbert Doménech, Carmina (cgisbert@btc.upv.es)

Picó Sirvent, María Belén (mpicosi@btc.upv.es)

Departamento de Biotecnología

Universitat Politècnica de València

1 Resumen de las ideas clave

En este artículo vamos a presentar en qué consiste y para qué se utiliza la técnica del rescate de embriones en el contexto de la mejora genética vegetal. Esta técnica es gran interés cuando se realizan cruzamientos, generalmente para transferir una característica determinada de uno de los parentales al otro y se presentan problemas de incompatibilidad, que se manifiestan tras la formación del embrión (a nivel postcigótico). En los programas de mejora es frecuente la realización de este tipo de cruzamientos, con el fin de introgresar genes de resistencia procedentes de una variedad resistente en la susceptible. Sin embargo, en muchas ocasiones, este tipo de hibridaciones no da como resultado una planta híbrida, por existir problemas de compatibilidad que impiden la formación o el desarrollo del embrión. Cuando, a pesar de existir estos problemas, se forma el embrión pero no se desarrolla, existe la posibilidad de extraerlo y cultivarlo en condiciones de asepsia en medios de cultivo *in vitro* que facilitarán su desarrollo. A esta metodología se la conoce como rescate de embriones.

La extracción de embriones y su siembra en medios de cultivo *in vitro* también puede realizarse con el fin de acortar tiempo entre generaciones en los programas de mejora. Con esta finalidad, la extracción y cultivo de embriones puede llevarse a cabo en programas en los que se ha partido de un cruce con problemas de compatibilidad, pero también en cruzamientos que no presentan este tipo de problemas. En la mayoría de los programas de mejora, tras la obtención de un híbrido inicial, se requiere de la realización de retrocruces entre el híbrido resistente y el parental recurrente que posee las características agronómicas de interés y en el que se pretende introducir la resistencia. Estos cruces y la selección de los materiales en las sucesivas generaciones alargan los programas de mejora y con el fin de acortarlos, se pueden extraer los embriones en estadios tempranos y germinarlos *in vitro*. Las plantas procedentes de estos embriones se transferirán posteriormente a condiciones de cultivo estándar para continuar con el programa.

2 Introducción

El primer investigador en demostrar que la extracción y cultivo de embriones en medios con nutrientes y bajo condiciones de asepsia era viable fue E. Hanning en 1940. Desde entonces, el rescate de embriones se ha aplicado en distintos programas de mejora, como por ejemplo programas para introgresar genes de resistencia a distintas enfermedades desde *Solanum peruvianum* a tomate (Picó et al. 2002; Díez et al. 2014) o para la obtención de híbridos interespecíficos en programas de mejora de lenteja (Saha et al. 2014). Como se ha comentado anteriormente, también se ha utilizado en algunos programas con el fin de acortar el ciclo generacional. Recientemente, esta técnica se ha utilizado con esta finalidad en cultivos como el girasol (Dagustu et al. 2010) y el algodón (Wang et al. 2011).

El cultivo de embriones *in vitro* supone la desinfección del material de partida y la extracción y siembra de las semillas en condiciones de asepsia. Estas semillas se sembrarán en placas con medios de cultivo que diferirán según los materiales a rescatar y el estadio de desarrollo de los embriones. El establecimiento de cultivos *in vitro*, la preparación de medios de cultivo para poder utilizar esta técnica y un

procedimiento para el cultivo de embriones inmaduros de tomate, pueden consultarse en Gisbert et al. (2008); en <http://hdl.handle.net/10251/9798> y <http://hdl.handle.net/10251/9799>. Factores de gran importancia a tener en cuenta para alcanzar el desarrollo del embrión al utilizar esta técnica van a ser la manipulación del mismo en condiciones de extremo cuidado para evitar dañarlo durante la extracción y siembra, el estadio de desarrollo en el que se encuentre el embrión y, la composición del medio de cultivo. En general, la extracción será más sencilla en fases más avanzadas de desarrollo, que además requerirán de menor dependencia alimenticia. De este modo, la dificultad del rescate de embriones disminuirá según estos vayan desarrollándose desde el estadio globular, a corazón (cordiforme), torpedo y cotiledonar (Figura 1).

