



Curso Nacional
de Mejora
Genética
de Plantas
2019



Sociedad
Española de
Genética



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Cultivo in vitro y Mejora Vegetal

Vicente Moreno Ferrero

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
(UPV – CSIC, Valencia)*

Almería, 7 de Febrero de 2019



HM • CLAUSE



SAKATA



TAKII SEED

syngenta

- El Cultivo in vitro en el contexto de la Mejora Vegetal
- Morfogénesis: organogénesis y embriogénesis somática
- Micropropagación, propagación clonal y mejora sanitaria
- Haploides y doble-haploides
- Variación somaclonal: selección in vitro y somaclonal
- Hibridación interespecífica sexual mediante técnicas de CIV
- Fusión de protoplastos (hibridación somática)
- Transformación genética
- Mejora asistida por transformación
- Mutagénesis insercional e identificación de genes relevantes

Cultivo *in vitro* de Células y Tejidos Vegetales

Conjunto de técnicas que permiten el **cultivo de las células vegetales en condiciones axénicas** y el **aprovechamiento de su totipotencia**, así como de su **aptitud para la variación** y la **capacidad de modificación genética mediante transformación y fusión celular**



Aportaciones del cultivo in vitro en la mejora

- **Mayor rapidez en la obtención de ciertos logros** (e.g. generación de líneas puras, transferencia de un gen, etc.)
- **Objetivos difíciles de conseguir por los métodos clásicos** (e.g. arroz NERICA: New Rice for Africa)
- **Objetivos inabordables por los métodos convencionales** (e.g. sistema Bt, arroz dorado, resistencia a virus derivada del patógeno, modificación controlada de genes, etc.)
- **Ayuda en aspectos concretos de los programas de mejora**

Principios en los que se fundamentan las aplicaciones del cultivo in vitro en la mejora

- **Totipotencia** de las células vegetales
- **Estabilidad genética** en procesos de **morfogénesis directa**
- **Cambios genéticos** en procesos de **morfogénesis indirecta**
- **Manipulaciones genéticas**
 - Transformación
 - Manipulaciones génicas
 - Fusión celular
 - Manipulaciones genómicas
 - Manipulaciones cromosómicas
 - Manipulaciones subcromosómicas
 - Recombinación intergenómica
- **Simplicidad:** la manipulación de las plantas se realiza a un nivel casi comparable, aunque no idéntico, al de los microorganismos

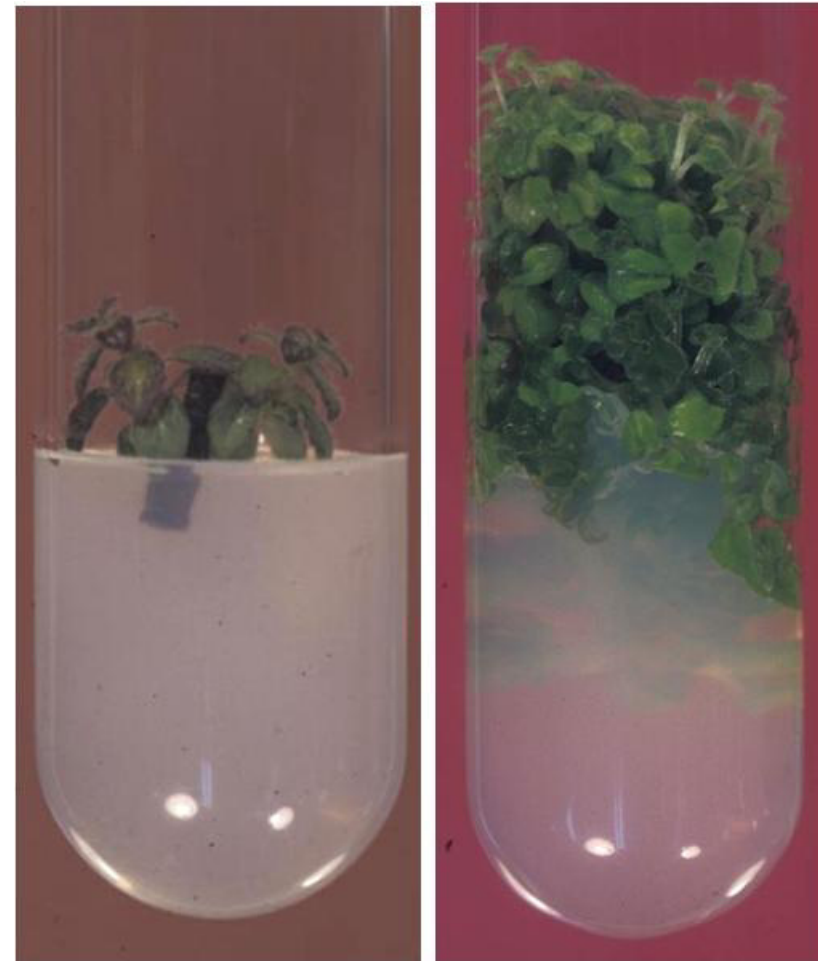
Morfogénesis: organogénesis y embriogénesis somática

- Organogénesis axilar, i.e. a partir de meristemos preexistentes
- Organogénesis adventicia, i.e. *de novo*
 - Organogénesis adventicia directa
 - Organogénesis adventicia casi directa
 - Organogénesis adventicia indirecta
- Embriogénesis somática
 - Embriogénesis somática casi directa
 - Embriogénesis somática indirecta

Organogénesis axilar: regeneración a partir de meristemos preexistentes



Cultivo de ápices meristemáticos y yemas axilares (propagación clonal)



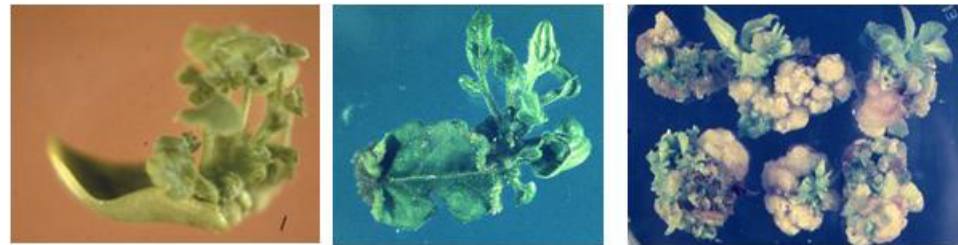
Brotación axilar (micropropagación)

Organogénesis adventicia: proceso morfogénético de tipo unipolar que determina el desarrollo de un brote o de la raíz

Directa: regeneración sin una fase de crecimiento desorganizado

Casi directa: regeneración tras unas pocas rondas de división celular

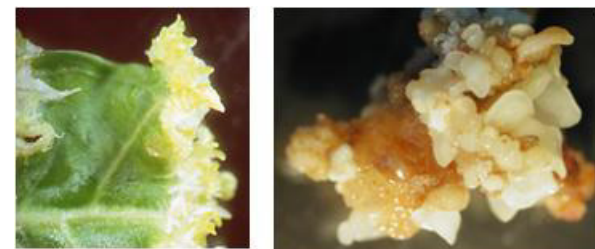
Indirecta: regeneración tras una fase de crecimiento desorganizado (i.e. tras la formación de un callo)



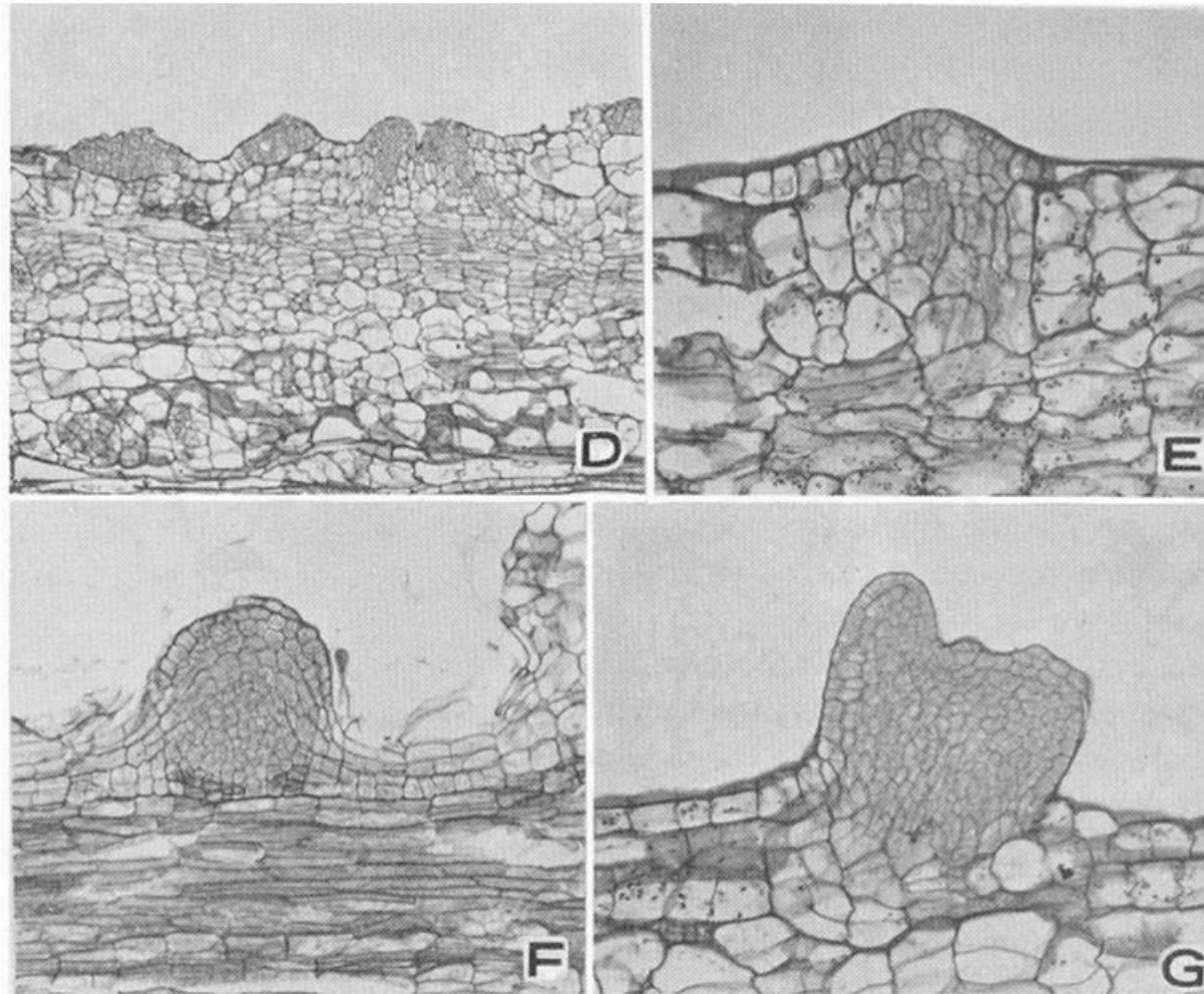
Embriogénesis somática: proceso morfogénético de tipo bipolar que determina el desarrollo de embrión

Casi directa: regeneración tras unas pocas rondas de división celular

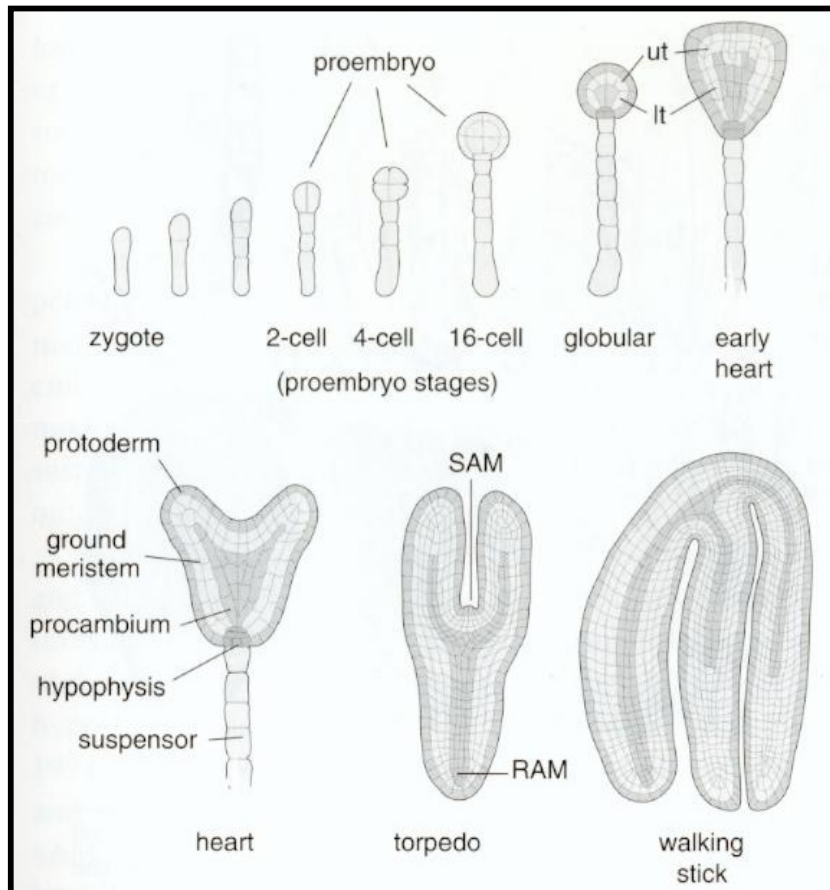
Indirecta: regeneración tras una fase de callo desorganizado



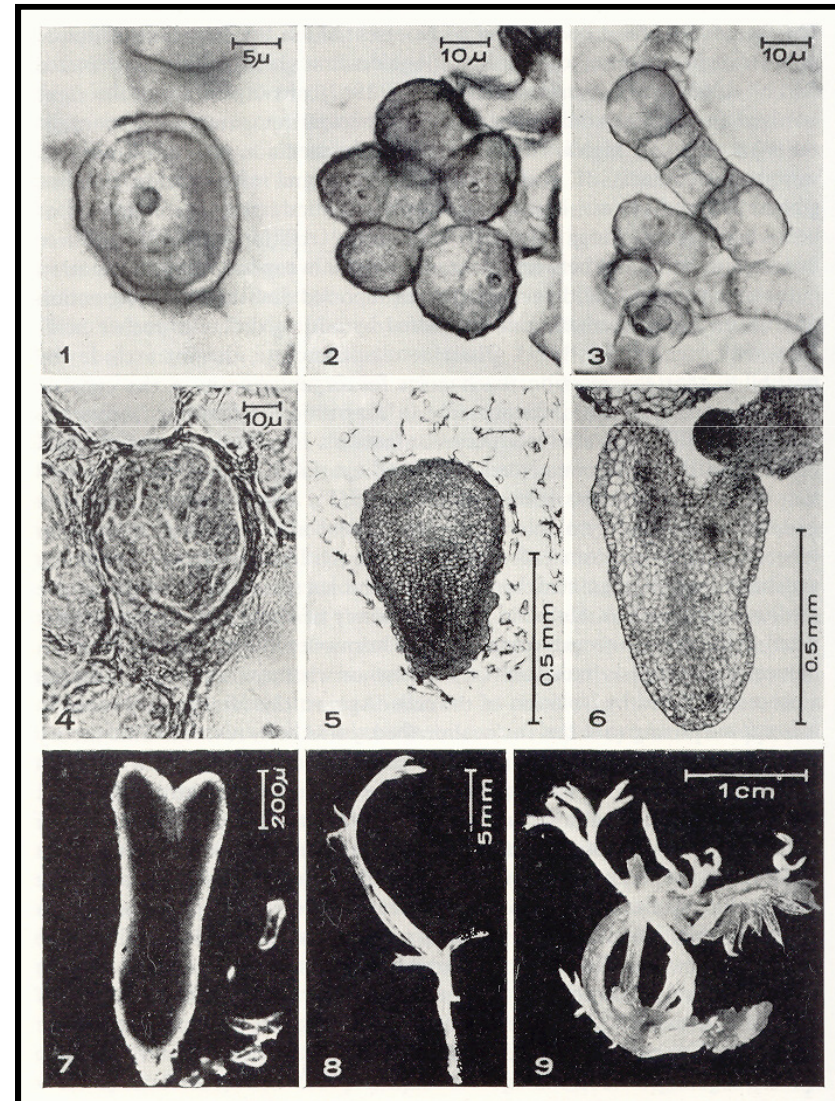
Organogénesis adventicia



Embriogénesis cigótica



Embriogénesis somática



Micropropagación

Multiplicación a gran escala del material vegetal mediante técnicas de cultivo in vitro. **Lo esencial es conseguir una elevada tasa de regeneración** y por tanto se admite un cierto grado de variación (aunque no muy elevado)



