

# Capítulo 34

## Manipulaciones genéticas con protoplastos

L. Szabados\*

---

\* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual: Biological Research Center, Institute of Plant Physiology, Szeged, Hungría.

## Introducción

Los protoplastos ofrecen una excelente oportunidad para aplicar los conceptos y técnicas de la genética microbiana a las plantas superiores. Se pueden manipular grandes poblaciones de protoplastos como si fueran células individuales y regenerar luego plantas de las células que se seleccionen. Las manipulaciones genéticas *in vitro* de las plantas superiores son importantes no sólo en los estudios de genética básica, sino también en programas aplicados de fitomejoramiento. Las posibilidades que abre el uso de sistemas de protoplastos para el mejoramiento de las plantas de especies cultivadas —y los problemas asociados con ellos— se han discutido y revisado ampliamente (Chaleff, 1983; Negrutiu et al., 1984; Sybenga, 1983; Thomas et al., 1979; Evans et al., 1983).

Los pasos que se siguen en un programa de manipulación genética de plantas (Figura 34.1) son:

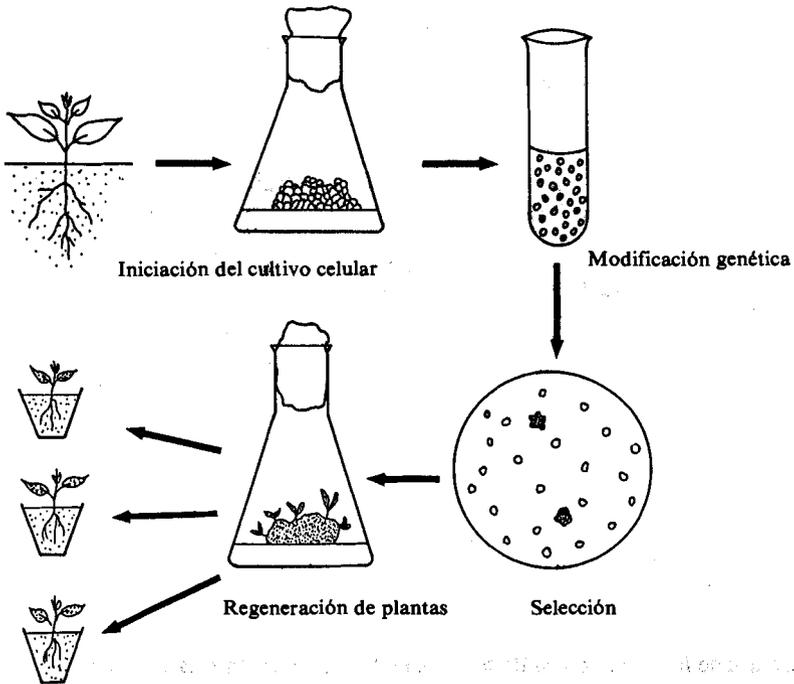


Figura 34.1. Esquema general de la manipulación genética *in vitro*.

- 1) Aislamiento de los protoplastos partiendo de cultivos celulares o de cultivos de hoja (ver el Capítulo 10).
- 2) Modificación genética de los protoplastos aislados: mutagénesis, fusión, transformación.
- 3) Selección del fenotipo deseado.
- 4) Regeneración de las plantas a partir de los clones seleccionados.

## **Protoplastos y Aislamiento de Mutantes**

Las células mutantes se han utilizado extensivamente para estudios bioquímicos y genéticos. Hay diversas razones para aislar mutantes bioquímicos de los cultivos de protoplastos o de células:

- Para el estudio del metabolismo celular.
- Para programas genéticos que emplean células somáticas.
- Por su importancia agronómica.

El uso de protoplastos para el aislamiento y la selección de mutantes tiene varias ventajas: a) los protoplastos existen como células individuales; b) es posible aislar poblaciones uniformes y numerosas de protoplastos haploides partiendo de tejidos mesófilos de plantas androgénicas; c) los protoplastos recién aislados son generalmente poblaciones homogéneas que no presentan la variabilidad genética observada en cultivos celulares prolongados; d) los sistemas de protoplastos son adecuados para la interpretación estadística (Negrutiu et al., 1984; Maliga, 1984; Maliga et al., 1982a).

Para aislar mutantes, sin embargo, se requieren grandes cantidades de protoplastos que estén dividiéndose activamente. El aislamiento de protoplastos y la técnica de su cultivo deberían mejorarse hasta un nivel tal que la liberación de protoplastos, la viabilidad y la eficiencia de su cultivo sean reproducibles en grado sumo. En un sistema de alta eficiencia, la progresión del ciclo celular de la población de protoplastos presenta cierta sincronía durante las primeras mitosis, fenómeno que permite aplicar el tratamiento mutagénico en varios puntos del ciclo celular.