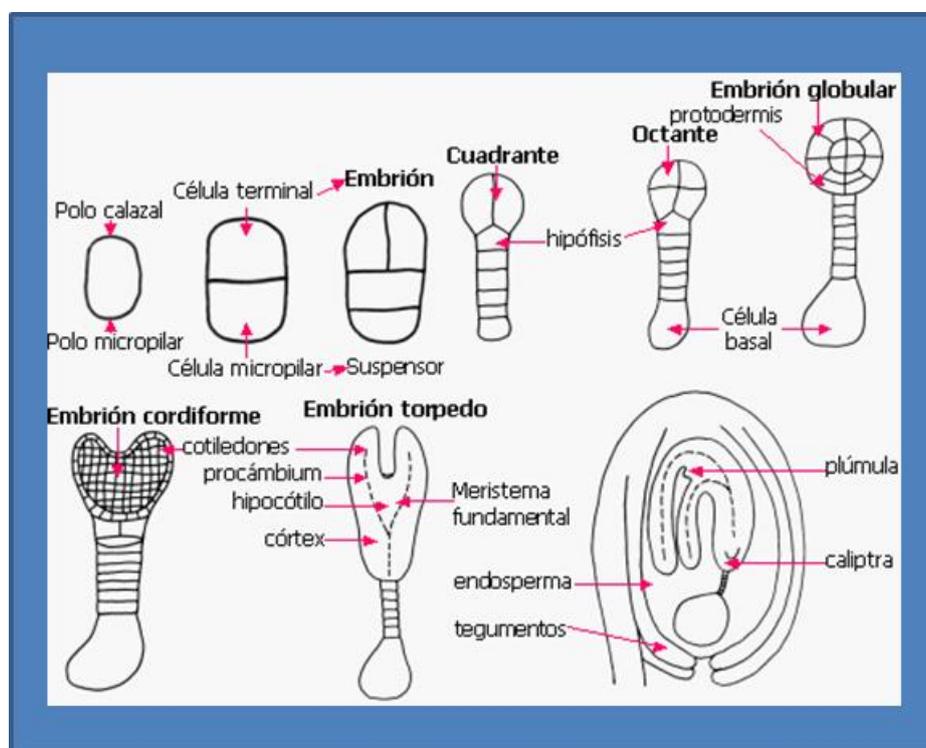


Figura 1. Fases de desarrollo del embrión en plantas dicotiledóneas (fuente: www.biología.edu.ar)

3 Objetivos

Una vez que el alumno se lea con detenimiento este documento, será capaz de:

- Formular en qué consiste el cultivo de embriones y saber para que se utiliza.
- Describir y explicar los diferentes factores que influyen en el cultivo y la importancia relativa de cada uno.
- Conocer la metodología básica para poder aplicar esta técnica.

4 Desarrollo

En el resumen y en la introducción hemos podido comprobar cómo esta técnica, que se inició en 1940, se sigue utilizando en la actualidad. **¿Por qué se sigue utilizando una metodología aparentemente antigua?** La respuesta a esta pregunta está relacionada con la variabilidad genética existente en el germoplasma vegetal y que es la fuente de genes en los programas de mejora. Disponemos de numerosas plantas cultivadas seleccionadas por presentar características de interés, pero que son susceptibles a distintos tipos de estreses de tipo biótico y/o abiótico, que limitan su rendimiento y que es necesario mejorar. En este sentido, el cribado de accesiones pertenecientes a especies próximas a la especie a mejorar para la identificación de resistencias u otras características de interés es esencial. Una vez identificada la accesión resistente a un tipo de estrés se continúa el programa hibridando con la variedad a mejorar. Sin embargo, los problemas de cruzabilidad entre las especies cultivadas y los ancestros silvestres son frecuentes y esta situación incrementa la dificultad de introducir los genes de interés.

Si en un cruce no existen problemas de incompatibilidad, el rescate de embriones no será necesario, si existen, el rescate será necesario cuando la incompatibilidad sea causada por genes nucleares y se llegue a formar el embrión. Si los causantes de la incompatibilidad son genes citoplasmáticos, podríamos realizar el cruce inverso para solucionar este problema.

En aquellos cruces en los que se observa que el embrión llega a formarse, pero aborta podremos aislarlo para cultivarlo *in vitro*. Como se ha comentado anteriormente, también se pueden aislar embriones de cruces sin problemas de incompatibilidad, para obtener plántulas en un periodo de tiempo menor que el empleado si esperáramos a la formación y maduración de la semilla, y a la subsiguiente germinación.

