

Este texto está dirigido a quienes estudian Biotecnología Vegetal y asignaturas afines en la Universidad de Granada. Constituye un compendio de las lecciones y de la experiencia acumulada por el autor durante veinte años de docencia de esta disciplina en diferentes titulaciones y másteres impartidos en la Universidad de Granada. En el mismo se exponen las materias fundamentales de la Biotecnología Vegetal, incluyendo el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales y sus aplicaciones; la clonación de plantas mediante micropropagación; la producción de individuos haploides; la obtención de plantas libres de enfermedades por cultivo de meristemas; el cultivo en biorreactor para la síntesis de metabolitos secundarios de interés para la industria química y farmacéutica; las plantas como biofactorías; el genoma vegetal; la obtención de plantas transgénicas y sus principales aplicaciones; y la repercusión de la Biotecnología Vegetal sobre la sociedad y sus perspectivas de futuro. Los diferentes capítulos están estructurados siguiendo un esquema didáctico que procura ofrecer la mayor claridad y concisión en cada apartado, con objeto de facilitar su comprensión y asimilación por el alumnado, aunque sin descuidar la necesaria profundidad y rigor científico en cada uno de los temas.



LUIS E. GARCÍA DEL MORAL GARRIDO

# BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

## FUNDAMENTOS Y APLICACIONES



LUIS F. GARCÍA DEL MORAL GARRIDO

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL  
FUNDAMENTOS Y APLICACIONES

Granada, 2021

COLECCIÓN MANUALES MAJOR  
Serie Ciencias



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

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

# Índice de contenidos

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

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

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

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

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

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

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

Femtoinyección. ....	295
Biolística o biobalística .....	295
Principales limitaciones de las técnicas de transformación. ....	297
Transformación de cloroplastos: Plantas transplastómicas. ....	297
Ventajas de la transformación de cloroplastos. ....	299
Transformación de mitocondrias .....	300
21 APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL A LA MEJORA DEL METABOLISMO FOTOSINTÉTICO Y DEL NITRÓGENO. ....	301
Modificación del metabolismo vegetal .....	302
Metabolismo fotosintético .....	303
Actuaciones sobre la actividad enzimática .....	304
Introducción de la vía C <sub>4</sub> en cultivos C <sub>3</sub> .....	306
Ingenierización de carboxisomas de cianobacterias o pirenoides de algas en plantas C <sub>3</sub> .....	307
Actuaciones sobre los componentes del sistema fotoquímico .....	308
Relajación más rápida del mecanismo de fotoprotección .....	308
Aumento del Complejo citocromo <i>b<sub>f</sub></i> .....	309
Ampliación del espectro de absorción de luz fotosintéticamente activa .....	309
Cambios en el tamaño de la antena de los fotosistemas.. ....	310
Aumento de la captación de CO <sub>2</sub> .....	310
Metabolismo del nitrógeno .....	312
Transferencia directa de la nitrogenasa bacteriana a cereales y otras plantas de cultivo .....	313
Ingeniería de la biosíntesis de nitrogenasa en células vegetales .....	313
Ingeniería de la nitrogenasa para prevenir su inactivación por oxígeno.. ..	315
Simbiosis de leguminosas en la ingeniería en cereales .....	315
Utilización de endófitos bacterianos asociados naturalmente a los cereales .....	317
22 APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA A LA MEJORA DE LOS PRODUCTOS VEGETALES .....	319
Mejora del contenido proteico .....	319
Mejora del contenido lipídico .....	322
Biofortificación de cultivos.. ....	324
Biofortificación con Fe. ....	325
Biofortificación con Zn. ....	325
El arroz dorado. ....	326
Otras mejoras nutricionales. ....	327
Mejora para cualidades organolépticas .....	329
Mejora para las industrias de transformación .....	329
Mejora de la calidad tecnológica .....	330

23 LAS PLANTAS COMO BIOFACTORÍAS.. ....	333
Elección de un cultivo para la agricultura molecular .....	333
Ventajas de la utilización de plantas como biofactorías .....	334
Inconvenientes de la utilización de plantas como biofactorías... ..	335
Protección de la proteína recombinante contra la degradación.. ....	337
Reticulo endoplásmico. ....	337
Vacuolas .....	337
Cloroplastos .....	338
Extracción y purificación de la proteína recombinante .....	338
Expresión transitoria de genes .....	339
Producción de anticuerpos (planticuerpos) .....	340
Producción de vacunas... ..	342
Ventajas y dificultades de las vacunas comestibles.. ....	342
Producción de otros biofármacos .....	344
Producción de enzimas con interés industrial.. ....	344
Otros compuestos. ....	345
Bioplásticos .....	345
Transformación de cloroplastos.. ....	346
24 BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN .....	347
Incremento de la eficacia en la producción de polen... ..	347
Interacciones polen-estigma .....	348
Interacciones gameto-gameto .....	348
Polinización <i>in vitro</i> .. ....	348
Estudios básicos sobre fertilización y desarrollo del cigoto .....	350
Hibridación mediante polinización <i>in vitro</i> ... ..	350
Aplicaciones biotecnológicas al desarrollo floral.. ....	351
Biotecnología de la androesterilidad.. ....	352
Desarrollo de la semilla .....	354
Desarrollo del fruto.. ....	354
Frutos con maduración retardada .....	355
Obtención de frutos sin semillas .....	356
25 BIOTECNOLOGÍA DE LA RESISTENCIA A FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS .....	359
Resistencia a herbicidas... ..	359
Resistencia a plagas animales .....	362
Expresión de toxinas bacterianas .....	362
Expresión de genes de origen vegetal .....	364
Resistencia frente a hongos y bacterias .....	365



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