Micropropagación de *Lilium* mediante formación de bulbos adventicios

Semilla artificial

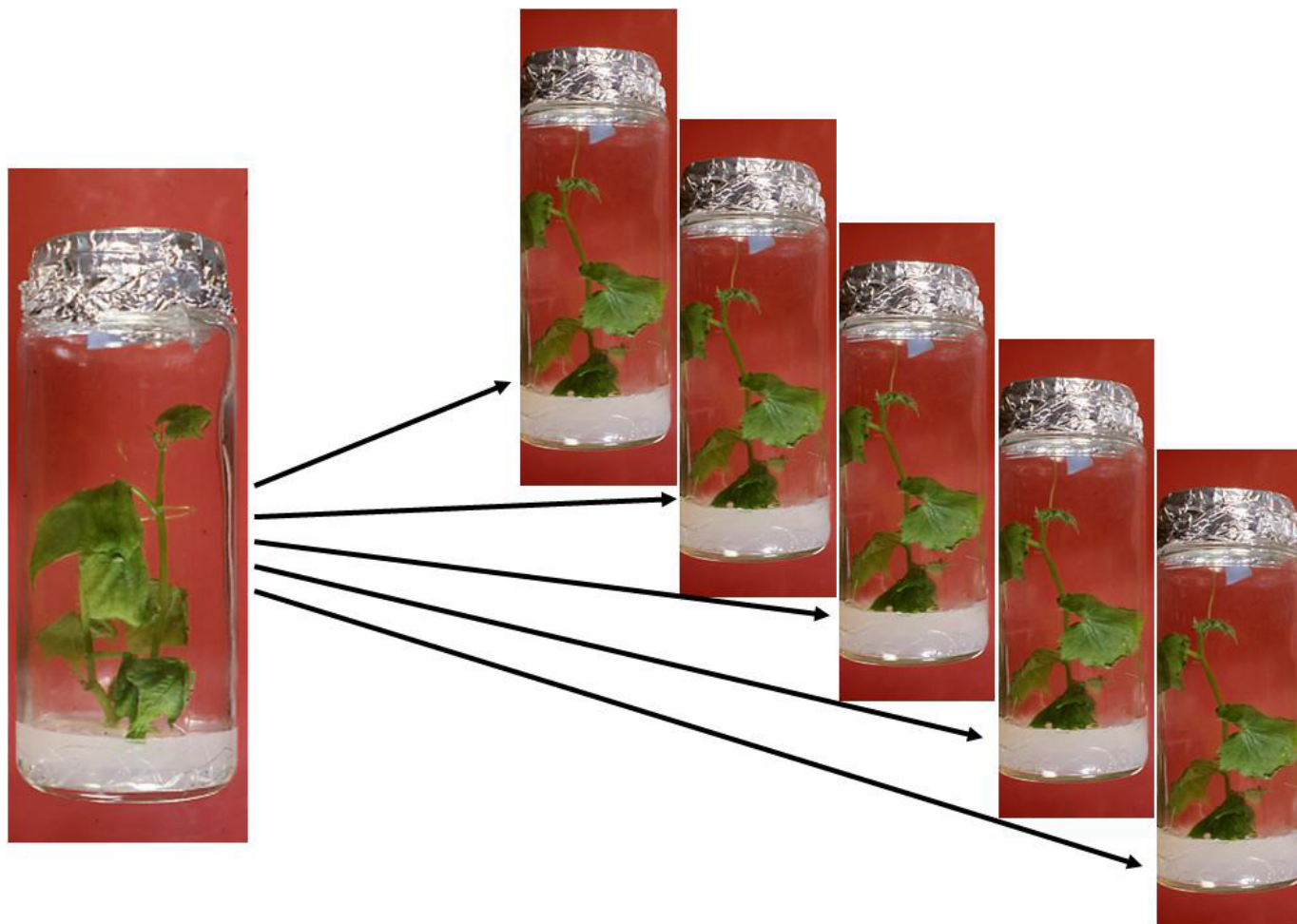


Embrión somático
de zanahoria en
alginato sódico



Germinación de una
semilla artificial de
Larix decidua

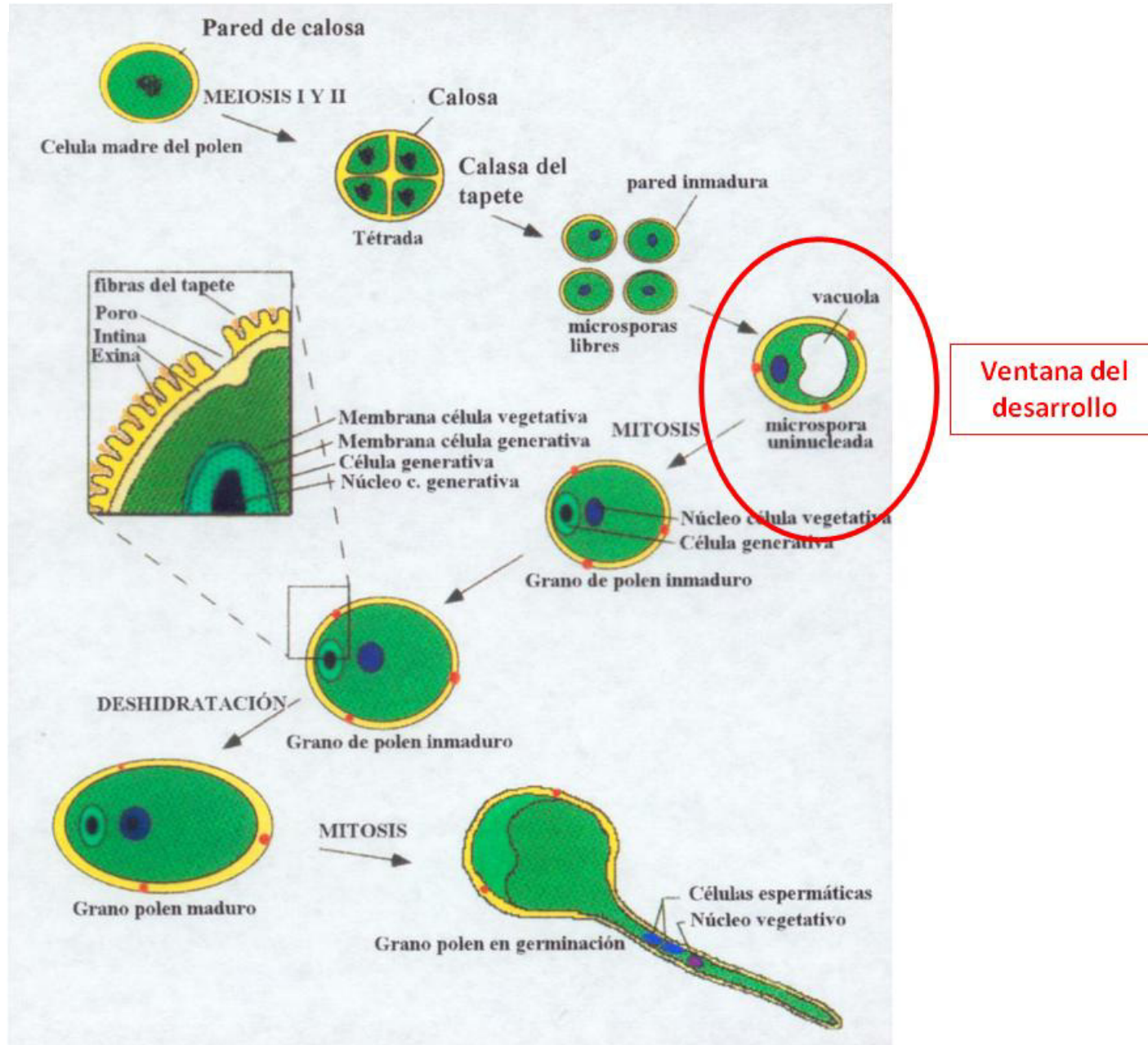
Propagación clonal: requiere métodos de regeneración que garanticen la estabilidad genética



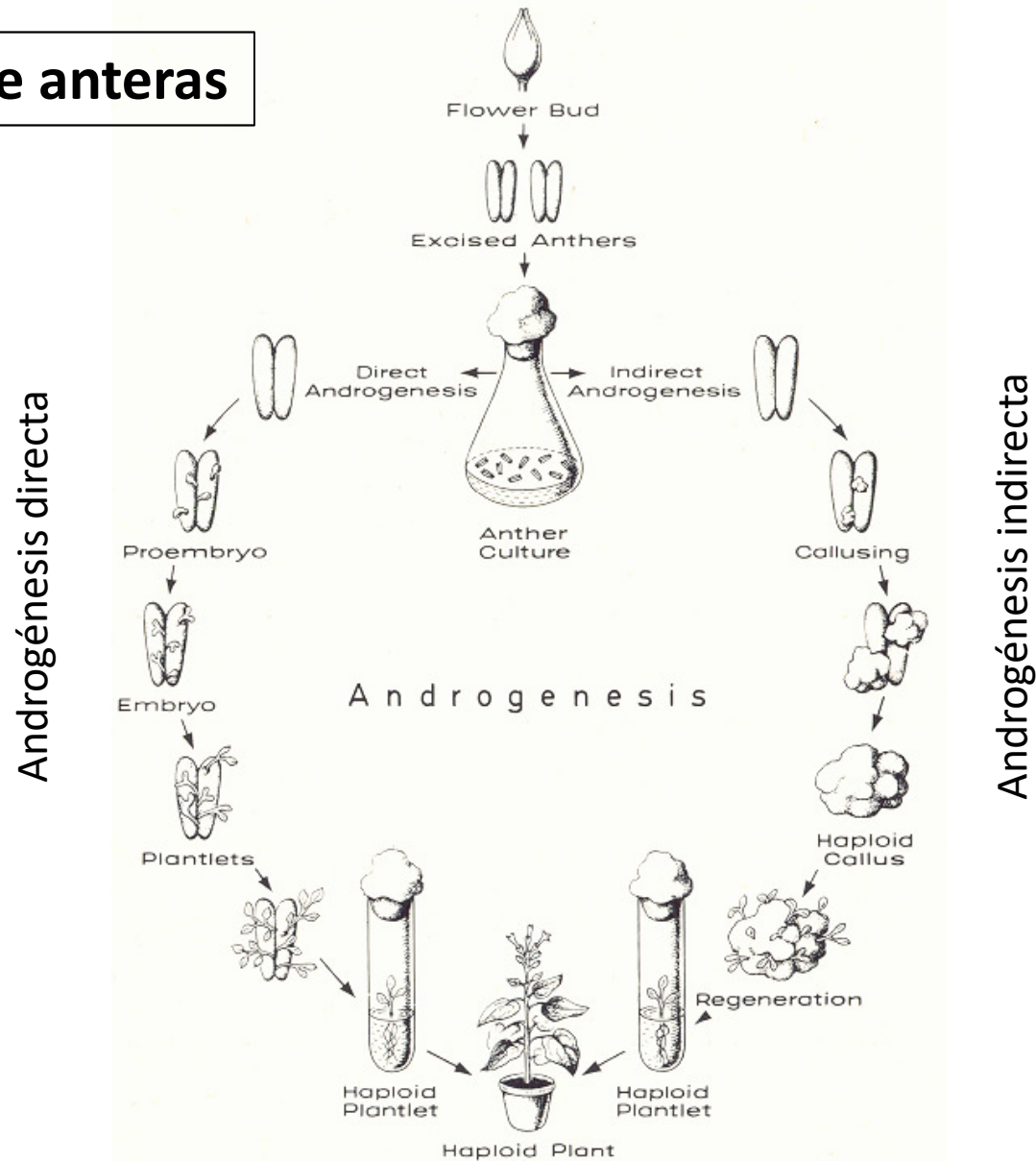
Métodos para la obtención de haploides

- **Androgénesis**
 - Cultivo de anteras
 - Cultivo de microsporas aisladas
- **Ginogénesis**
 - Cultivo de ovarios
 - Cultivo de óvulos aislados
- **Rescate de embriones haploides**
 - Polinización con polen inactivo (*ginogénesis in situ*)
 - Cruzamiento interespecífico