El procedimiento para llevar a cabo un rescate de embriones o un cultivo se resume en:

1. Realización de cruces.
2. Determinación de los días después del cruce en los que se van a extraer los embriones para su cultivo.
3. Desinfección de los frutos.
4. Extracción de las semillas y de los embriones que contienen, en condiciones de asepsia (Figura 2). Se utilizan agujas y lupa binocular para realizar la extracción.
5. Siembra de los embriones en placas con medios de cultivo apropiados para la maduración y germinación de los embriones aislados.
6. Sellado de las placas utilizando parafilm u otra cinta adhesiva, que permita la transpiración.
7. Incubación de las placas en cámaras de cultivo, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad (generalmente en oscuridad durante los primeros días tras la siembra).
8. Extracción de las plantas cultivadas *in vitro*, aclimatación y trasplante a condiciones estándar de cultivo *in vivo*.

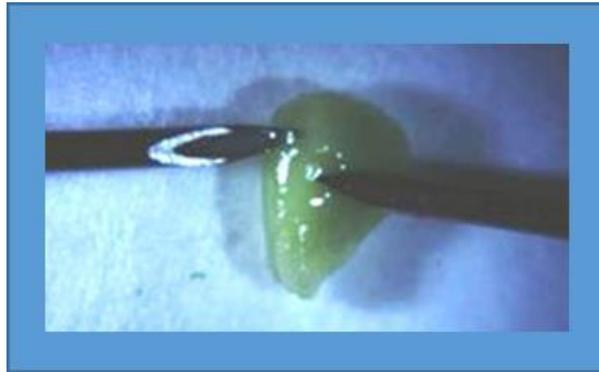


Figura 2. Extracción del embrión a partir de una semilla inmadura.

Determinar el momento más adecuado para realizar la extracción de los embriones es importante, por lo que se suele llevar a cabo un ensayo para determinar en qué estadio se produce el aborto de los embriones.

La extracción y siembra en condiciones de asepsia también lo es, puesto que se pretende el cultivo del embrión no de hongos o bacterias que puedan estar presentes.

En cuanto al medio de cultivo, su composición dependerá de los genotipos a rescatar y el estadio de desarrollo. Por ejemplo, en Gisbert et al. (2008) se describe un medio para aislar embriones de tomate en fase globular o corazón, compuesto por sales minerales, sacarosa, agar y los reguladores de crecimiento bencilaminopurina y ácido 2,4 D diclorofenoxiacético, que ha resultado adecuado en distintos cruces. Sin embargo, con un medio de composición similar no se obtuvieron buenos resultados al utilizar semillas inmaduras en materiales de tomate derivados de *S. peruvianum*. En este caso, fue más eficiente un medio de cultivo que contenía el regulador de crecimiento, zeatina (Díez et al. 2014).

Teniendo en cuenta todos los aspectos anteriores, la incubación de los embriones en condiciones de luz, humedad y fotoperiodo permitirá el desarrollo de alguno de los embriones aislados, y la continuación con el programa de mejora si las plantas obtenidas son fértiles.

En la bibliografía se referencian distintos materiales que incluyen libros y artículos docentes (Gisbert et al. 2008; Gisbert et al. 2011a; Gisbert et al. 2011b), vídeos (Fita et al. 2012) y artículos de investigación (Picó et al., 2002; Díez et al. 2014; Saha et al. 2015) que nos ayudarán a profundizar en la metodología explicada.

En la siguiente figura (figura 3) podemos observar un embrión sembrado en el estadio corazón a los 7 días de cultivo, que ya está cambiando al estado de torpedo (A) y la planta que ha germinado de este embrión a los 20 días de cultivo (C) y, otro embrión aislado y sembrado en estadio cotiledonar (B) y la planta obtenida a los 20 días de cultivo (D).