Poblaciones de protoplastos haploides, aptas para experimentos de aislamiento de mutantes, se han aislado de *Nicotiana plumbaginifolia* (Maliga, 1984; Negrutiu, 1981) y de *Hyoscyamus muticus* (Strauss et al., 1981; Shimamoto et al., 1983).

En esos sistemas de protoplastos se han aplicado diferentes tratamientos mutagénicos. La irradiación es un método limpio y efectivo para inducir mutaciones. Negruti (1981) utilizó luz ultravioleta para irradiar los protoplastos haploides de *N. plumbaginifolia*. Bourgin (1978) obtuvo mutaciones en protoplastos de mesófilo de tabaco haploide empleando luz ultravioleta, tanto el día del aislamiento como uno, dos o tres días después de iniciado su cultivo. La irradiación gamma ha sido utilizada por Maliga et al. (1982a) y por Marton et al. (1982) para la mutagénesis de los protoplastos haploides de *N. plumbaginifolia*.

Varios mutágenos químicos se han utilizado para inducir mutagénesis en protoplastos de plantas. Uno de ellos es N-etil-N-nitrosourea (Csépló et al., 1982; Evola, 1983; Ohyama, 1982) cuyo resultado ha sido exitoso; este mutágeno pierde su actividad aproximadamente 48 horas después de aplicado y puede usarse en el medio de cultivo de los protoplastos sin que sea necesario lavarlo. N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) o el sulfonato de etilmetano (EMS) también se han utilizado como mutágenos químicos para la obtención y aislamiento de mutantes partiendo de protoplastos (Ohyama, 1982; Strauss et al., 1981). Gebhardt et al. (1981) encontraron que el tratamiento con MNNG es más efectivo en las poblaciones de protoplastos en división —dos días después, por ejemplo, de la iniciación del cultivo— que en las de protoplastos recién aislados.

Las condiciones de cultivo, la programación del tratamiento mutagénico, el tipo de mutágeno y su dosis se deberían optimizar experimentalmente para cada sistema de protoplastos. Frecuentemente, los protoplastos se incuban en altas densidades durante los primeros días de cultivo, en el momento de la mutagénesis. Una vez que han empezado a dividirse, se cultivan en bajas densidades para permitir la separación de las colonias originadas de células individuales y para hacer la selección.

Los protoplastos de *N. plumbaginifolia* se han utilizado para estos experimentos. Se han aislado mutantes auxótrofos que requieren una base de ácido nucleico y aminoácidos. El procedimiento de aislamiento consiste en cultivar los protoplastos que han experimentado mutaciones para producir colonias en un medio completo; más tarde se realizan pruebas individuales para conocer sus requerimientos nutricionales en un medio mínimo. Tres colonias auxótrofas seleccionadas se han identificado como líneas que requieren uracilo, isoleucina y leucina (Maliga et al., 1982a, Sidorov et al., 1981a). Mediante un procedimiento similar se han aislado mutantes que requieren histidina, triptofano y nicotinamida de protoplastos haploides de *H. muticus* (Gebhardt et al., 1981). Shimamoto y King (1983) aislaron también de *H. muticus* mutantes auxótrofos que requieren histidina.

Líneas celulares deficientes en nitrato reductasa se aislaron de protoplastos de mesófilo de *N. plumbaginifolia* haploide sometidos a mutación (Maliga et al., 1982a; Marton et al., 1982a), de *H. muticus* haploide (Strauss et al., 1981), y de *N. tabacum* dihaploide (Evola, 1983). En los tres casos, las líneas aisladas se seleccionaron por su resistencia al ion clorato. La nitrato reductasa reduce el clorato a clorito, que es tóxico para las células de las plantas. Por otra parte, las células deficientes en nitrato reductasa son resistentes al clorato y, por tanto, se puede utilizar este ion para una selección indirecta de células deficientes en esa enzima.

Varios mutantes resistentes a los antibióticos, a algunas drogas, y a los análogos de aminoácidos se han seleccionado a partir de protoplastos. Líneas resistentes a la lincomicina se seleccionaron en cultivos de protoplastos foliares del tabaco (*N. plumbaginifolia*) por su capacidad para tomar un color verde en el medio de regeneración, en presencia del antibiótico (Csépló y Maliga, 1982). Este tipo de resistencia se transmitió por vía materna a la población F<sub>1</sub>.

Las líneas resistentes a S-aminoetil-cisteína de *N. plumbaginifolia* fueron seleccionadas de clones de protoplastos de mesófilo foliar sometidos a mutación con luz ultravioleta (Negrutiu, 1981). Colonias celulares resistentes a concentraciones tóxicas de L-valina ó L-lisina más L-treonina fueron seleccionadas a partir de cultivos de protoplastos de mesófilo de tabaco haploide (*N. tabacum*) que sufrieron mutación con luz ultravioleta (Bourgin, 1978; Bourgin et al., 1980).

Ciertos resultados indican que las variaciones provenientes de los cultivos de protoplastos, ya sea espontáneas o inducidas, tienen una importancia no sólo científica sino también práctica en el fitomejoramiento (Chaleff, 1983).