Microesporogénesis y microgametogénesis in vivo

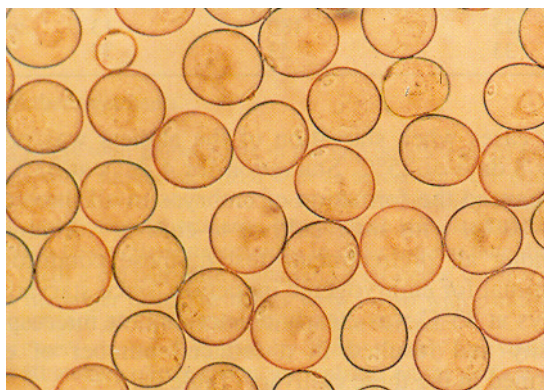


Cultivo de anteras

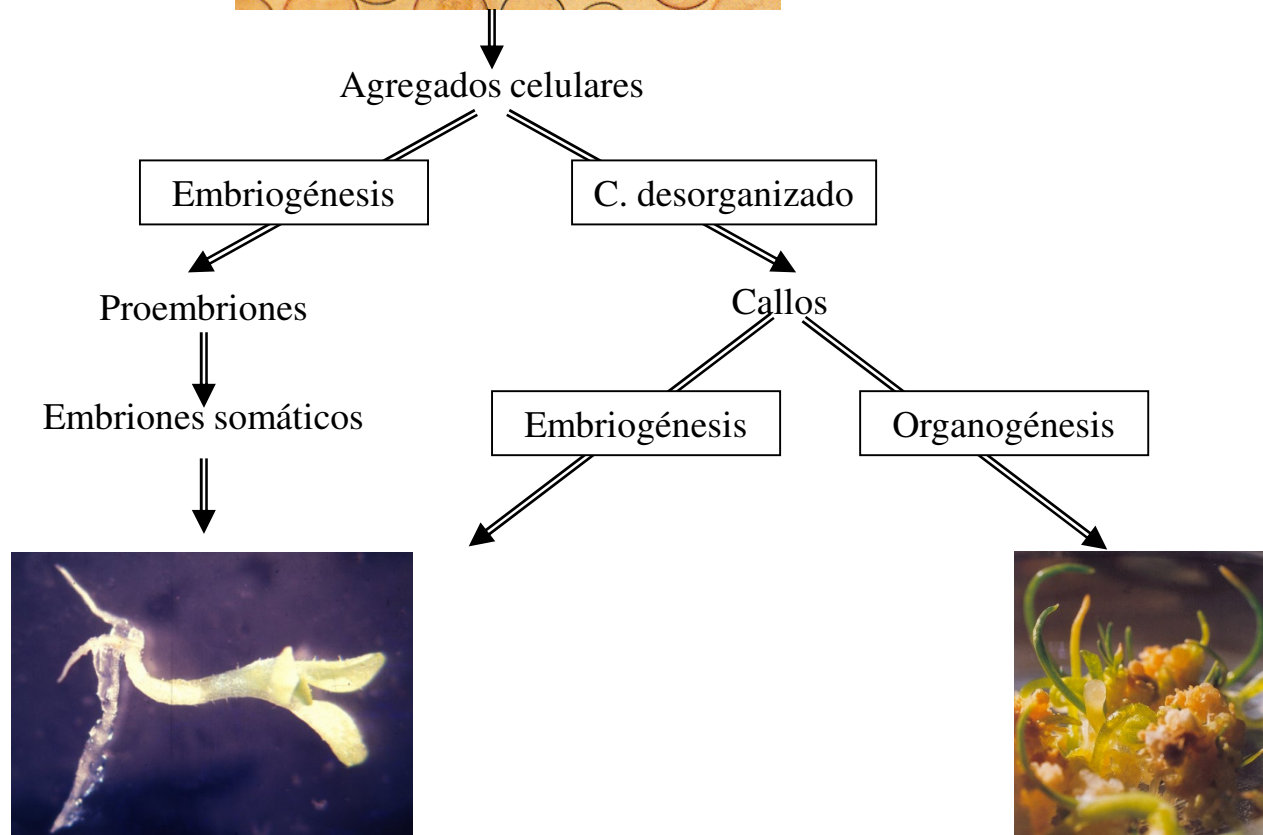




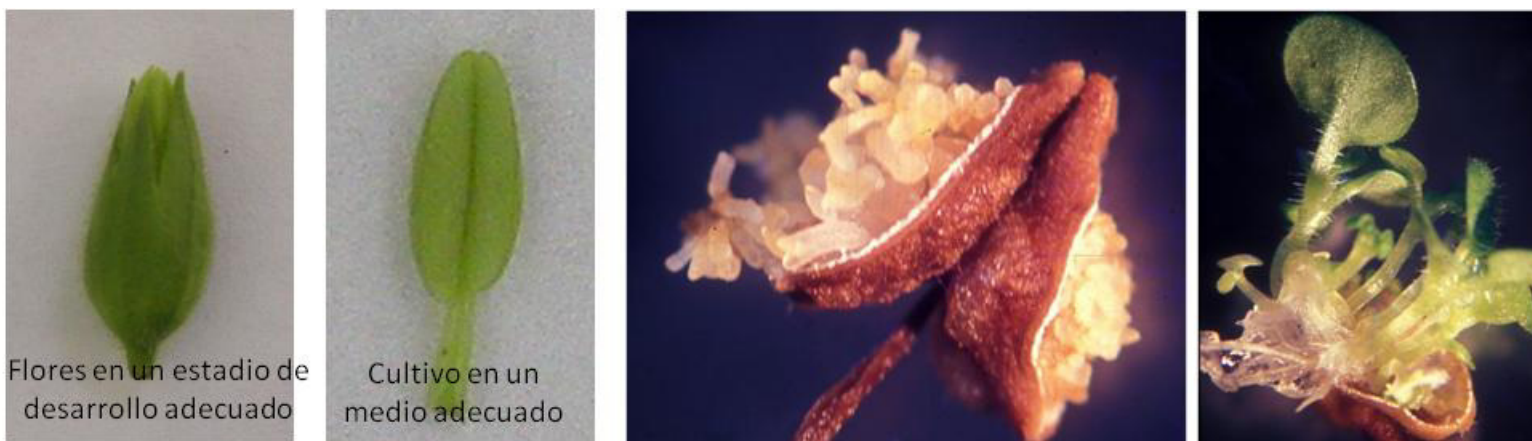
Aislamiento de
microsporas



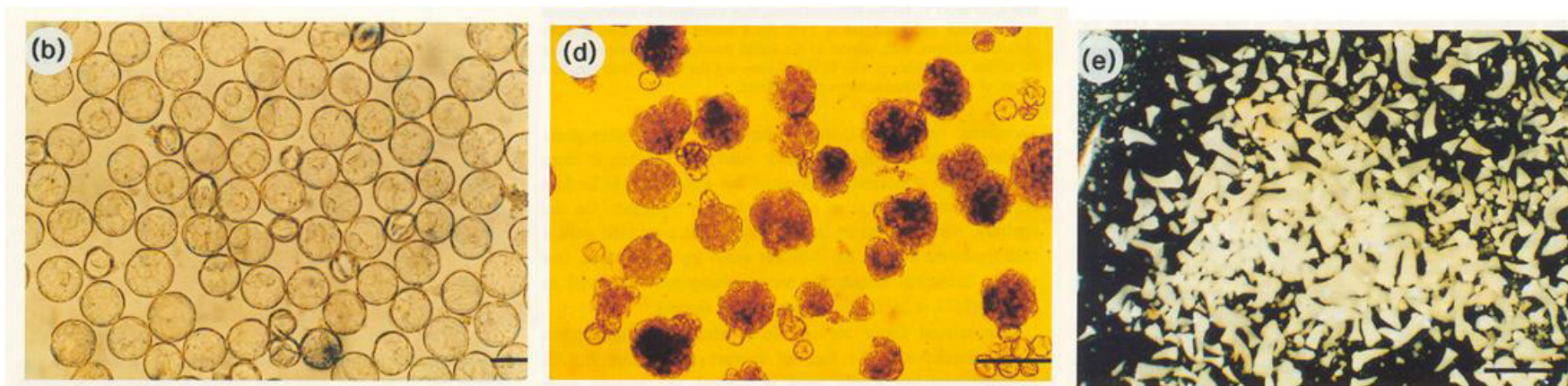
Cultivo de microsporas



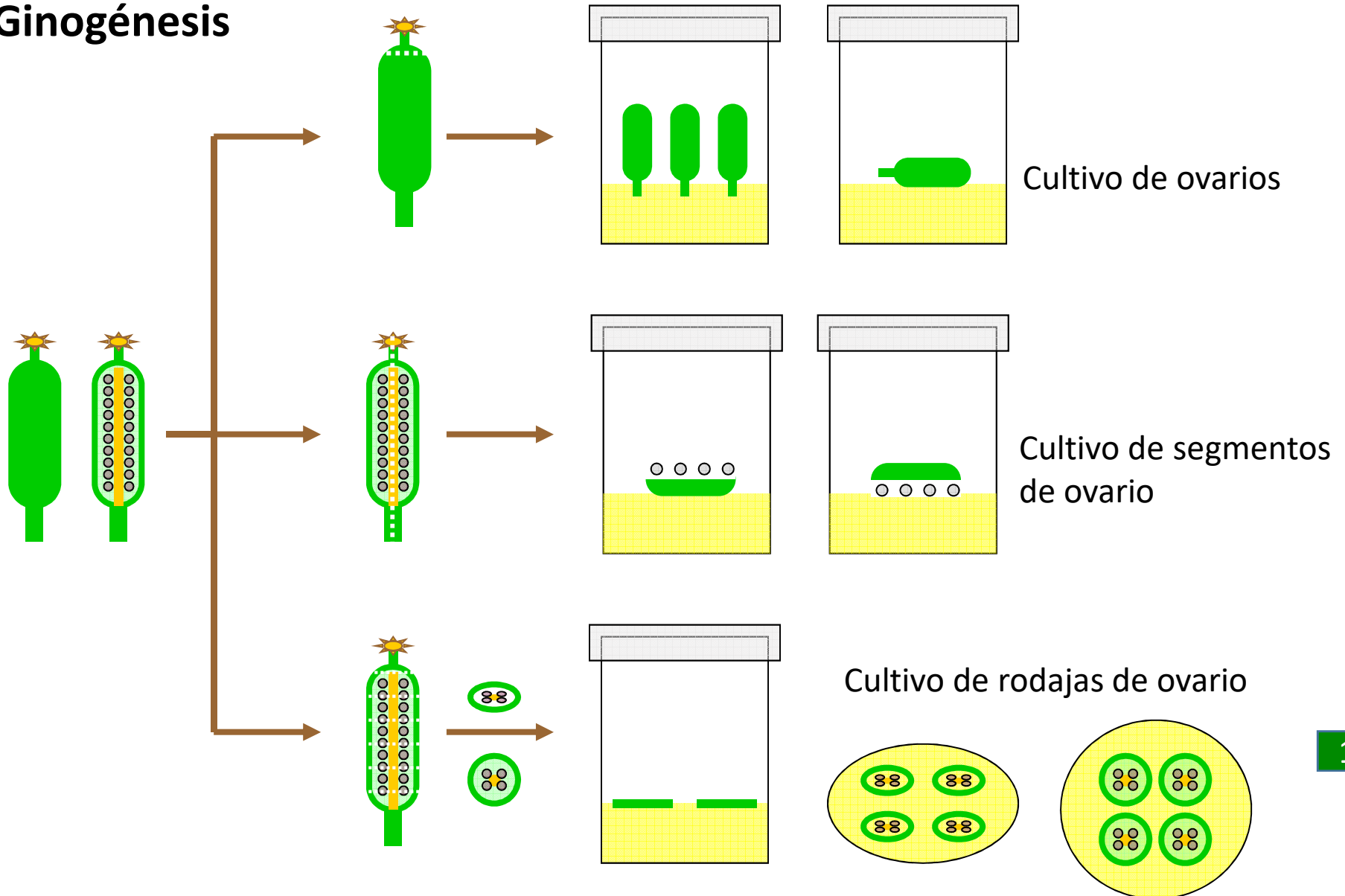
Cultivo de anteras y obtención de haploides de tabaco

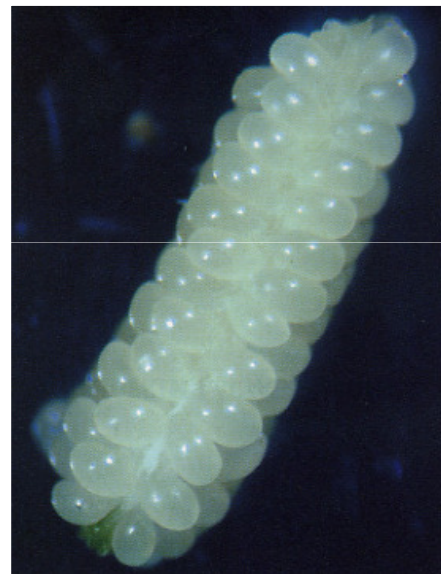
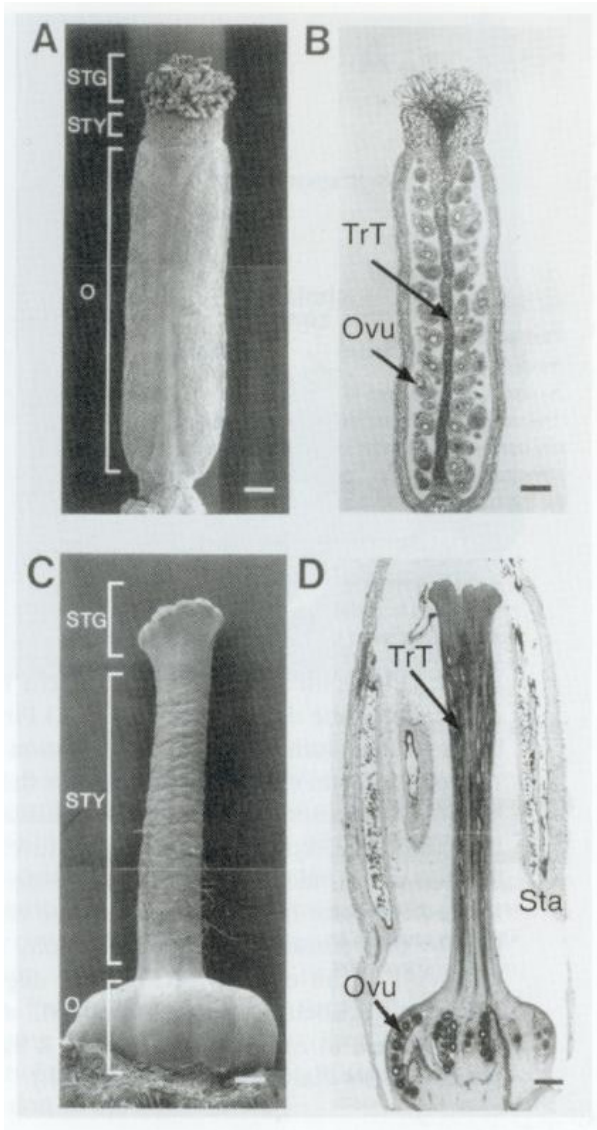


Embriogénesis somática en cultivo de microsporas de tabaco



Ginogénesis

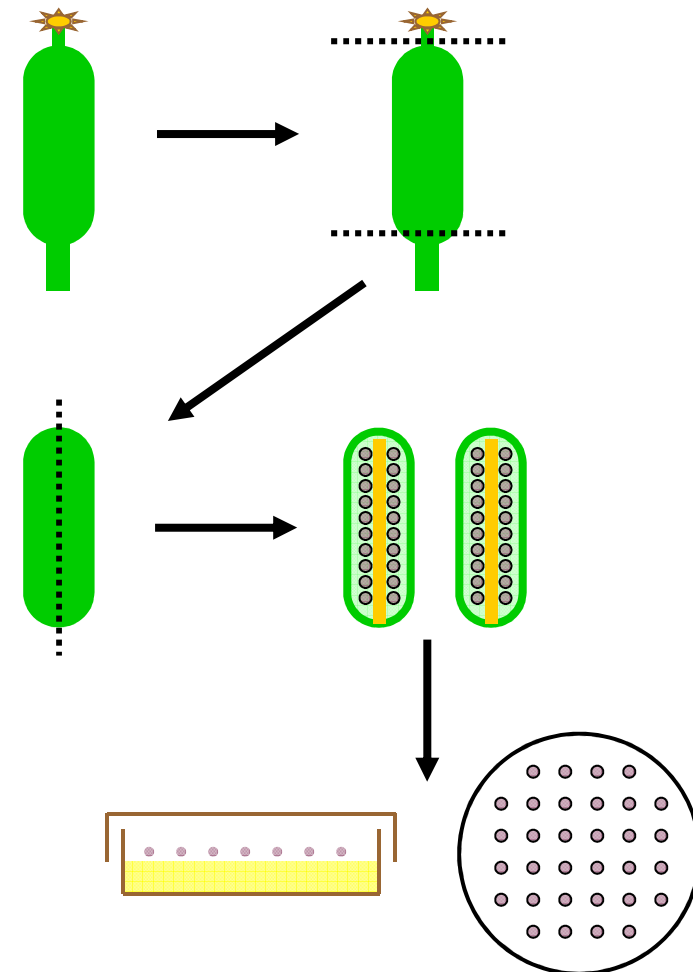




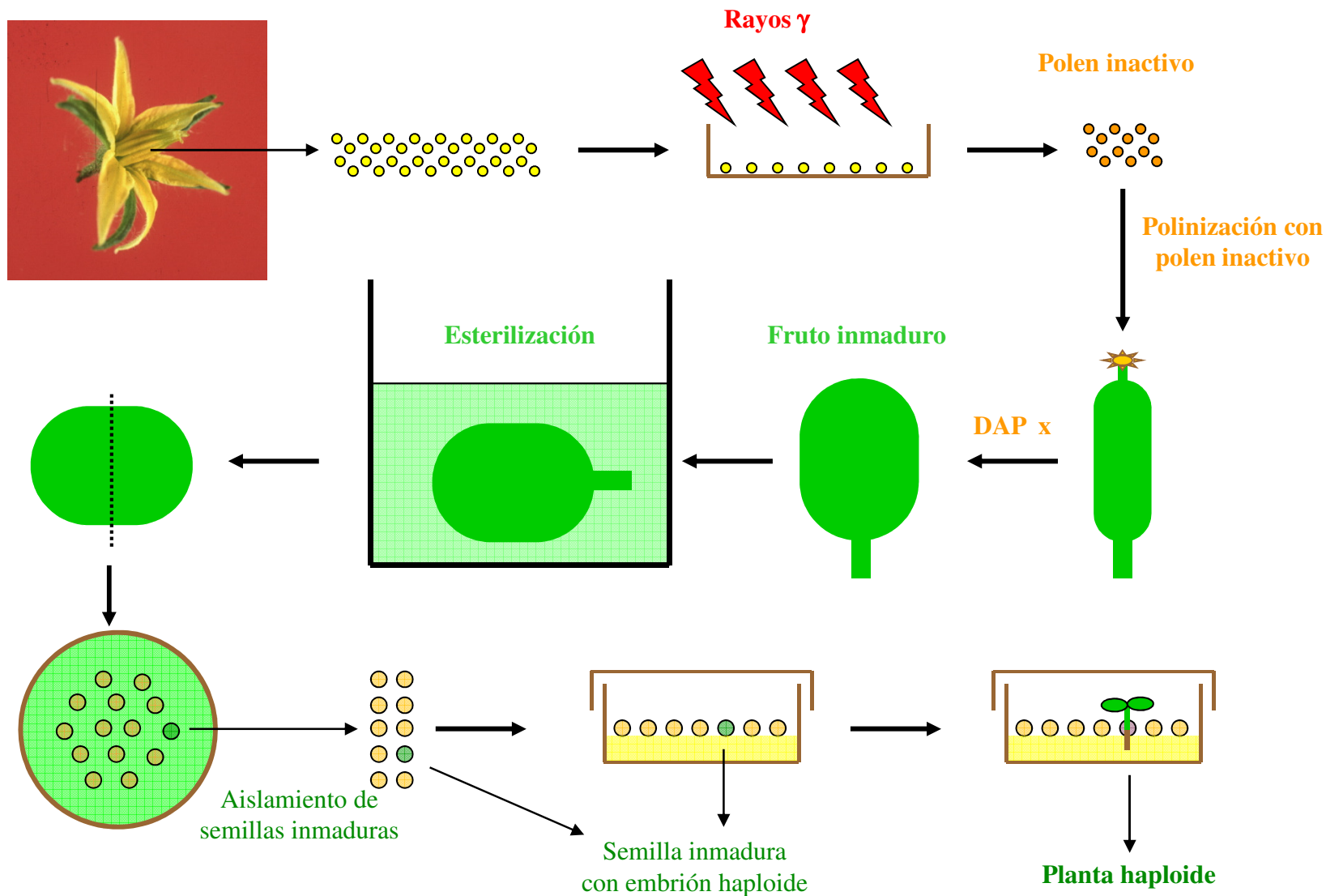
Placenta con óvulos de *Dianthus trifasciculatus*

Ginogénesis

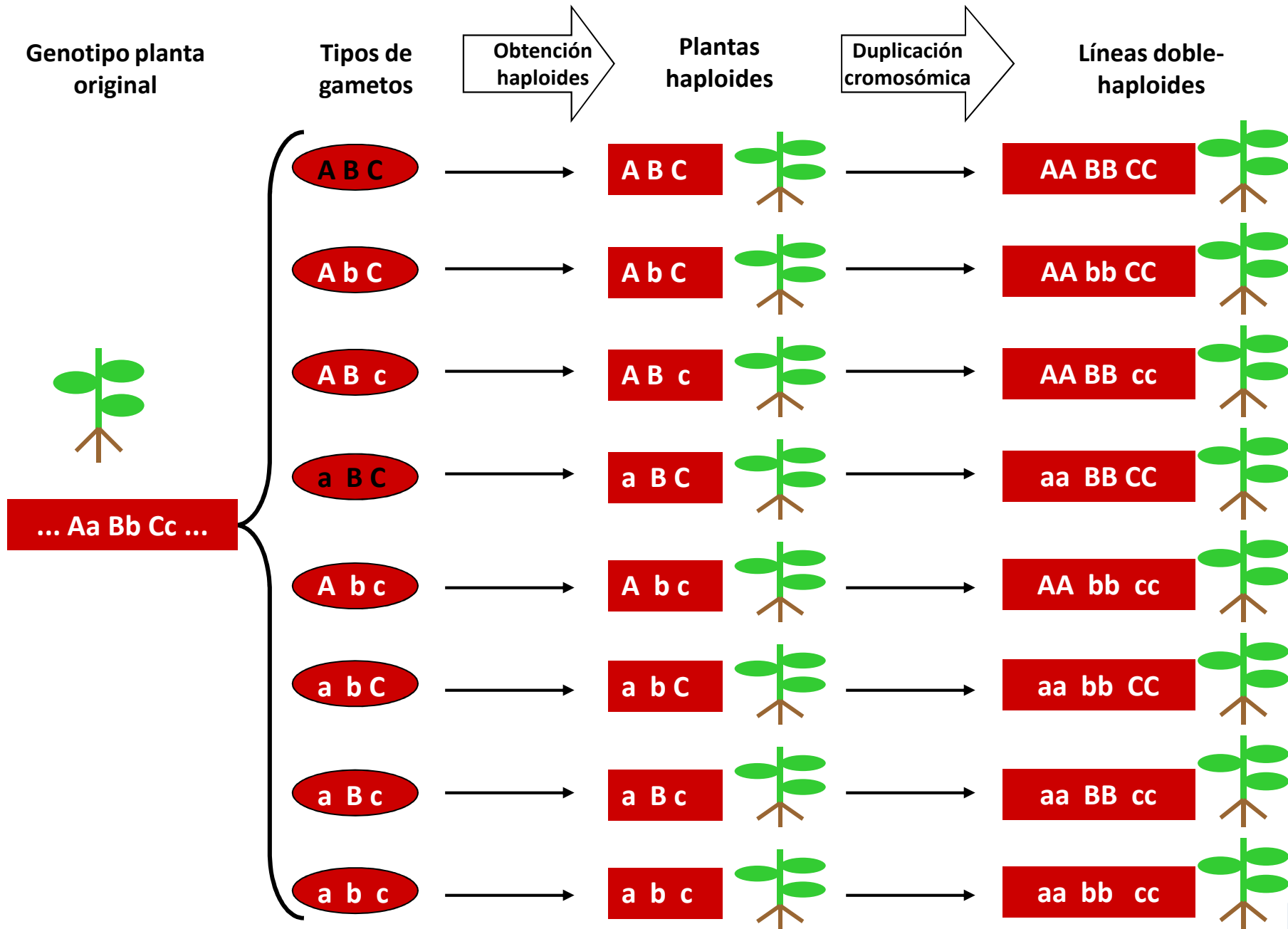
Aislamiento y cultivo de óvulos



Obtención de haploides mediante ginogénesis *in situ* (polinización con polen inactivo)



Fundamento del método haplo-diploide



Tiempo requerido para la generación de líneas homocigóticas

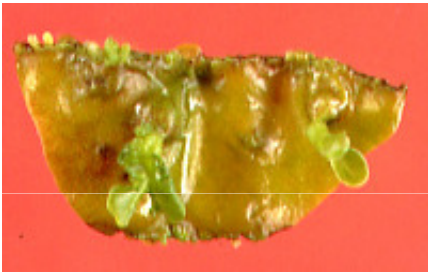
- Métodos clásicos: 4 – 6 años
- Método doble-haploide: < 1 año

Aplicaciones de los doble-haploides

- Líneas puras (autógamas): selección de nuevos cultivares
- Líneas puras (autógamas y alógamas) para la obtención híbridos F1 (explotación de la heterosis)
- Variedades sintéticas
- Mejora inversa
- Doble-haploides recombinantes (R-DHs)
- Líneas recombinantes puras (RILs-DHs)
- Identificación de marcadores → selección asistida

Tipos de morfogénesis y consecuencias genéticas

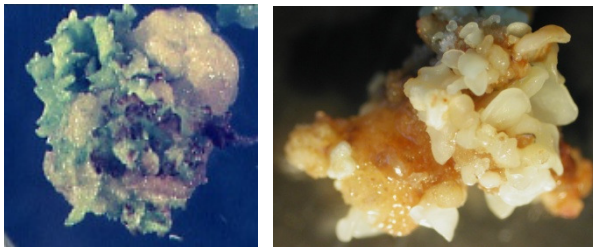
Morfogénesis directa



Estabilidad genética



Morfogénesis indirecta



Variación somaclonal



VARIACIÓN SOMACLONAL Y CHOQUE GENÓMICO IN VITRO

THE SIGNIFICANCE OF RESPONSES OF THE GENOME TO CHALLENGE.