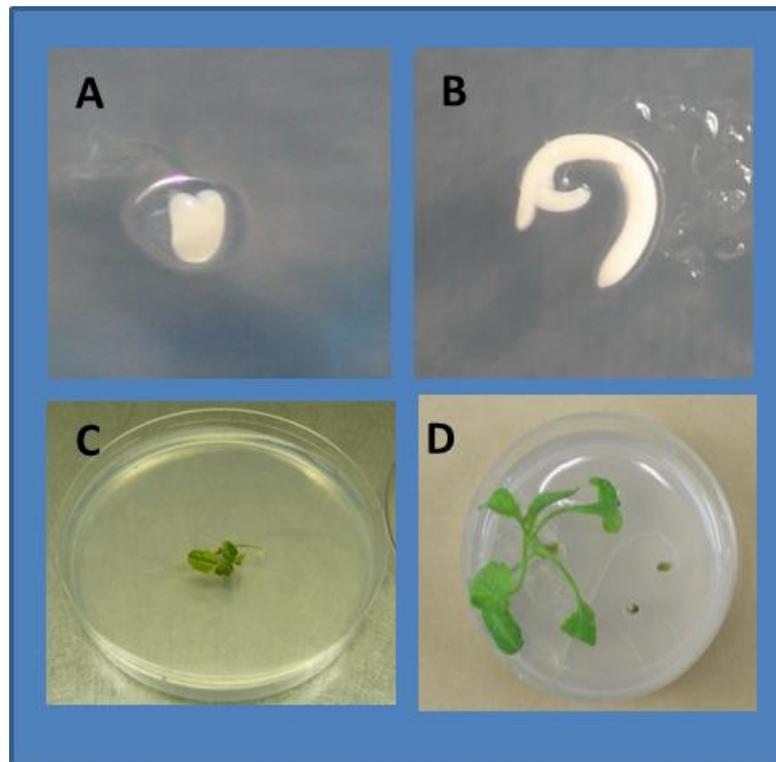


Figura 3. **A.** Embrión obtenidos a partir de una semilla inmadura de un fruto resultante de un cruzamiento entre tomate cultivado y *S. peruvianum*. **B.** Embrión extraído de un fruto inmaduro tras una autofecundación en tomate. **C y D.** Plantas resultantes del cultivo de los embriones A y B a los 20 días de cultivo.

Como puede observarse en esta figura (D) no todos los embriones sembrados han desarrollado. En este caso, posiblemente debido a la ocurrencia de daños durante el proceso de extracción.

5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto en qué consiste la técnica de rescate de embriones y en qué situaciones se utiliza en el contexto de la mejora genética vegetal. Se plantean ahora distintas preguntas con el fin de que el alumno pueda comprobar si ha adquirido los conocimientos que se pretendían con este artículo.

¿En qué consiste el rescate de embriones?

¿Para qué se utiliza el rescate de embriones en mejora vegetal?

¿Qué factores son los más influyentes en este tipo de cultivo?

¿Por qué se desinfectan los frutos y se utilizan condiciones de asepsia en el cultivo?

¿Se puede utilizar esta metodología en todos los tipos de cruzamientos?

¿Si se consigue germinar los embriones, podemos asegurar la continuidad del programa de mejora?

6 Bibliografía

Dagustu, N.; Sincik, M.; Bayram, G.; Bayraktaroglu, M. (2010). Regeneration of fertile plants from sunflower (*Helianthus annuus* L.) – immature embryo. *Helia* 33: 95-102.

Díez, M.J.; Gisbert, C.; Campos G, Pérez de Castro, A. (2014). Obtención de materiales derivados de *Solanum peruvianum* PI126944 mediante cultivo in vitro de semillas inmaduras. *Acta Horticultura* 69: 157-158.

Fita Fernández, A.M.; Manzur Poblete, J.P.A. (2012). Rescate de embriones inmaduros in vitro. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/16770>

Gisbert, C.; Fita, A.; Díez M.J.: 'Prácticas de Cultivo in vitro y transformación genética de plantas'. Ed. Universitat Politècnica de València (2008) ISBN-978-84-8363-307-6

Gisbert, C. (2011). Establecimiento de cultivos in vitro a partir de semillas o de material de campo. Polimedia ETSIAMN. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/9798>

Gisbert, C. (2011). Preparación de medios de cultivo para el cultivo in vitro de plantas o de material vegetal. Dponible en: <http://hdl.handle.net/10251/9799>

Hannig, E. (1904). Zur Physiologie pflanzlicher embryonen. I. Über die kultur von cruciferen-embryonen ausserhalb des embryosacks. *Bot. Ztg.* 62: 45-80.

Picó, B.; Herraiz, J.; Ruiz, J.J.; Nuez, F. (2002). Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 94: 73-89.

Saha, S.; Tullu, A.; Yuan H. Y.; Lulsdorf M. M.; Vandenberg A. (2015). Improvement of embryo rescue technique using 4-chloroindole-3 acetic acid in combination with in vivo grafting to overcome barriers in lentil interspecific crosses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120:1109-1116.

Wang, X.F.; Wang, Y.X.; Zhang, G.Y.; Ma, Z.Y. (2011). An integrated breeding technology for accelerating generation advancement and trait introgression in cotton. *Plant Breeding* 130: 569-573.