## **Fusión de Protoplastos e Hibridación Somática**

La hibridación somática en las plantas superiores fué posible cuando los métodos enzimáticos permitieron el aislamiento de grandes números de protoplastos viables de los cuales podían regenerarse las plantas, y cuando se desarrollaron los métodos de fusión de los protoplastos.

Schieder (1982) consideró cuatro aspectos importantes de la fusión de protoplastos:

1. La producción de híbridos somáticos anfidiplóides y fértiles de especies sexualmente incompatibles.

2. La producción de líneas heterocigóticas dentro de una especie que normalmente sólo se propaga por vía vegetativa, como la papa.
3. La transferencia de sólo una parte de la información nuclear, de una especie a otra, mediante el fenómeno de la eliminación cromosómica.
4. La transferencia de información genética citoplásmica de una línea o especie a otra.

## **Fusión de protoplastos**

En la Figura 34.2 se representan esquemáticamente los distintos pasos de la fusión de protoplastos. En los primeros trabajos se utilizaron sales inorgánicas, especialmente el nitrato de sodio, como agentes inductores de la fusión (Power et al., 1970). Posteriormente, Keller et al. (1973) propusieron la aplicación de un medio con alto contenido de  $\text{Ca}^{++}$  y alto pH para inducir la fusión de los protoplastos. Kao et al. (1974) y casi al mismo tiempo Wallin et al. (1974) utilizaron por primera vez polietilenglicol (PEG), como un potente agente de fusión. Desde entonces, el PEG se ha utilizado exitosamente para fusionar diferentes protoplastos vegetales. Los protoplastos pueden fusionarse en un tubo de centrifuga, mezclando la solución del PEG con la suspensión de protoplastos (Burgess et al., 1974b). Otro método consiste en fusionar los protoplastos en cajas Petri como una monocapa celular (Kao y Michayluk, 1974; Kao et al., 1974; Menczel et al., 1981; 1984; Ashmore y Gould, 1982).

A causa de los fosfolípidos de la membrana, que tienen carga negativa, los protoplastos tienden a repelerse mutuamente a pH fisiológico. Los iones calcio pueden compensar las cargas negativas y así favorecer una leve agregación de protoplastos (etapa de adherencia en un punto). El PEG puede propiciar una agregación adicional que sirva como un puente entre las membranas celulares de los protoplastos adyacentes (etapa de adhesión superficial, Figura 34.3, A).

Durante el proceso de elución, especialmente cuando se añade una solución rica en calcio y con un pH alto, puede ocurrir una redistribución de las cargas y la formación de puentes de  $\text{Ca}^{++}$  que conducirían a distorsiones de la membrana y, más adelante, a la fusión de las membranas adyacentes (Keller et al., 1973; Koblitz, 1980). El proceso de fusión empieza con la formación de canales de fusión en los puntos o áreas de agregación. Más adelante, estos canales se extienden a toda la superficie de las membranas que se hallan en contacto (Burgess et al., 1974a). Ocurrida la fusión de la membrana, el citoplasma se mezcla en un período de varias horas y se forman los heterocariontes (Figura 34.3, B y C).