Nobel Lecture, 8 December, 1983, by Barbara McClintock



“It may be safe to state that no two of the callus derived plants are exactly alike, and none is just like the plant that donated the cell or cells for the tissue culture.

The many levels of genomic modification that already are known and expressed as changed genotypes and phenotypes could be potent sources for selection by the plant breeder, and incidentally, for theoretical ponderings by the biologist”.

Concepto de variación somaclonal

En sentido estricto:

Variación **genética** (y por tanto heredable) que aparece en las células y en las plantas regeneradas como consecuencia del cultivo *in vitro*

En sentido amplio:

Variación **genética y epigenética** semipermanente que aparece en las células y en las plantas regeneradas como consecuencia del cultivo *in vitro*

Causas de la variación somaclonal

VARIACIÓN PRE-EXISTENTE EN EL MATERIAL DE PARTIDA

- **Mixoploidía en los explantes iniciales**
- **Mutaciones somáticas en las células de los explantes**

VARIACIÓN INDUCIDA IN VITRO (CHOQUE GENÓMICO POR ESTRÉS)

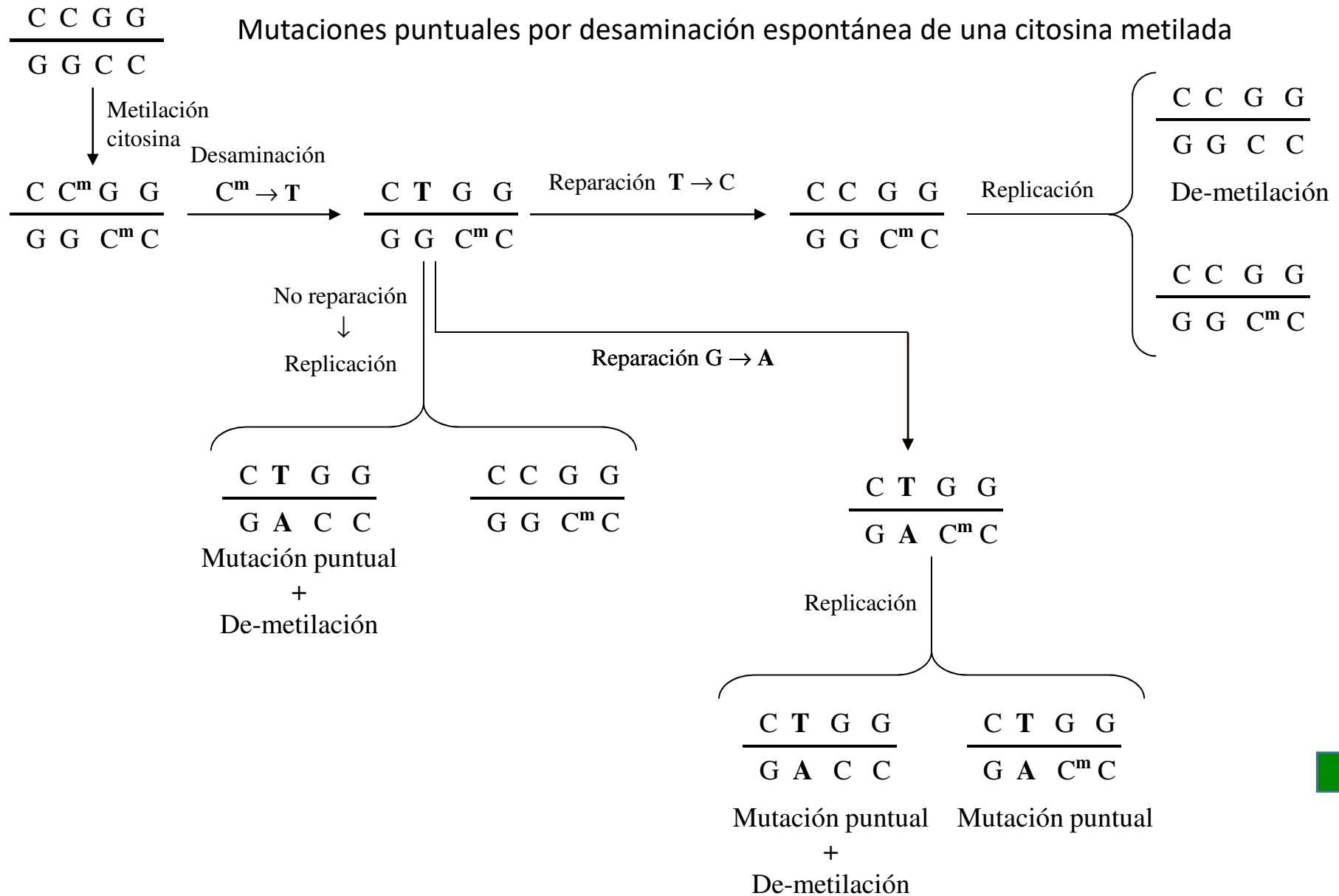
CAMBIOS GENÉTICOS (más frecuentes)

- **Cambios numéricos** (poliploidía y aneuploidía) o **estructurales** (deleciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones) debidos a irregularidades en la mitosis
- **Mutaciones puntuales:**
 - Con un origen similar a las que aparecen in vivo
 - Desaminación espontánea de citosinas metilada
- **Elementos genéticos móviles** (transposones y retrotransposones)
 - Silenciamiento por interrupción de genes activos
 - Alteración de expresión en genes endógenos
 - Activación de pseudogenes (variación genética críptica)
 - Cambios estructurales: deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones

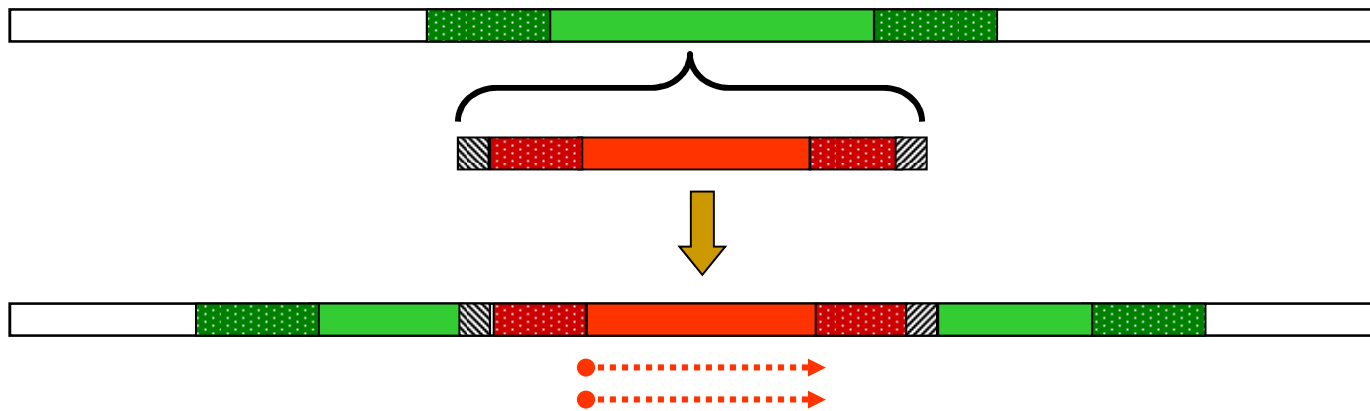
CAMBIOS EPIGENÉTICOS (permanentes o semipermanentes)

- Paramutación y otros cambios epigenéticos de tipo permanente o semipermanente

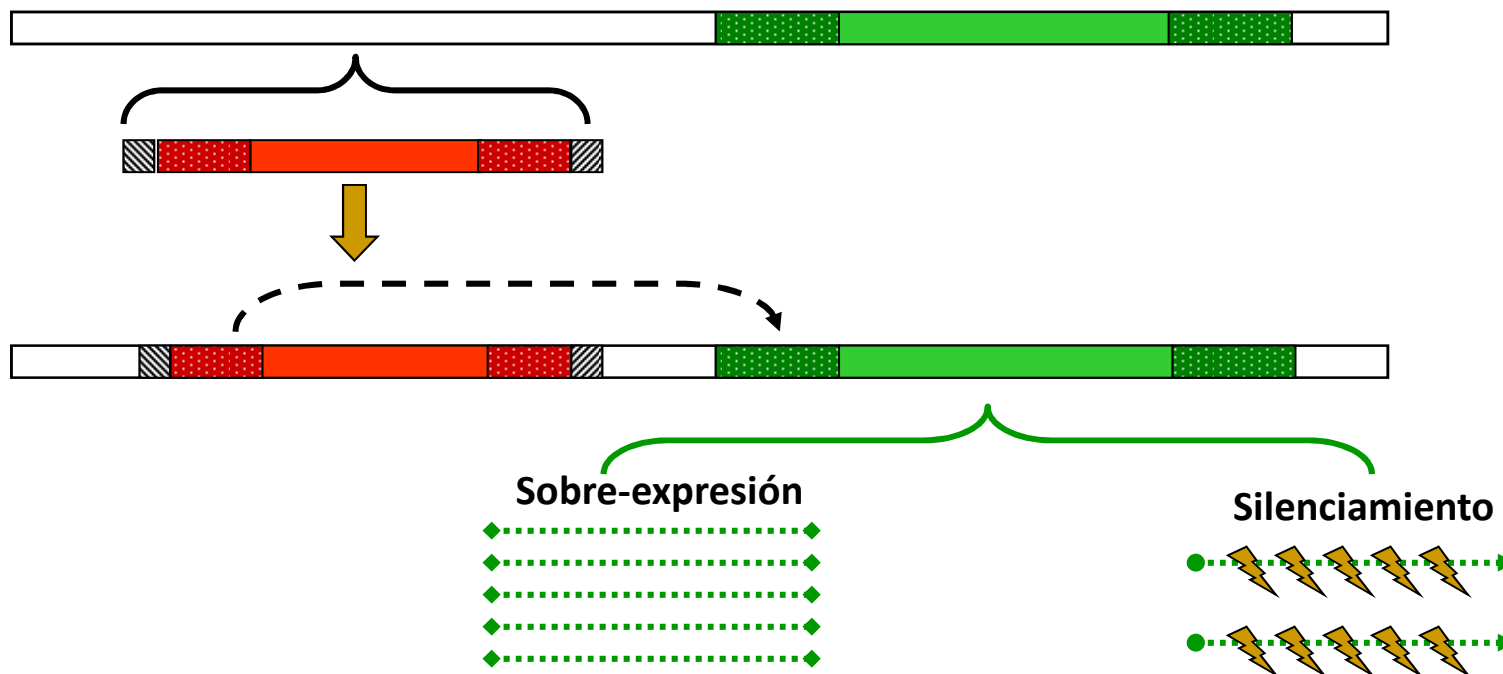
Cultivo in vitro y Mejora Vegetal



Disrupción de un gen endógeno \Rightarrow Inactivación del gen



Integración en la vecindad de un gen \Rightarrow Alteración nivel de expresión

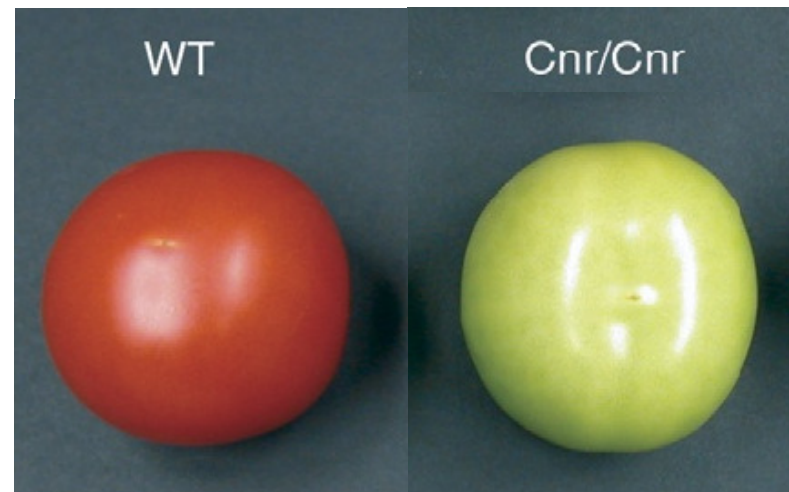


Manning et al. 2006. Nature Genetics. 38 (8) 948 – 952

A naturally occurring **epigenetic mutation** in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening

Kenneth Manning¹, Mahmut Tör¹, Mervin Poole², Yiguo Hong¹, Andrew J Thompson¹, Graham J King³, James J Giovannoni⁴ & Graham B Seymour²

A major component in the regulatory network controlling fruit ripening is likely to be the gene at the tomato Colorless non-ripening (*Cnr*) locus^{1,2}. The *Cnr* mutation results in colorless fruits with a substantial loss of cell-to-cell adhesion. The nature of the mutation and the identity of the *Cnr* gene were previously unknown. Using positional cloning and virus-induced gene silencing, here we demonstrate that an SBP-box (SQUAMOSA promoter binding protein-like) gene resides at the *Cnr* locus. Furthermore, the *Cnr* phenotype results from a spontaneous epigenetic change in the SBP-box promoter. The discovery that *Cnr* is an epimutation was unexpected, as very few spontaneous epimutations have been described in plants^{3,4}. This study demonstrates that an SBP-box gene is critical for normal ripening and highlights the likely importance of epialleles in plant development and the generation of natural variation.