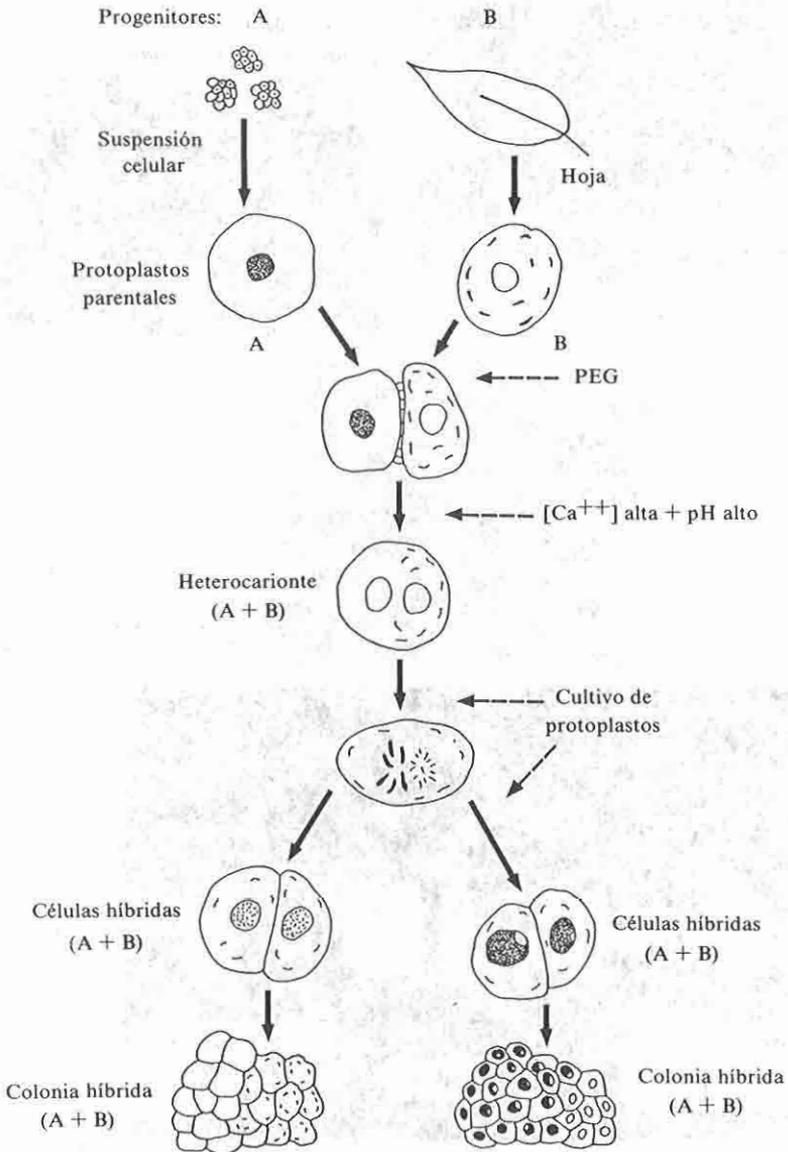


Figura 34.2. Representación esquemática de la fusión de protoplastos.

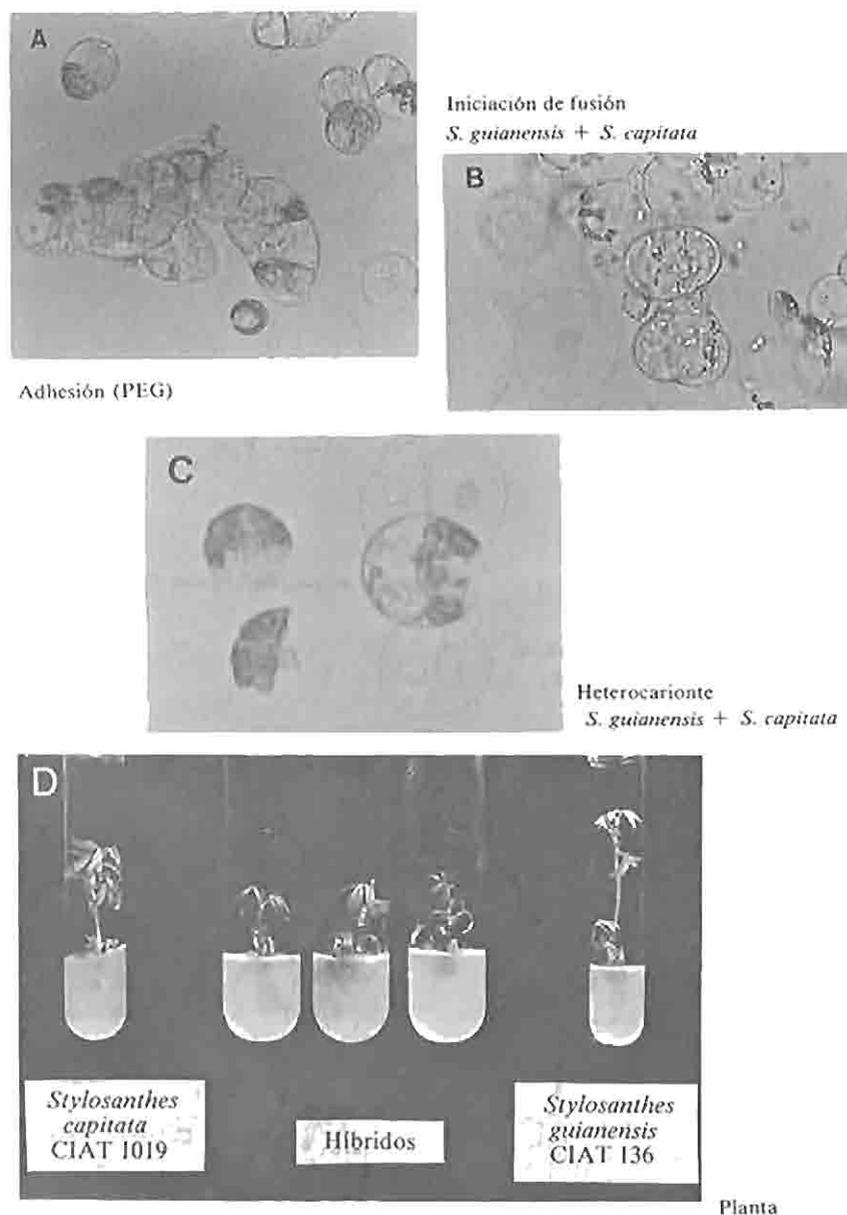


Figura 34.3. La fusión de protoplastos que da origen a heterocariontes. A) Etapa de adhesión superficial. B) y C) Fusión de membranas y generación de heterocariontes. D) Plantas regeneradas.

En los últimos años, la investigación sobre la inducción de la fusión de protoplastos mediante un campo eléctrico ha progresado hasta el punto de merecer una seria consideración como alternativa del PEG. La dielectroforesis se emplea para obtener un estrecho contacto entre los protoplastos; luego se induce la fusión misma aplicando un impulso corto de corriente directa (Zimmermann et al., 1981). La electrofusión evita la toxicidad que posiblemente causa el PEG y permite fusionar un rango más amplio de protoplastos con mayor eficiencia (Zimmermann, 1982; Zachrisson y Bornmann, 1984).

Varjos factores pueden influir en la frecuencia de la fusión: a) sólo los protoplastos completamente aislados tienen capacidad para fusionarse; b) los protoplastos que presentan residuos no digeridos de pared celular o que ya han sintetizado la nueva pared celular, no se fusionan; c) la concentración y el tipo de enzimas tienen efectos profundos en la fusión de los protoplastos y en la viabilidad de los heterocariocitos; d) el tratamiento de las células cultivadas en suspensión con soluciones enzimáticas que contengan driselasa da como resultado, en algunos casos, una frecuencia de fusión más alta, aunque los protoplastos tratados con esta enzima son generalmente más débiles (Kao et al., 1974).

La fluidez de la membrana es importante en el proceso de fusión de los protoplastos. La temperatura de cultivo y los fosfolípidos que componen la membrana tienen gran influencia en la fluidez de ésta (Keller et al., 1973); por eso, el efecto benéfico de temperaturas relativamente altas en la fusión se debe a la mayor fluidez de la membrana (Keller et al., 1973; Senda et al., 1980).

Ashmore et al. (1982) encontraron que los protoplastos, en ciertas fases del ciclo celular, participaban en las fusiones con mayor frecuencia de lo que se esperaba. Además, si los protoplastos se hallaban en una misma fase del ciclo celular, se fusionaban con mayor frecuencia que si estaban en diferentes fases. No obstante, con el fin de estudiar los procesos de regulación, es interesante fusionar los protoplastos en diferentes etapas del ciclo celular. La interacción entre los protoplastos mitóticos y los de interfase dio como resultado la inducción de la condensación cromosómica prematura (CCP) en el núcleo interfásico (Szabados y Dudits, 1980; Dudits et al., 1982).

Se ha informado también sobre la fusión de protoplastos de plantas con diferentes células animales, que resulta en la formación de heterocariontes planta-animal. Dudits et al. (1976) fusionaron células de HeLa con protoplastos de zanahoria y observaron la formación de una nueva pared celular a los 3 días después de la fusión. Davey et al. (1978) fusionaron células

anfibras con protoplastos de plantas superiores y realizaron un estudio ultraestructural sobre la fusión. Hadlaczký et al. (1980) fusionaron células de *Drosophila* sp. y protoplastos de soya; pudieron observar en esa fusión la continuación de la síntesis del ADN y las divisiones de los heterocariontes. La fusión de las células mitóticas de HeLa con protoplastos de zanahoria o soya condujo a la inducción de la CCP en el núcleo de la planta en interfase (Dudits et al., 1982). También se ha informado sobre la fusión de esferoplastos bacterianos con protoplastos de plantas superiores (Hasezawa et al., 1983; Hain et al., 1984); este tipo de fusiones pueden ayudar a superar las limitaciones del rango hospedante de los sistemas de transformación.

Los heterocariontes que resultan de la fusión de protoplastos pueden experimentar divisiones celulares si se cultivan adecuadamente. Las investigaciones sobre el comportamiento del núcleo en los heterocariontes revelaron que, en general, el núcleo se divide sincrónicamente. Dependiendo de la orientación de los husos, la mitosis sincrónica puede resultar en la yuxtaposición de cromosomas heteroespecíficos en una figura de la metafase y en una verdadera hibridación celular (Kao et al., 1974). Igualmente, se ha observado la fusión nuclear en los heterocariontes (Constabel et al., 1977).

### **Selección de híbridos somáticos**

El proceso de fusión resulta en una variedad de productos de fusión homocariontes y heterocariontes. Las verdaderas colonias híbrido-somáticas deberían seleccionarse, tan pronto como fuese posible, de las poblaciones resultantes. Se han establecido dos procedimientos principales de selección:

- Selección mecánica directa.
- Selección de complementación.