Mecanismos de aislamiento reproductivo

Barreras pre-cigóticas

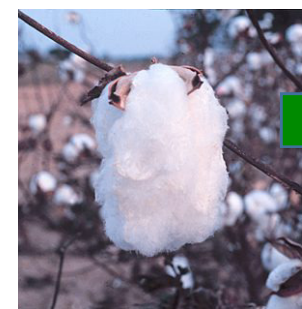
- Aislamiento de tipo físico
- Aislamiento por causa del desarrollo (e.g. morfología floral)
- Mecanismos que previenen la fertilización

Barreras post-cigóticas

- Inviabilidad del híbrido interespecífico (embrión o planta)
 - Incompatibilidad núcleo – núcleo
 - Incompatibilidad núcleo – citoplasma
 - Incompatibilidad embrión – endospermo
- Desarrollo anómalo de los híbridos
- Esterilidad de los híbridos
- Colapso de la F₂ o generaciones posteriores

Algunas plantas comestibles de origen alopoloide

Especie	Nº básico (x)	Nº cromosomas (2n)
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	7	28 , 42
Avena (<i>Avena sativa</i>)	7	42
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	12	48
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>)	13	52
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	10	80
Fresa (<i>Fragaria grandiflora</i> <i>Fragaria x annanassa</i>)	7	56
Ciruelo (<i>Prunus domestica</i>)	8	16 , 24 , 32 , 48
Manzano (<i>Malus sylvestris</i>)	17	34 , 51
Peral (<i>Pyrus communis</i>)	17	34 , 51



Técnicas de cultivo in vitro para el aprovechamiento de los recursos fitogenéticos

Superación de barreras de incongruencia o incompatibilidad sexual

Polinización in vivo y cultivo in vitro de óvulos fertilizados

Polinización y fertilización in vitro
Polen 'nodriza'

Injerto de estilo o estigma in vitro

Rescate de embriones

Métodos basados en la fusión de protoplastos

Hibridación somática
Manipulación genómica

Hibridación gametosomática
Manip. subgenómica

Hibridación asimétrica
Manip. cromosómica, subcromosómica y génica

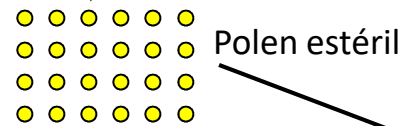
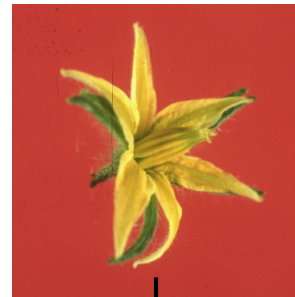
Cibridación
Aloplasmia, heteroplasmia y recombinación

Híbridos sexuales mediante fusión inducida

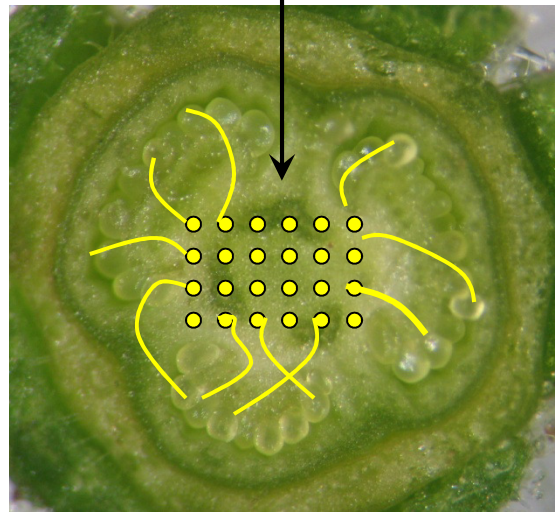
Fusión de gametos

Transferencia de núcleos

Polinización y fertilización *in vitro*



Polinización
en estigma

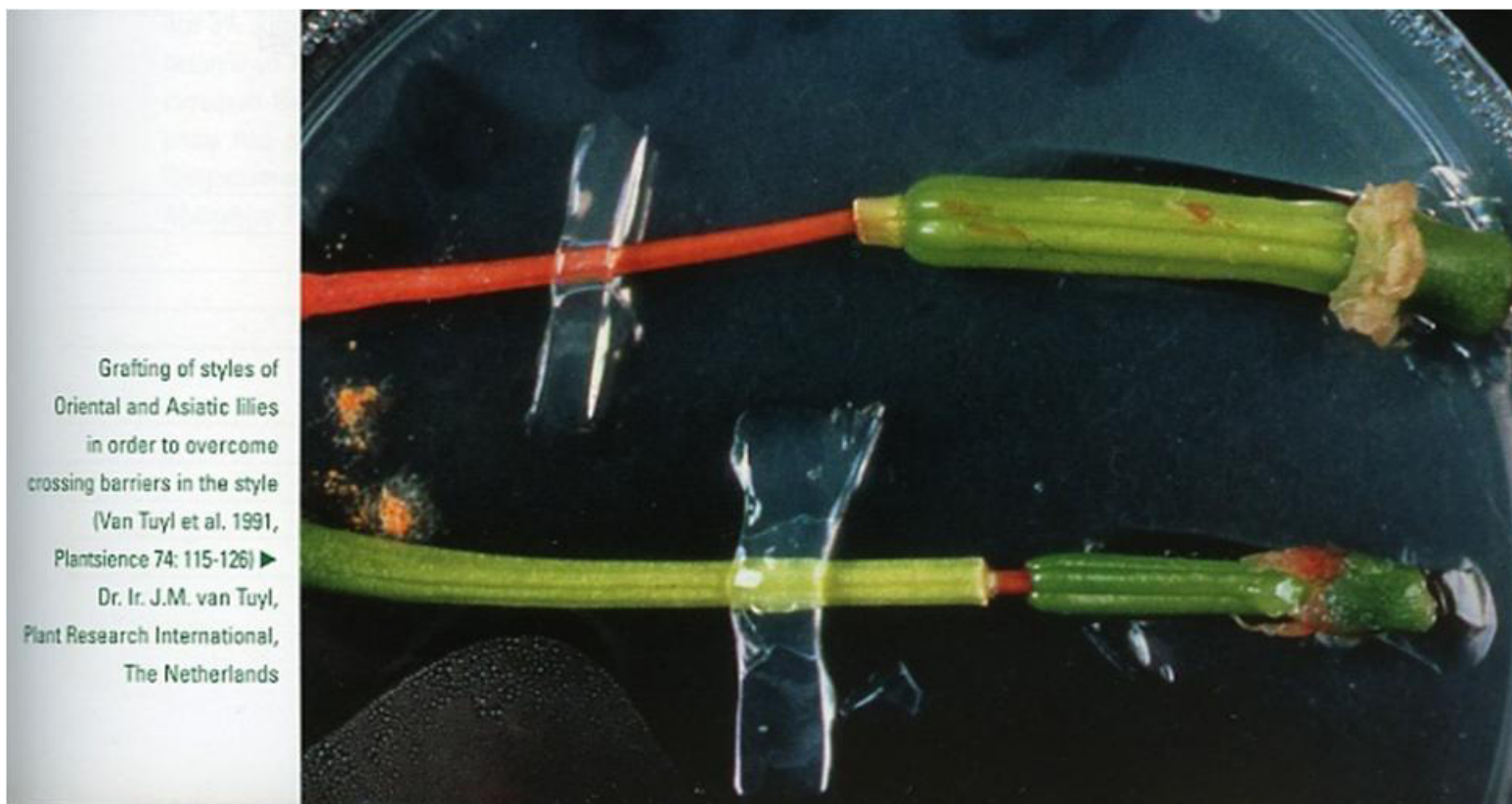


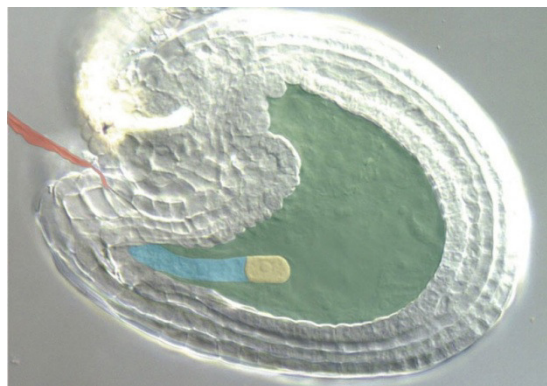
Polinización
en placenta



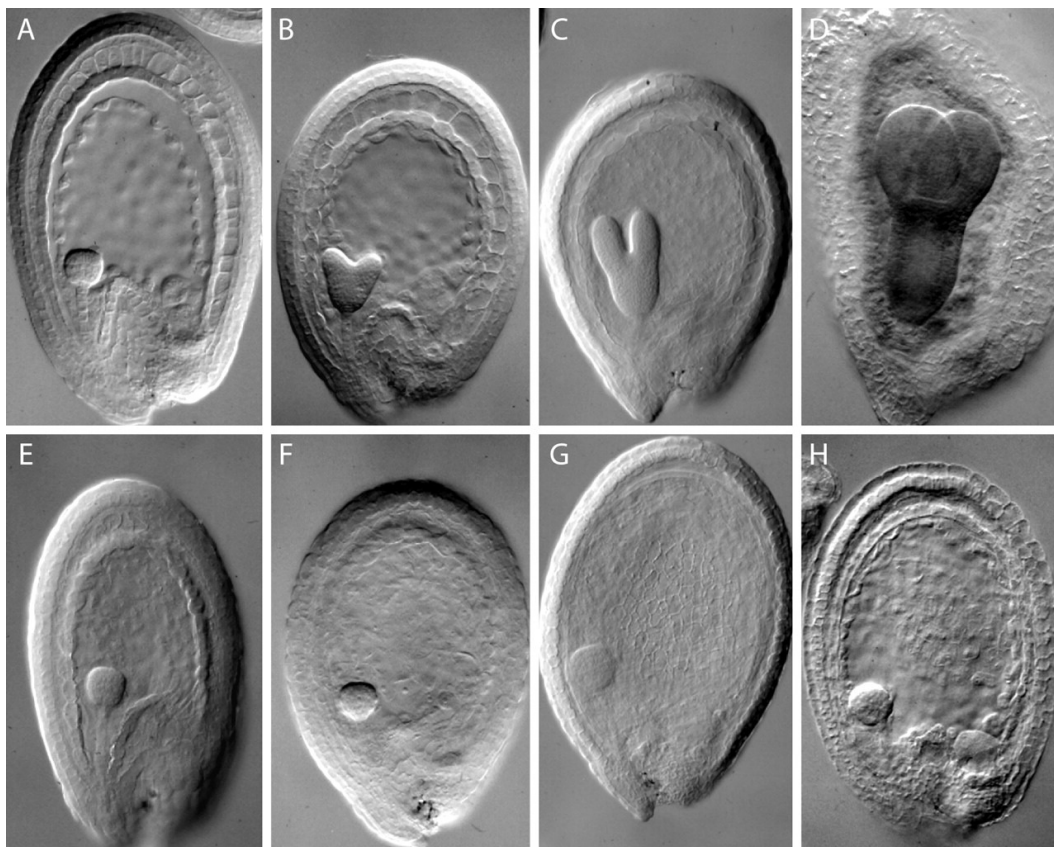
Polinización
en estilo

Injerto de estilo o estigma *in vitro*





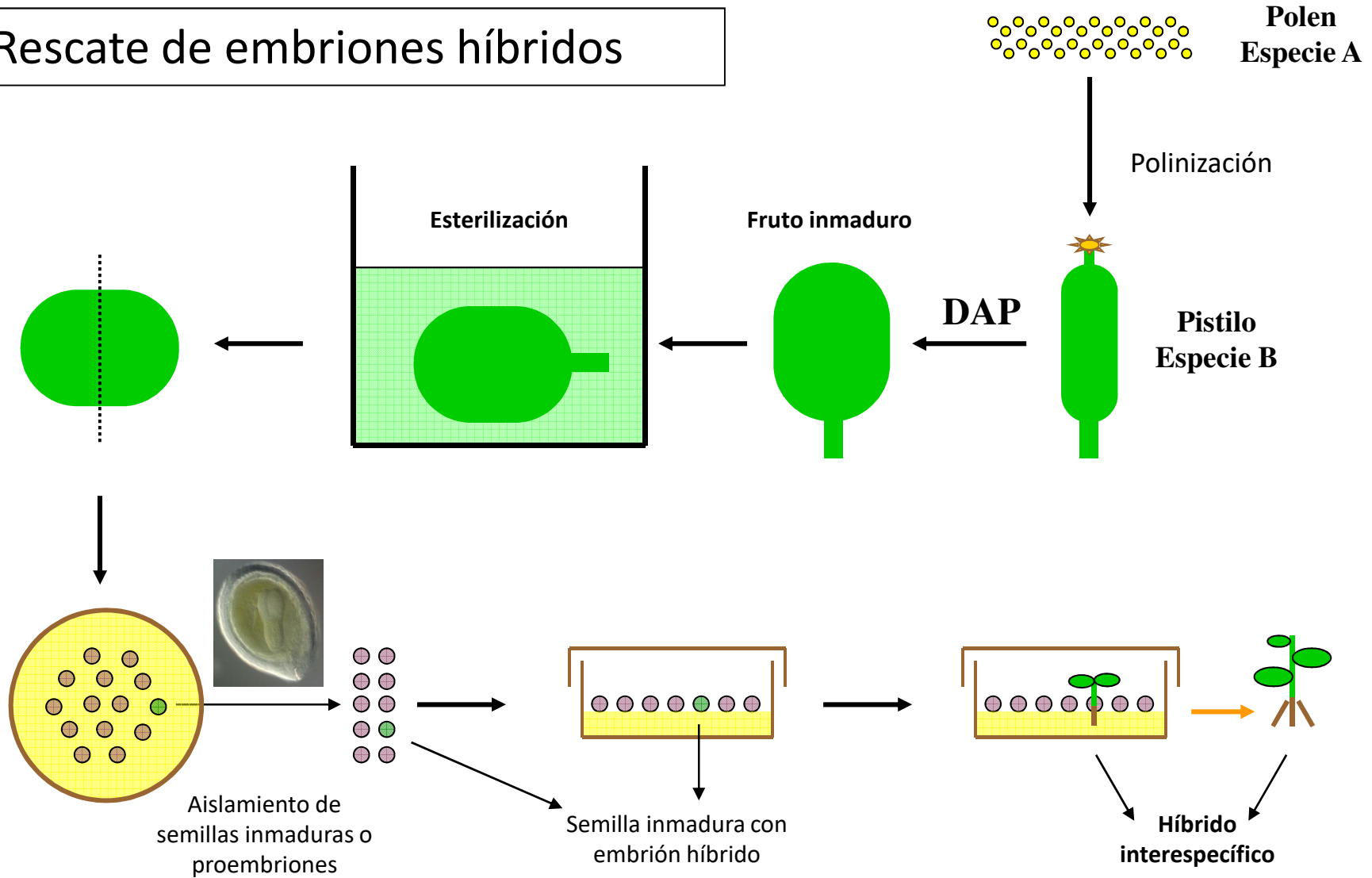
In general the first division of the zygote is delayed to favour the first division cycles of the endosperm cells. When the equilibrium in the development of the zygote and endosperm is disturbed an abortion of the young embryo or disintegration of endosperm follows. This abortion can take place in various stages of development of the young seed. Depending on the stage of embryo abortion various *in vitro* techniques can be applied to rescue the abortive embryo.



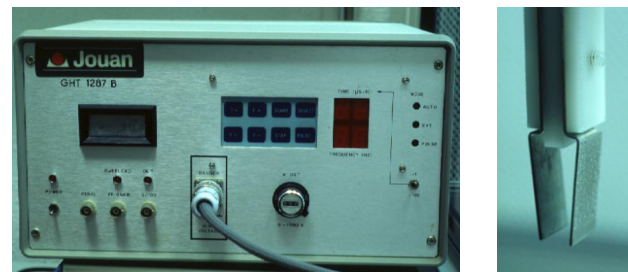
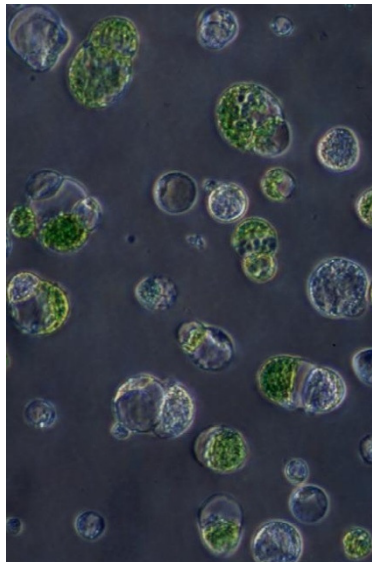
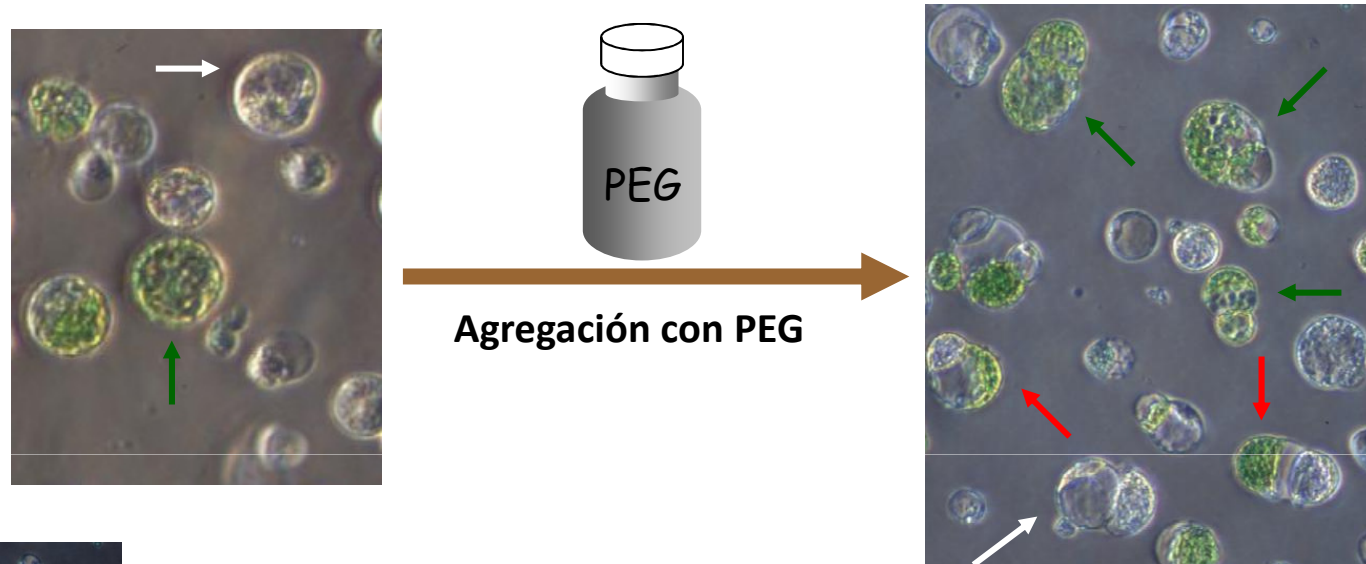
Normal embryo development

Arrest of embryo development

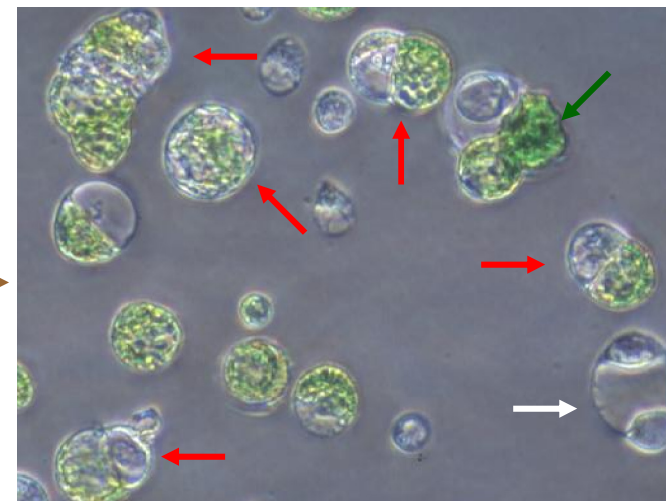
Rescate de embriones híbridos



Quimio-electro fusión



Inducción de fusión mediante
pulsos de corriente continua



Hibridación 'simétrica'