**Selección mecánica.** El aislamiento mecánico de los heterocariontes se ha utilizado en los experimentos de fusión cuando no se dispone de mutantes adecuados para la selección de complementación. Kao (1977) fusionó los protoplastos incoloros (de cultivos celulares) de la soya y los protoplastos verdes del mesófilo del tabaco. Los protoplastos fusionados se pueden distinguir fácilmente puesto que presentan color y apariencia diferentes. La transferencia, con micropipeta, de los protoplastos fusionados a los pequeños alvéolos de las placas de <sup>+</sup>Cuprac ha permitido el cultivo y la observación de las células híbridas individuales. Un sistema

similar se utilizó para la selección y el cultivo individual de heterocariontes de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica campestris* (Gleba y Hoffmann, 1978).

Menczel et al. (1978) aislaron heterocariontes de *N. knightiana* y *N. silvestris* usando micropipetas y los cultivaron separadamente. Las colonias que se originaron de los heterocariontes podían distinguirse por su color verde. Patnaik et al. (1982) utilizaron un marcador fluorescente para la identificación de los heterocariontes de las plantas. Los productos de fusión se seleccionaron mediante un patrón apropiado de coloración y se aislaron con un micromanipulador.

**Selección de complementación.** Con este método, sólo las colonias híbridas pueden crecer en un medio que es selectivo para ellas o pueden distinguirse fácilmente de las colonias progenitoras. Carlson et al. (1972) utilizaron por primera vez, y con éxito, la complementación para aislar híbridos somáticos auxotróficos a auxinas, después de la fusión de dos especies de *Nicotiana* que requieren auxinas.

Un procedimiento utilizado con frecuencia es la complementación de los mutantes albinos no alélicos: en ella se seleccionan los híbridos, como colonias verdes, entre los albinos blancos (Douglas et al., 1981a; 1981b). A menudo se combina el uso de un marcador albino con otra presión selectiva. Dudits y sus colaboradores utilizaron un mutante albino de *Daucus carota* para realizar varios experimentos de hibridación; los protoplastos derivados de suspensiones celulares de este mutante se fusionaron con protoplastos foliares que no se dividían de *Daucus capillifolius*, de *Petroselinum hortense*, o de *Aegopodium podagraria*. Las colonias verdes regeneradas se seleccionaron e identificaron como híbridos (Dudits et al., 1979; Dudits et al., 1980a; 1980b). Un procedimiento de selección similar se utilizó en la hibridación somática de *N. glauca* y *N. tabacum* (Evans et al., 1980).

El empleo de mutantes auxotróficos para la selección de híbridos somáticos es promisorio, porque sólo las líneas híbridas pueden sobrevivir en el medio selectivo, y de esta manera la selección de híbridos puede efectuarse en un período temprano del cultivo.

Según varios informes, la hibridación somática se obtiene mediante el empleo de mutantes deficientes en nitrato reductasa, por una parte, y la complementación de esta deficiencia enzimática, por la otra (Glimelius et al., 1978; Gupta et al., 1982; Marton et al., 1982b). Los híbridos somáticos interespecíficos de *Nicotiana* + *Hyoscyamus* se obtuvieron empleando auxotrofia (nicotinamida) y deficiencia (nitrato reductasa) como marcadores selectivos complementarios (Potrykus et al., 1984).

Los mutantes con resistencia estable contra los análogos de aminoácidos, los inhibidores metabólicos o los antibióticos suministran otros procedimientos de selección. Harms et al. (1981) y Cella et al. (1983) utilizaron diferentes mutantes de zanahoria resistentes a los análogos de aminoácidos. Evola et al. (1983) emplearon para la hibridación somática intraespecífica líneas celulares de tabaco resistentes, por una parte, a la hidroxipiridina y al picloram, y que además utilizan glicerina. Horn et al. (1983) hibridaron protoplastos de *N. tabacum* resistentes a 5-metiltryptofano con protoplastos de *N. glutinosa* y seleccionaron los híbridos por su resistencia a 5-metiltryptofano. Kameya et al. (1981) utilizaron la resistencia a 5-metiltryptofano y a acetidina-2-carboxilato para seleccionar híbridos somáticos de *D. carota* y de *D. capillifolius*.

Maliga y sus colaboradores emplearon mutaciones de marcadores de cloroplastos que poseían resistencia codificada a los antibióticos, para la selección de híbridos somáticos de especies de *Nicotiana*. La resistencia de *N. silvestris* a la kanamicina se utilizó para seleccionar los híbridos de esa especie con *N. knightiana* (Maliga et al., 1977). La resistencia a la estreptomomicina sirvió también para la selección de híbridos de *N. tabacum* (SR 1) y *N. silvestris* (Medgyesy et al., 1980).

Los marcadores fenotípicos no selectivos se han utilizado en la hibridación de *D. innoxia* y *Atropa belladonna*. Los callos híbridos se reconocieron por la producción de vellosidades, típicas de *D. innoxia*, y por el color verde derivado de *A. belladonna* (Krumbiegel y Schieder, 1979).

Cuando los marcadores genéticos no están disponibles, la complementación metabólica puede ayudar en la recuperación de los productos de fusión (Nehls, 1978). Sidorov et al. (1981b) fusionaron protoplastos de *N. plumbaginifolia* tratados con yodoacetato, e irradiaron protoplastos de *N. tabacum*. Los protoplastos progenitores tratados no pudieron dividirse, pero los heterocariontes podían formar colonias híbridas debido a la complementación metabólica. En otros experimentos sólo un progenitor fue inactivado por tratamientos con yodoacetato (Cella et al., 1983), con yodoacetamida (Lázar et al., 1981), o por irradiación (Zelcer et al., 1978; Gupta et al., 1982).

## Análisis de los híbridos somáticos

La naturaleza híbrida de las plantas seleccionadas puede verificarse con varios métodos.

**Análisis morfológico.** Generalmente, las plantas híbrido-somáticas regeneradas difieren de las plantas progenitoras en el hábito de crecimiento y en el vigor. Frecuentemente, presentan un fenotipo intermedio (Douglas et al., 1981b; Dudits et al., 1977; Gleba et al., 1979; Horn et al., 1983). Ejemplos conocidos son los híbridos somáticos entre la papa y el tomate. Las flores, frutos, hojas y raíces tienen características morfológicas que se asemejan tanto a un progenitor, el tomate, como al otro, la papa (Melchers et al., 1978).

Cuando se disponga de marcadores morfológicos, deberían compararse con los de los híbridos sexuales, labor que sólo es posible en los híbridos de especies estrechamente relacionadas (Evans et al., 1982).

**Análisis isoenzimático.** El análisis isoenzimático ha sido utilizado extensivamente para verificar la naturaleza híbrida de los regenerantes seleccionados. Se han hecho estudios con esterasa (Douglas et al., 1981b; Menczel et al., 1978), aspartato-amino transferasa y superóxido dismutasa (Douglas et al., 1981b), con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glutamina-oxaloacético transaminasa (Dudits et al., 1980a), con alcohol deshidrogenasa (Gleba et al., 1978; Menczel et al., 1978), lactato deshidrogenasa y peroxidasa (Gleba et al., 1978), y con otras enzimas.

La ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (Rubisco) es interesante porque su subunidad mayor es codificada por un gen localizado en el ADN del cloroplasto, mientras que la subunidad menor lo es por genes nucleares. Por tanto, el análisis de las isoenzimas Rubisco suministra información sobre la expresión de los genes, tanto del núcleo como del cloroplasto, y sobre la herencia (Melchers et al., 1978; Glimelius et al., 1978; Horn et al., 1983).

Aunque las isoenzimas varían dentro de los tejidos de las plantas—razón por la cual los zimogramas deberían interpretarse cautelosamente—éstos se consideran como una prueba de la presencia, y de la expresión, de diferentes alelos de ciertos genes y, en consecuencia, como prueba de la naturaleza híbrida de la planta. Frecuentemente, el patrón de las isoenzimas no es sólo una suma de las bandas progenitoras: se ha observado en los híbridos la desaparición de ciertas bandas progenitoras y la aparición de nuevas bandas denominadas híbridas (Douglas et al., 1981b).

**Análisis cromosómico.** En la mayoría de los híbridos somáticos seleccionados se encontró un alto número de cromosomas. En general, se han utilizado protoplastos diploides para los experimentos de fusión y se esperaba, por tanto, obtener híbridos somáticos predominantes tetraploides o anfidiploides; esta condición cromosómica se ha encontrado, en

efecto, en varios híbridos somáticos intraespecíficos e interespecíficos (Douglas et al., 1981b; Evans et al., 1980; Lázár et al., 1981).

En las combinaciones intergenéricas, la naturaleza del híbrido somático de las colonias seleccionadas podría confirmarse por medio del tamaño diferente de los cromosomas de ambos progenitores (Gleba y Hoffmann, 1978; Krumbiegel y Schieder, 1979).

**Análisis del ADN nuclear.** Se han desarrollado métodos bioquímicos para comprobar la presencia de un tipo particular de ADN en los híbridos somáticos. Estos métodos tienen la ventaja de que poseen una alta resolución y de que no dependen de la expresión de genes particulares. Saul et al. (1984) utilizaron sondas de hibridación no cruzada de *H. muticus* y *N. tabacum* en una prueba sencilla de hibridación de ADN para caracterizar los híbridos somáticos posibles.

### **Variabilidad genética y eliminación de cromosomas**

La variabilidad se ha observado como un fenómeno común en los híbridos somáticos. Kao (1977) describió la eliminación aleatoria de cromosomas de *N. glauca* en híbridos de soya x *N. glauca*. Las primeras divisiones fueron asincrónicas y condujeron a pérdidas cromosómicas. En las líneas híbridas estabilizadas, los cromosomas de *N. glauca* estaban en sincronía con los cromosomas de soya.