- Obtención de puentes genéticos
- Re-síntesis de aloploides naturales
- Síntesis de nuevas especies aloploides

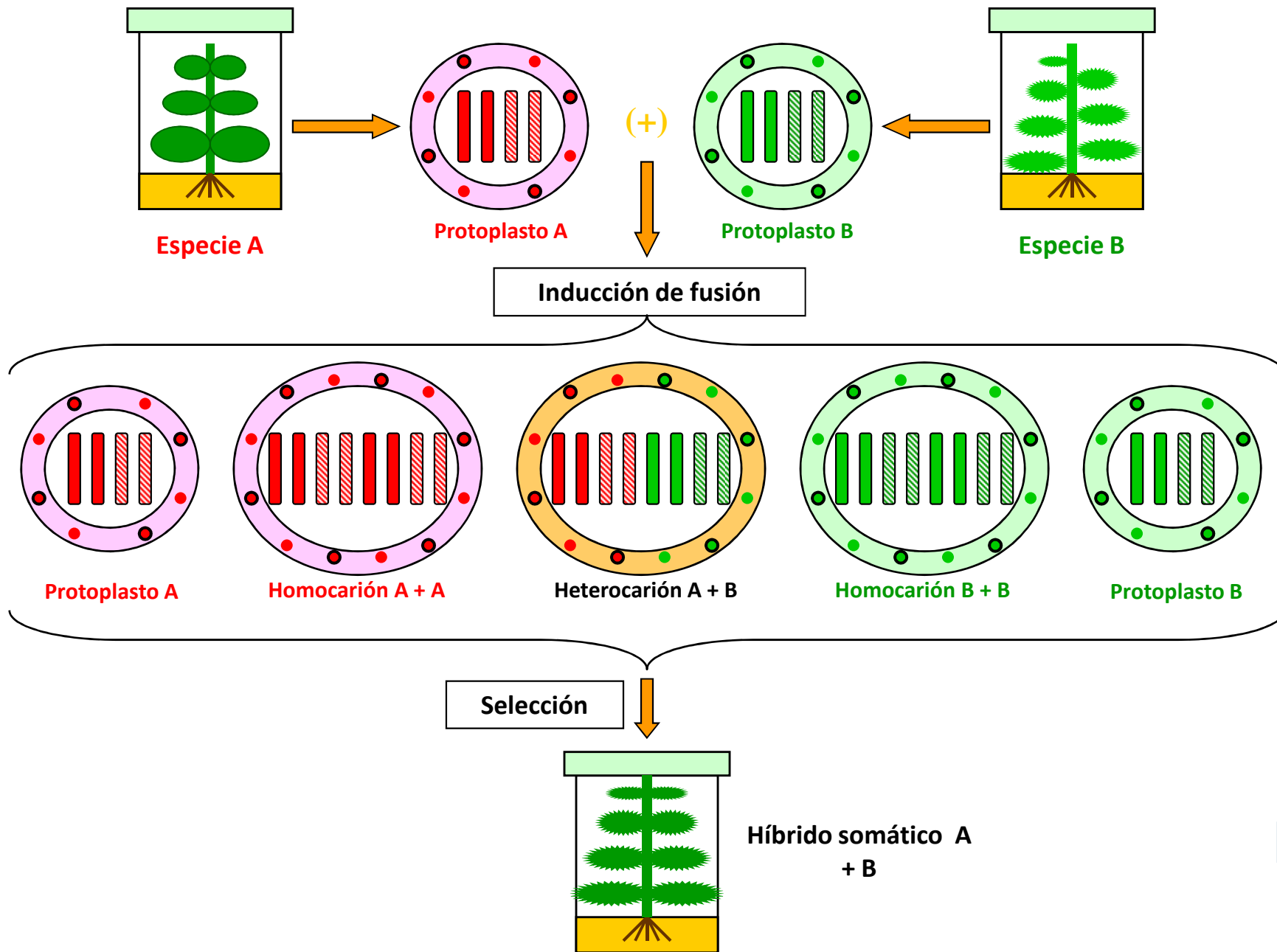
Hibridación gametosomática

Hibridación asimétrica (método 'donante-receptor')

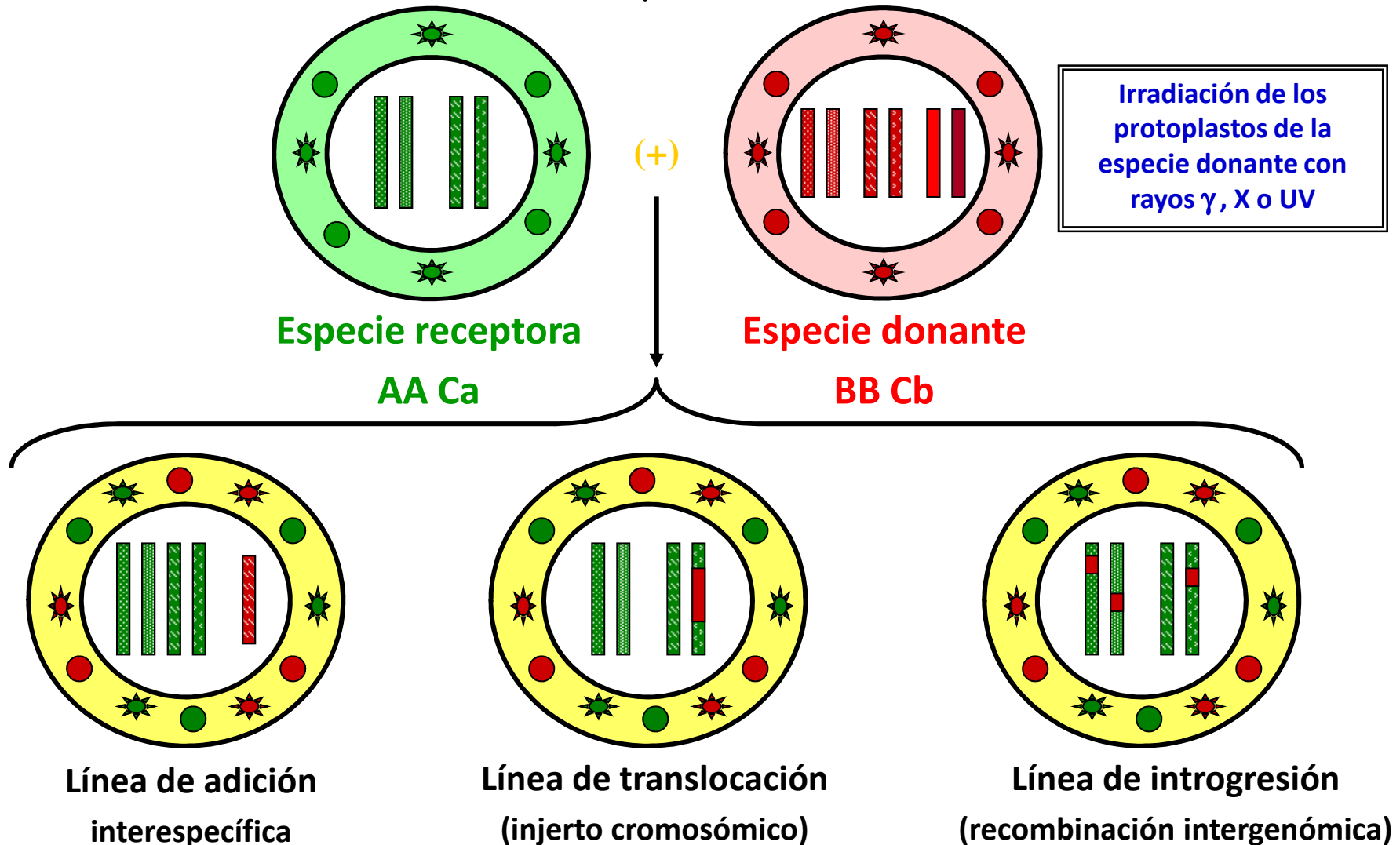
Cibridación

- Cíbridos estrictos (líneas aloplásmicas)
- Cíbridos heteroplásmicos
- Cíbridos recombinantes (mitocondrias y/o cloroplastos)

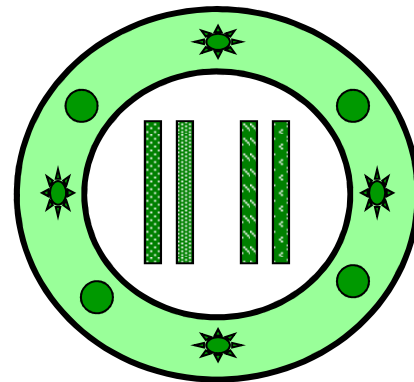
Hibridación Somática 'Simétrica'



Hibridación asimétrica (γ - fusión, X-fusión, UV-fusión)

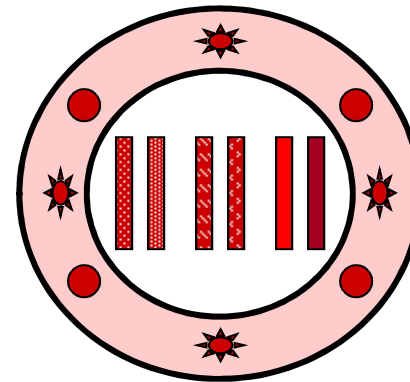


Cibridación



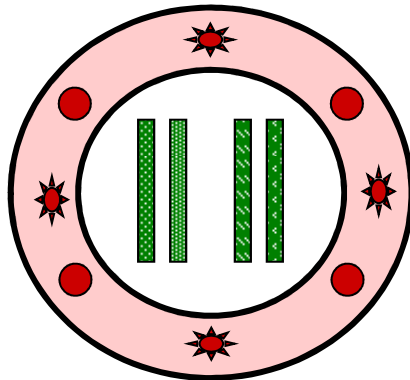
Especie A
AA Ca

(+)

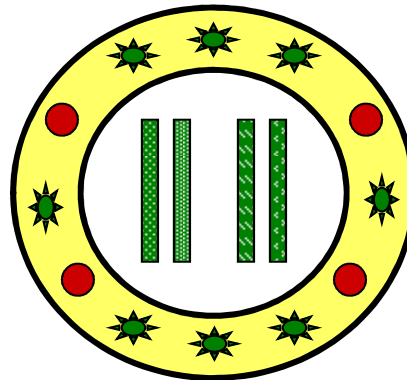


Especie B
BB Cb

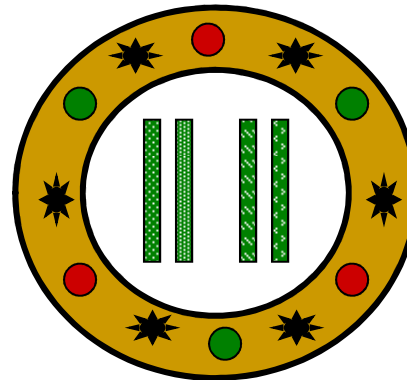
Dstrucción
del núcleo de los
protoplastos de la
especie donante



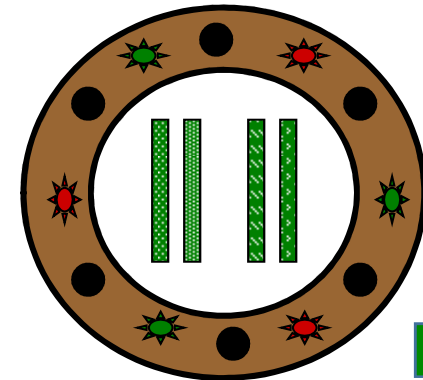
Cíbrido estricto (línea
aloplásmica)



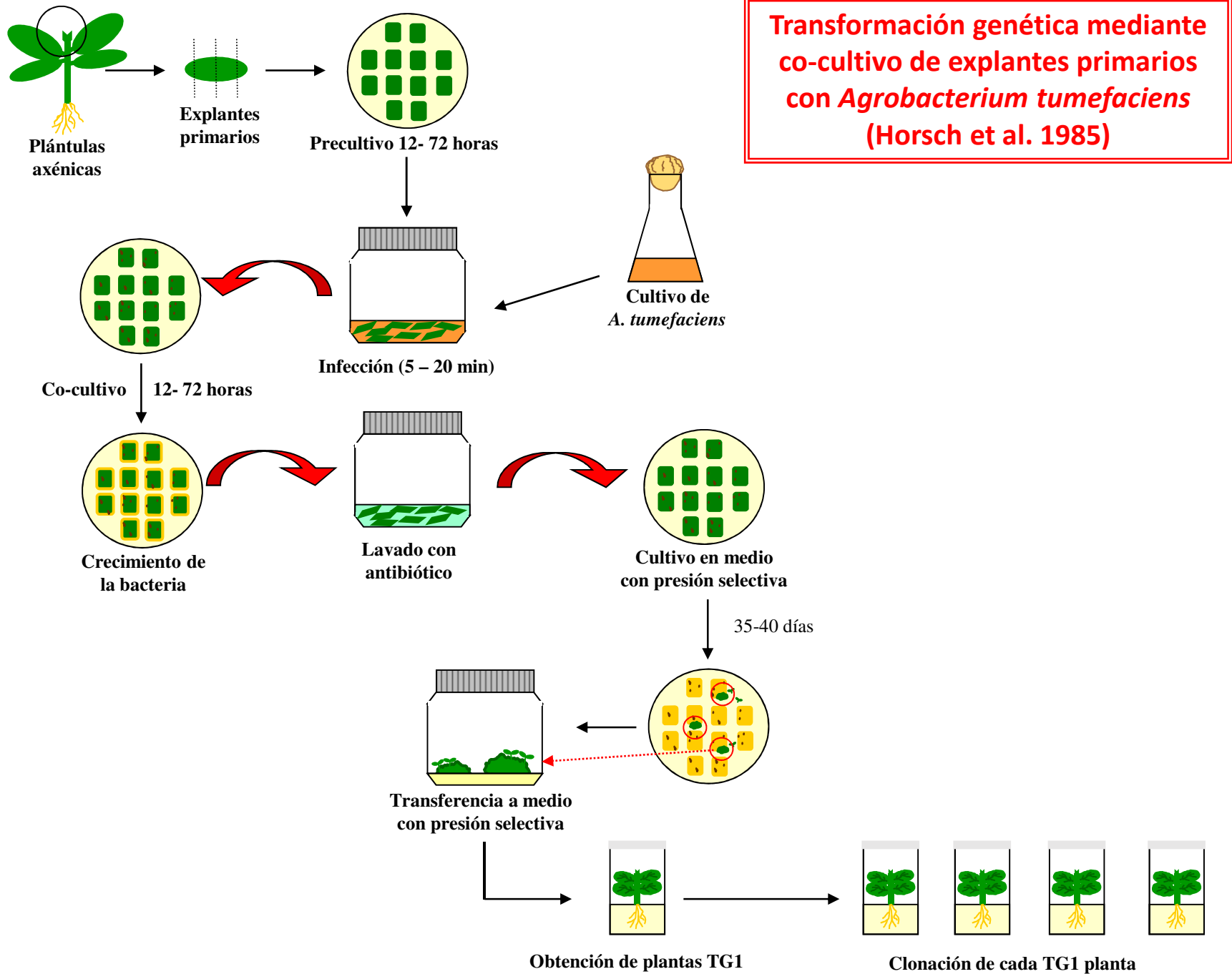
Cíbrido
heteroplásmico



Mitocondrias
recombinantes

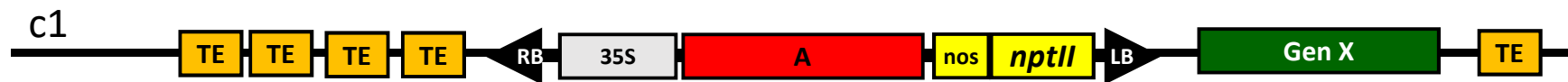


Cloroplastos
recombinantes





El T-DNA se puede integrar en cualquier cromosoma, lo que determina efectos de posición

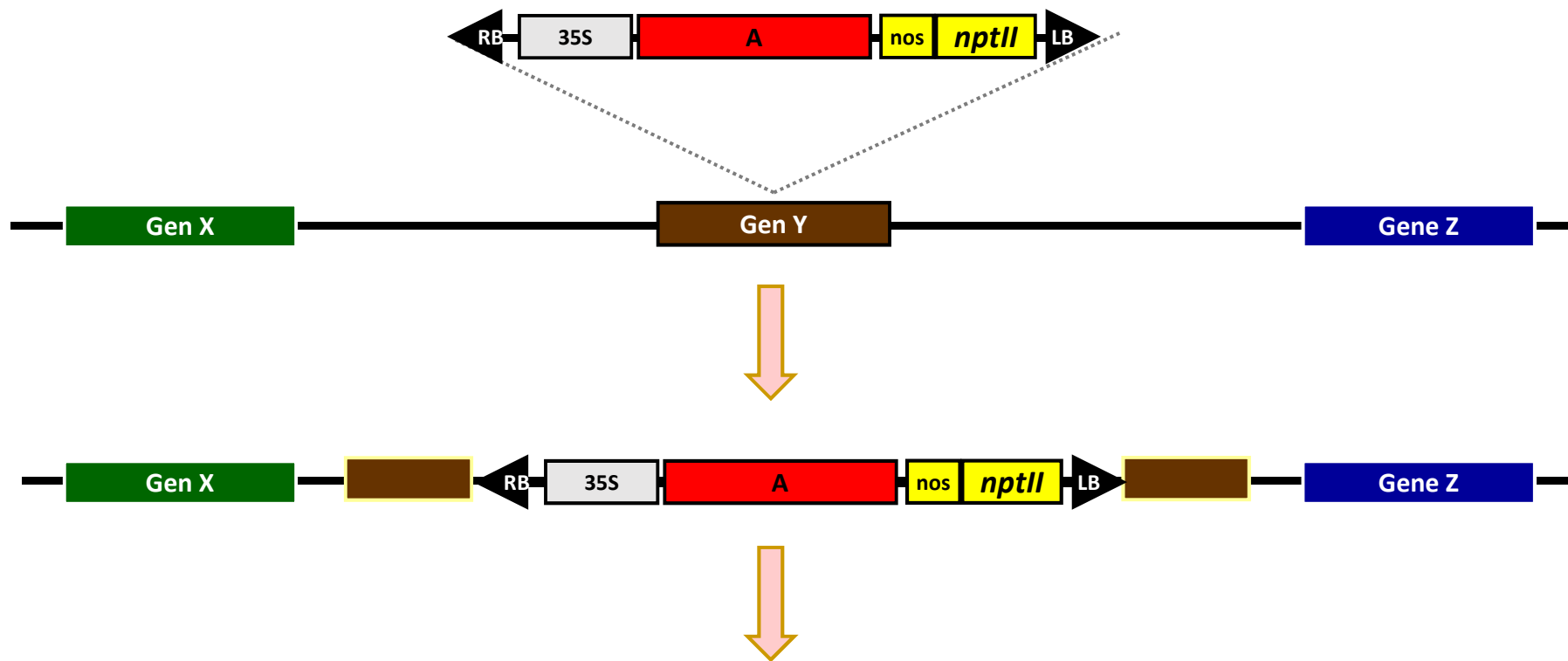


Integración en el cromosoma 1 \Rightarrow **Fenotipo A1**



Integración en el cromosoma 2 \Rightarrow **Fenotipo A2**

El T-DNA puede provocar la interrupción de un gen endógeno



Disrupción del gen Y



Fenotipo conferido por el gen transferido (A) + **Efecto disrupción (Y)**

Transformación genética

Transgénesis

Transferencia desde fuentes de
variación distantes
(sexualmente incompatibles)

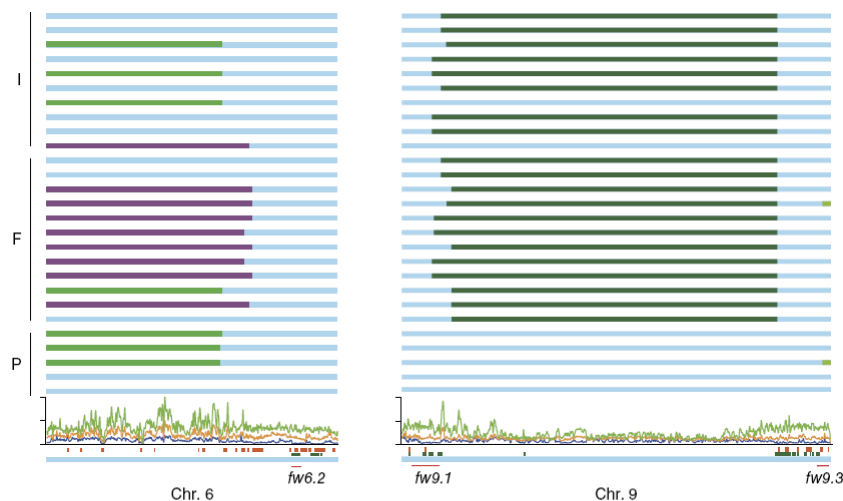
Cisgénesis

Transferencia desde fuentes de
variación relacionadas
(sexualmente compatibles)

Intragénesis

Transferencia desde otro genotipo
de la misma especie

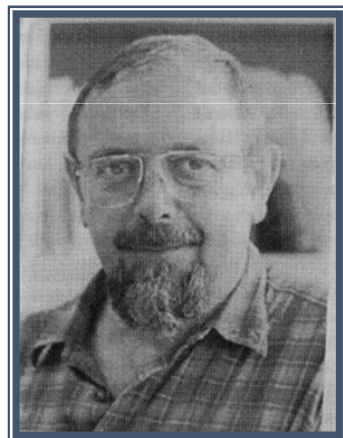
Consecuencias genéticas del retrocruzamiento



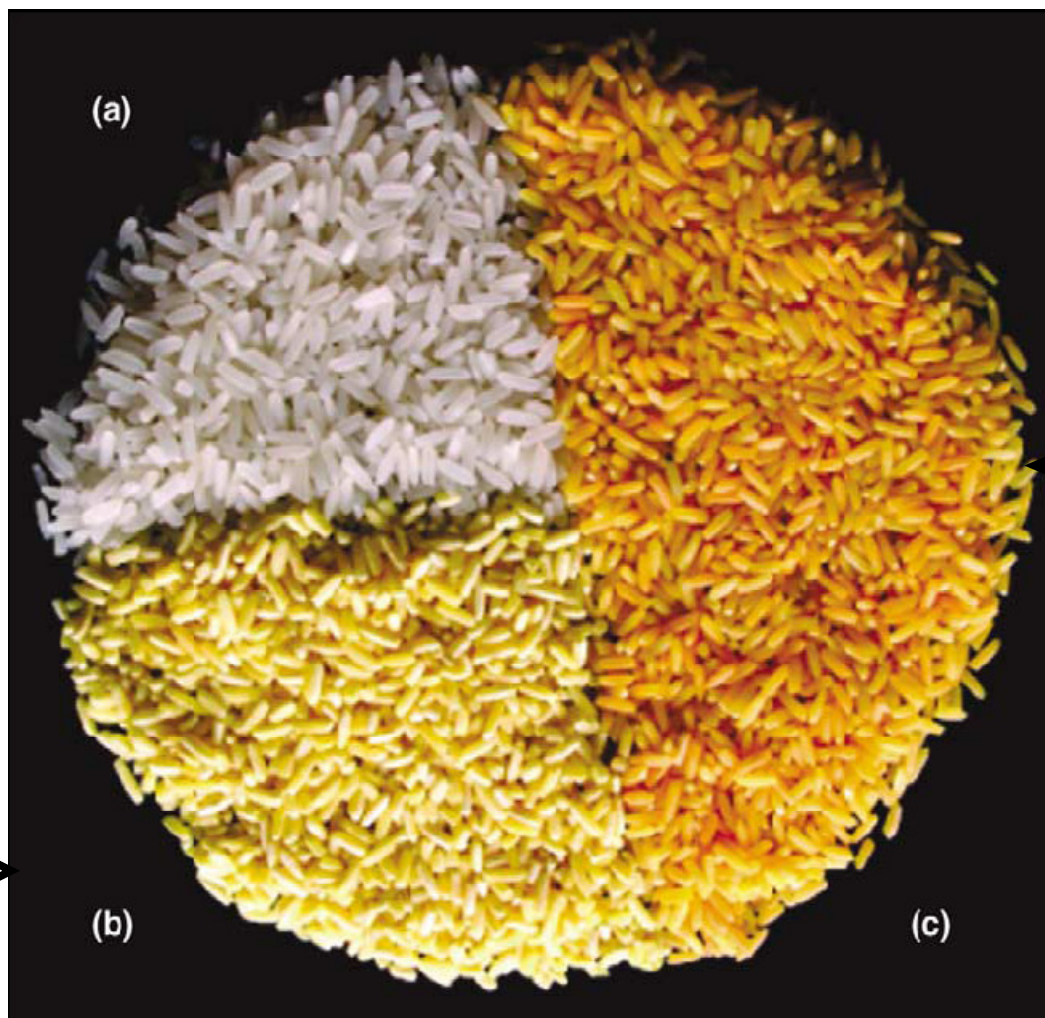
La re-secuenciación de líneas puras de tomate (I) y de variedades para consumo en fresco (F) o procesado industrial (P) ha permitido detectar extensas secuencias introgresadas en el genoma del tomate como consecuencia de programas de retrocruzamiento con especies silvestres relacionadas. Por ejemplo, **en el cromosoma 9 se ha detectado un fragmento de > 50 Mb que porta el gen de resistencia al virus del mosaico de tomate (Tm-2^a) que procede de *Solanum peruvianum***. Además se han detectado **dos grandes introgresiones en el cromosoma 6: una de 27 Mb que porta el gen de resistencia a nemátodos Mi-1 de *Solanum peruvianum* y otra de 31 Mb que porta el gen de resistencia al virus del enrollamiento de las hojas Ty-1 de *Solanum chilense***. Estas dos introgresiones ocupan la misma región genómica, lo que explica el por qué resulta tan difícil recombinar ambos genes en un mismo cultivar. Después de múltiples generaciones de retrocruzamiento, estos fragmentos introgresados se mantienen intactos, debido posiblemente a inversiones cromosómicas o a una localización pericentromérica que inhibiría la recombinación.

Referencia: Lin et al (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. Nature Genetics 46 (11) 1220 – 1228.

GOLDEN RICE 1 y 2



~2 % RDA. vit A

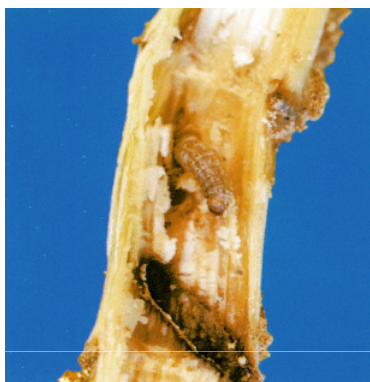


> 50 % RDA vit. A

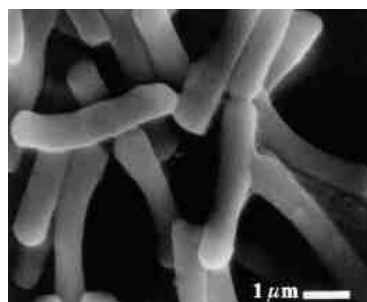
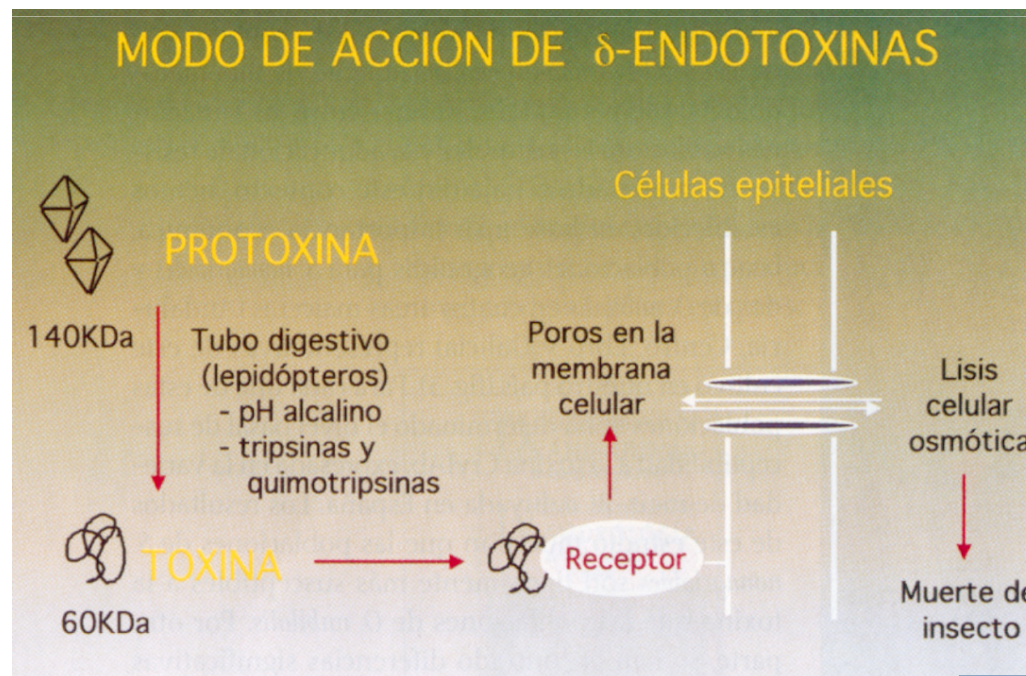
47

Figure 3. Golden Rice colors. (a) Wild-type rice; (b) GR1, expressing the phytoene synthase from daffodil along with CRTI (carotene desaturase); (c) GR2 expressing the phytoene synthase from maize along with CRTI

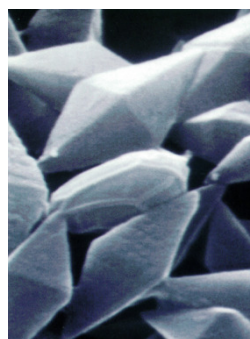
Maíz sensible



Maíz Bt resistente

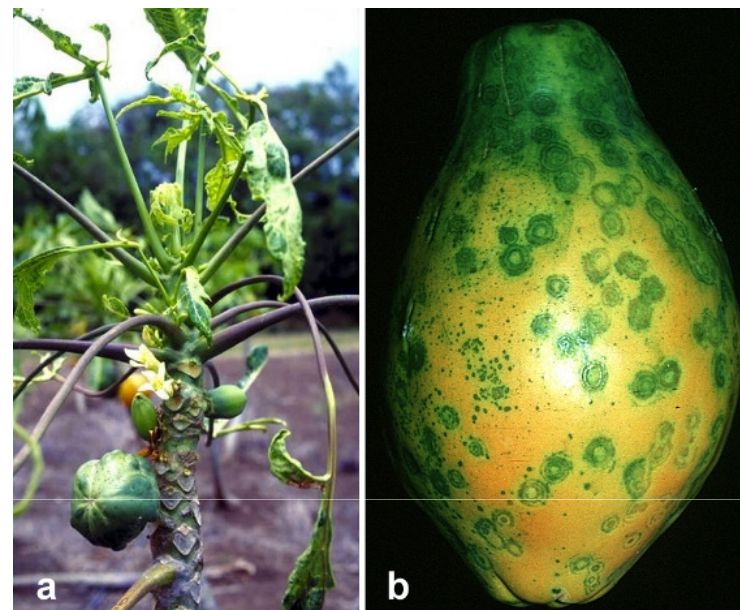


Proteína Bt



B. thuringiensis

Papaya transgénica resistente a virus



La papaya es una fruta tropical rica en vitaminas A y C y muy sensible a una serie de plagas y enfermedades severas. **En 1992 se produjo en Hawai un brote del virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-Papaya Ring Spot Virus) que destruyó las plantaciones, al punto de provocar la caída en un 40% de la producción en tan solo 5 años.**

Investigadores de Hawai junto con los de la Universidad de Cornell desarrollaron dos variedades de papaya genéticamente modificada resistente al virus. Estas variedades, denominadas “SundUp” y “Rainbow” se cultivan y comercializan en Hawaii desde 1998.

China inició el cultivo de papaya resistente a virus en 2006, con variedades desarrolladas por una universidad de ese país

Detección de mutantes aquiasmáticos (i.e. los que tienen suprimida la recombinación homóloga en la meiosis)



Identificación de los genes alterados en mutantes aquiasmáticos



Comprobación de que se puede suprimir la recombinación mediante silenciamiento de estos genes (RNAi)

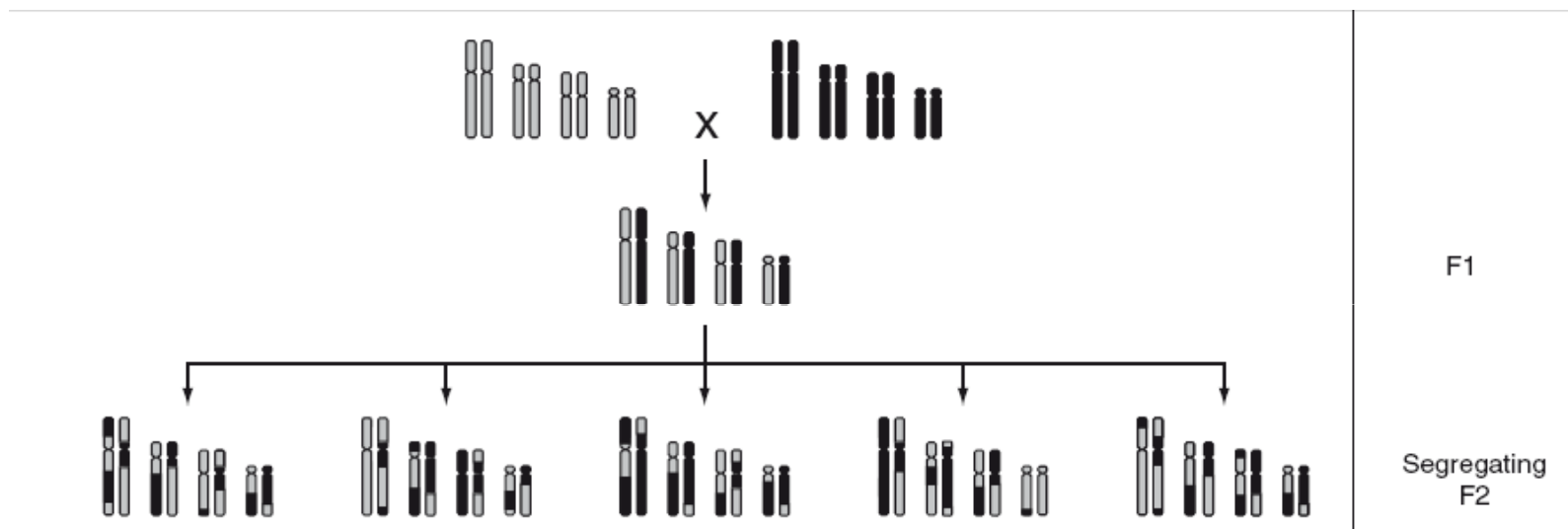


Mejora inversa

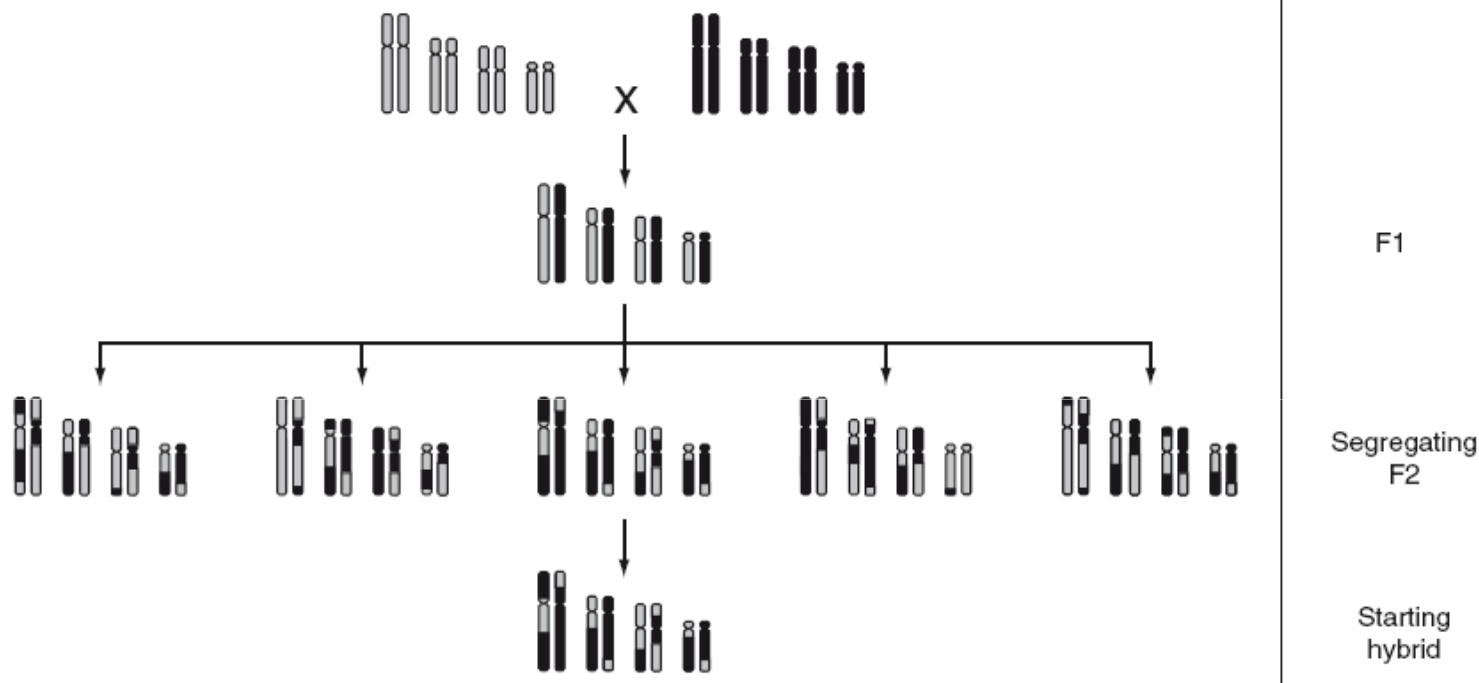
Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis

Rob Dirks¹, Kees van Dun¹, C. Bastiaan de Snoo¹, Mark van den Berg¹, Cilia L. C. Lelivelt¹, William Voermans¹, Leo Woudenberg¹, Jack P. C. de Wit¹, Kees Reinink¹, Johan W. Schut¹, Eveline van der Zeeuw¹, Aat Vogelaar¹, Gerald Freymark¹, Evert W. Gutteling¹, Marina N. Keppel¹, Paul van Drongelen¹, Matthieu Kieny¹, Philippe Ellul¹, Alisher Touraev², Hong Ma^{3,4}, Hans de Jong⁵ and Erik Wijnker^{5,*}

La recombinación impide encontrar las LP que han dado origen a un híbrido



¿Cómo se puede reconstituir un híbrido (*starting hybrid*)?



1. Supresión de la recombinación mediante RNAi
2. Obtención de haploides y doble-haploides
3. Identificación de la pareja de doble-haploides que por cruzamiento reconstituyen el híbrido original

Mejora inversa (*reverse breeding*)

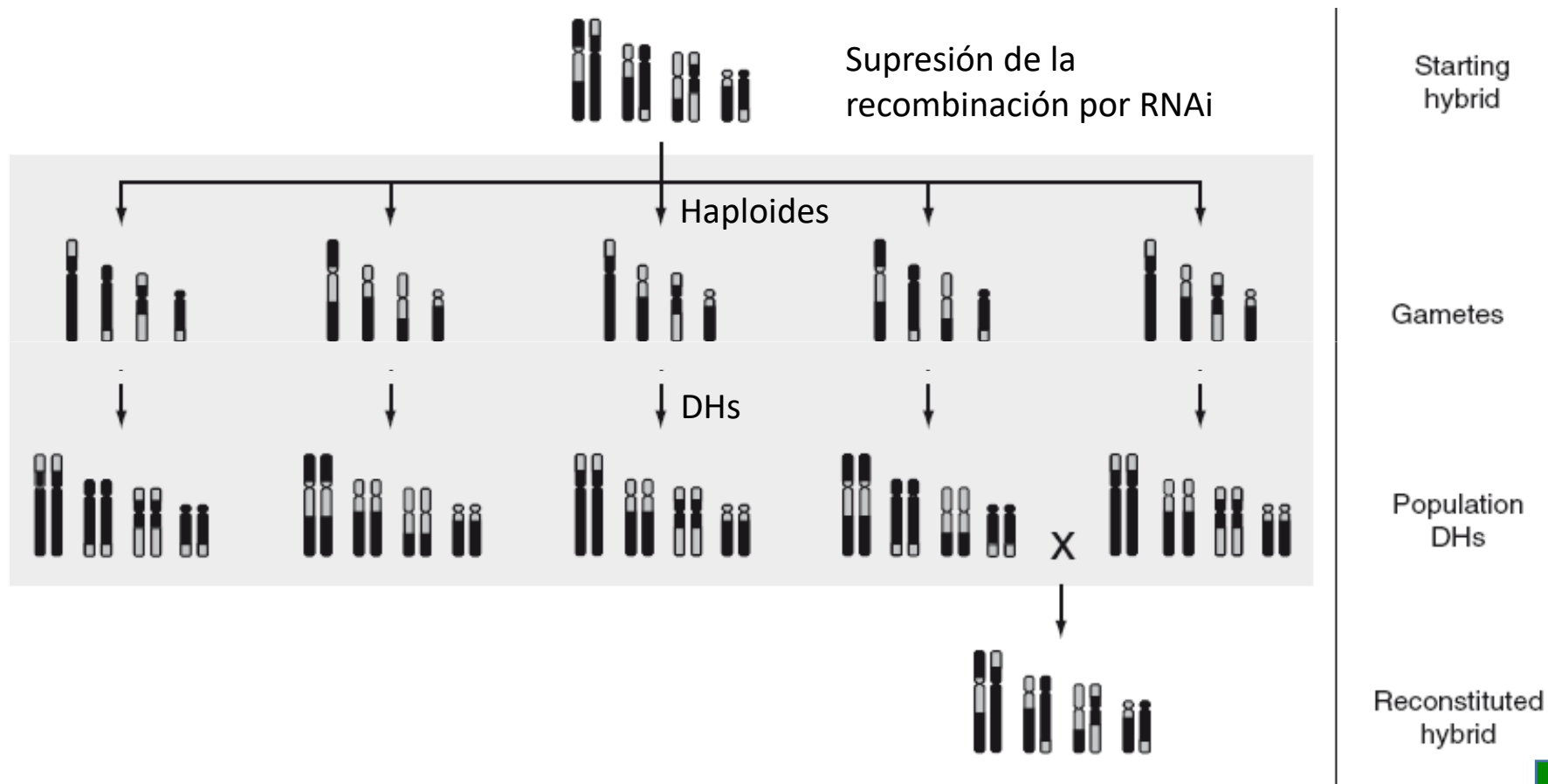


Table 1 Number of non-recombinant DHs required for reconstructing the original starting plant at different probability levels in various species

Haploid chromosome number (x)	Probability				Model species/crop
	0.90	0.95	0.99	1.00	
5	13	14	18	47	<i>Arabidopsis</i>
6	18	20	25	67	Spinach, corn salad
7	25	28	35	94	Cucumber
8	35	40	49	133	Onion
9	49	56	69	188	Barley, carrot, sugarbeet, most vegetable Brassicas, lettuce
10	69	79	98	266	Maize, sorgum, asparagus, cocoa
11	98	111	138	377	Banana, watermelon, celery, fennel, common bean
12	138	157	195	532	Tomato, pepper, melon, rice, egg plant

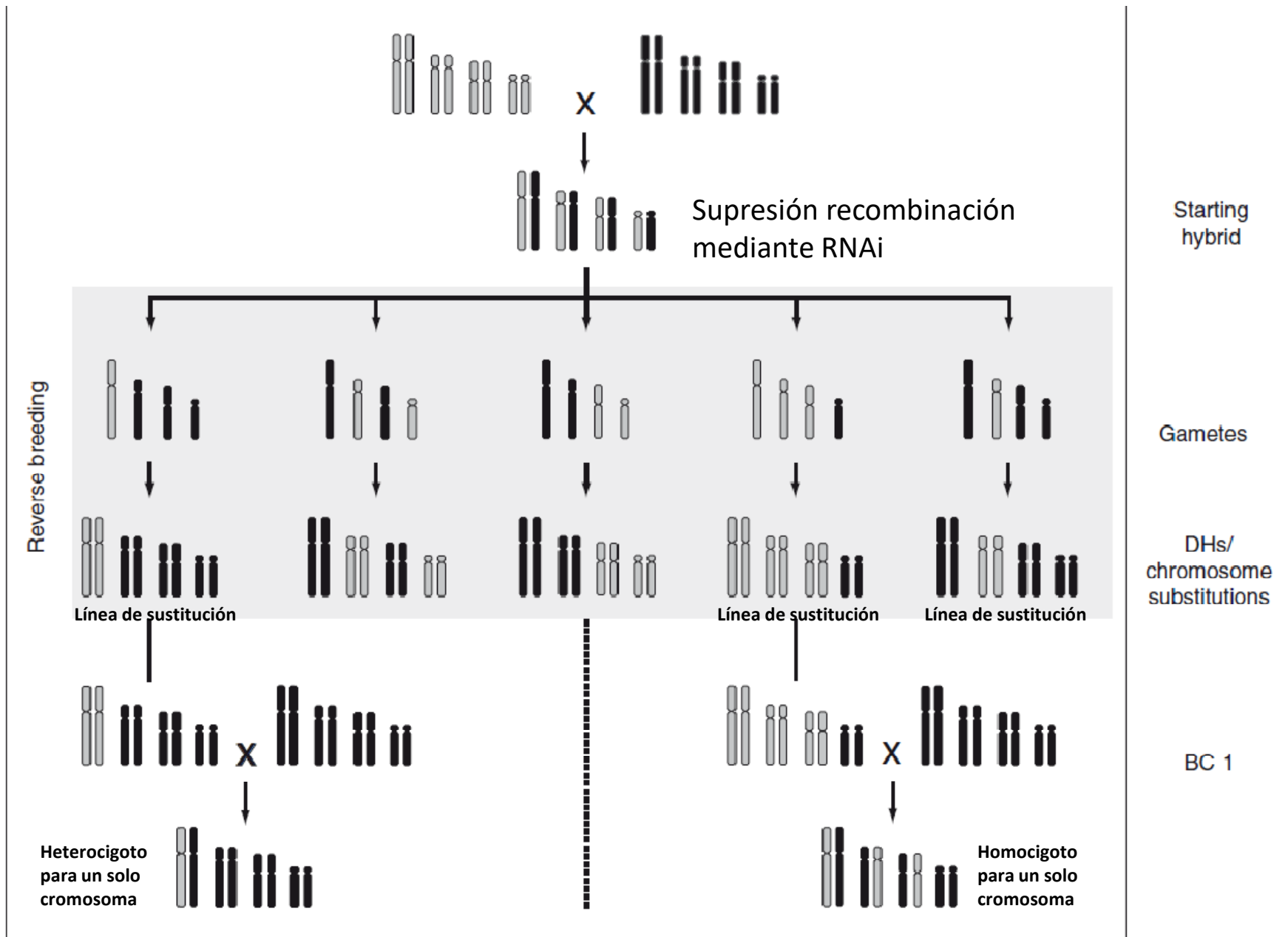
The maximum number of different DHs obtained from a heterozygous diploid in a RB experiment equals 2^x , with x being the basic chromosome number.

The probability that two DHs form a pair of 'complementary' parents equals $2^x / (2^x)^2 = (1/2)^x$, and the probability that they, upon crossing, do not reconstruct the original genotype is $1 - (1/2)^x = (2^x - 1) / 2^x$.

The number of combinations between different DHs, presuming that reciprocal crosses result in the same phenotype, is $n(n-1) / 2$.

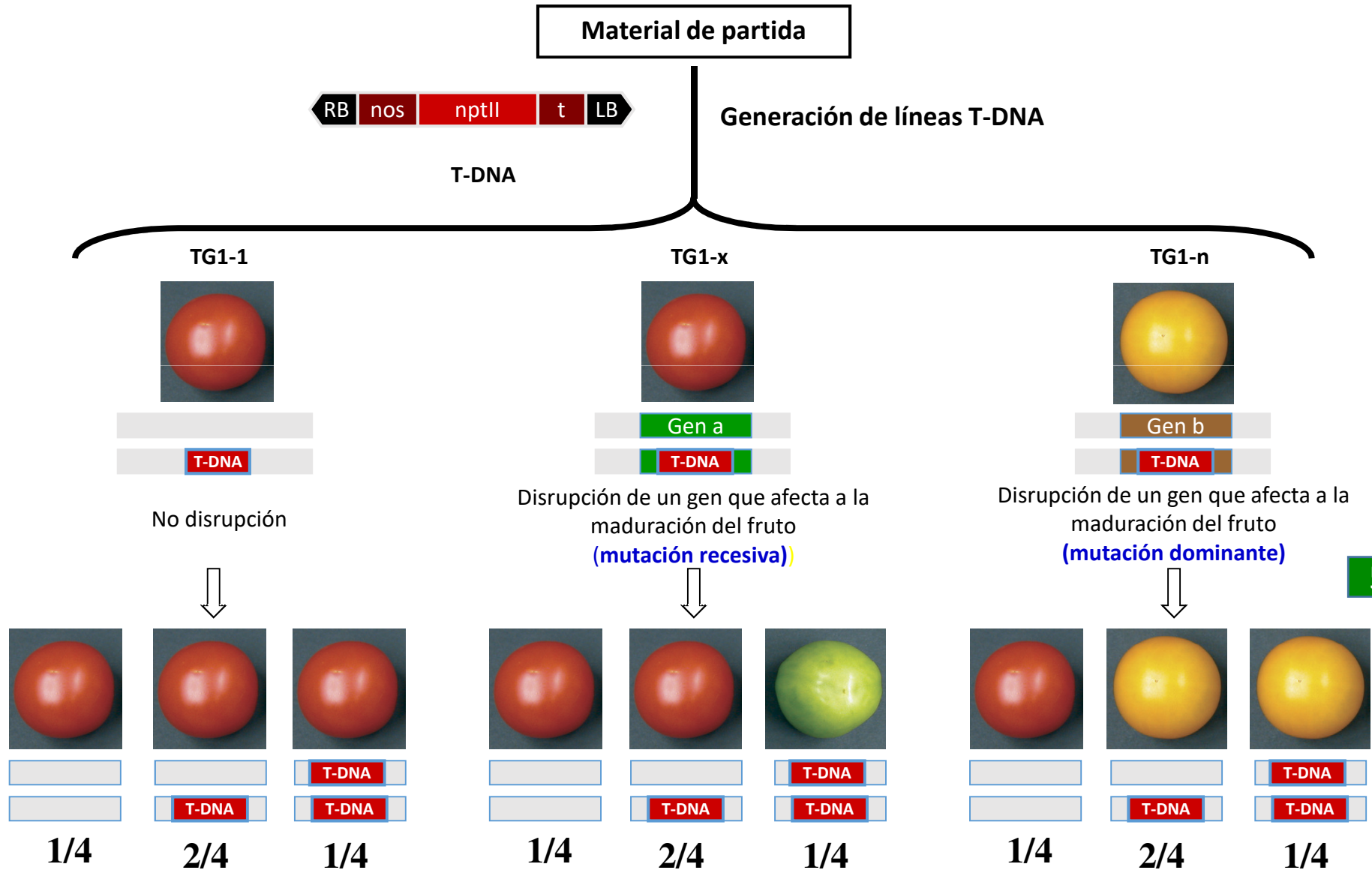
In the case of n DHs, the probability of not finding a complementary pair of lines is therefore $[(2^x - 1) / 2^x]^{n(n-1)/2}$ and the probability of at least one complementary combination of two DHs is given by the formula $[(2^x - 1) / 2^x]^{n(n-1)/2} = 0.01$ (P = 99%). This equation can be solved for different values of x. The number (n) of DHs that must be generated for finding a complementary match is highly dependent on the haploid chromosome number (x) and is given in Table 1.

Diseño de constituciones cromosómicas definidas





Etiquetado de genes en líneas T-DNA (*T-DNA tagging*)





Curso Nacional
de Mejora
Genética
de Plantas
2019



Sociedad
Española de
Genética



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



HM • CLAUSE



SAKATA®



TAKII SEED

syngenta