Los datos citológicos y bioquímicos han confirmado la inestabilidad genética y la segregación cromosómica no específica de los cromosomas progenitores en las líneas híbrido-somáticas (Douglas et al., 1981b; Dudits et al., 1980a; Gleba et al., 1978; Evans et al., 1983). El patrón y la tasa de segregación cromosómicos y el grado de estabilidad genética son diferentes en diversas líneas híbridas. Mayor estabilidad cromosómica se ha encontrado en *N. tabacum* x soya (Chien, 1982) que en los híbridos de *N. glauca* x soya (Kao, 1977).

Diferentes líneas de células híbridas podrían seleccionarse dentro de un experimento, cada una con diferente tasa de segregación. En los híbridos celulares de *N. chinensis* x *A. belladonna*, las células de la mayoría de las líneas conservaron los cromosomas de ambos progenitores, mientras que en tres líneas fueron eliminados casi todos los cromosomas de *A. belladonna* (Gleba et al., 1983). La inestabilidad genética observada generalmente en las células de plantas cultivadas puede conducir a la variabilidad cromosómica y a la segregación de características de los progenitores en los híbridos somáticos intraespecíficos (Bayliss, 1980).

Se ha observado recombinación cromosómica en varios híbridos somáticos. Además de la segregación cromosómica, el reordenamiento cromosómico puede ser responsable de la variabilidad observada (Evans et al., 1981; Evans et al., 1983; Hoffmann et al., 1981). Las fusiones entre los protoplastos en división, los mitóticamente inactivos o los irradiados con rayos X, conduce a la rápida y extensiva eliminación de los cromosomas de los progenitores de división inactiva.

En los híbridos somáticos de *Aegopodium* x *Daucus*, los marcadores bioquímicos y morfológicos indicaron la presencia de genes de *Aegopodium*; en cambio, sólo se encontraron cromosomas de *Daucus* en las plantas regeneradas. Se ha sugerido que una condensación cromosómica prematura podría ser la causa de la pérdida repentina de los cromosomas de un progenitor (Dudits et al., 1979; Dudits et al., 1980b; Dudits et al., 1982).

En los híbridos de *Petroselinum* x *Daucus*, la mayor parte de los cromosomas de *Petroselinum* fueron eliminados mediante la irradiación de sus protoplastos antes de la fusión. Sin embargo, las características morfológicas y las isoenzimas confirmaron la presencia de genes de *Petroselinum* en dichos híbridos (Dudits et al., 1980b). En un experimento similar, Gupta et al. (1982) describieron la transferencia de fragmentos del genoma de los protoplastos irradiados de *Physalis minima* y *Datura innoxia* a la línea cnx-68 de *N. tabacum*. La fusión de protoplastos, seguida por la eliminación y la recombinación cromosómicas, puede llevar a la transferencia de unidades de material genético, más pequeñas que los cromosomas completos.

El análisis de la endonucleasa de restricción del genoma nuclear sirve también como un método sensitivo para caracterizar los híbridos somáticos. Uchimiya et al. (1983) utilizaron los genes ribosomo-nucleares del ARN para identificar las líneas celulares híbrido-somáticas de *N. glauca* y *N. langsdorfii*.

## Regeneración de plantas y problemas de incompatibilidad

Generalmente, la regeneración de plantas es fácil cuando se producen híbridos somáticos intraespecíficos o interespecíficos. La regeneración de las plantas híbrido-somáticas es difícil cuando la distancia filogenética entre los progenitores de fusión es grande. Parece que se presenta una interacción entre la diferenciación celular y las reacciones incompatibles; la fusión de protoplastos puede producir líneas celulares híbridas, pero no

se observa una respuesta morfogénica en las combinaciones interfamiliares (Kao, 1977; Chien et al., 1982).

Las plantas híbrido-somáticas de diferentes géneros podrían regenerarse si se obtiene una reducción significativa en el tamaño de uno de los genomas parentales, introducido en los híbridos (Krumbiegel et al., 1979; Gleba et al., 1978; Dudits et al., 1980a). La regeneración de plantas híbrido-somáticas interespecíficas (Cuadro 34.1, Figura 34.3, D) e intergenéricas ha sido posible en varios casos (Cuadros 34.2 y 34.3).

## Fusión de protoplastos y genética citoplásmica

En la hibridación sexual de casi todas las plantas superiores hay transmisión materna de las características citoplasmáticamente codificadas. Esto significa que la recombinación no tiene lugar; por tanto, no se puede efectuar, mediante cruzamientos sexuales, un análisis genético de los genes de los cloroplastos y de las mitocondrias. La transmisión biparental de estos orgánulos se ha logrado mediante la fusión de protoplastos.

La hibridación somática de *N. glauca* x *N. langsdorfii* mostró, en el citoplasma híbrido, la exclusión completa de los cloroplastos de un progenitor (Kung et al., 1975). El análisis de los marcadores de cloroplastos

Cuadro 34.1. Obtención de híbridos somáticos interespecíficos.

Progenitores	Resultado <sup>a</sup>	Referencias
<i>Datura innoxia</i> + <i>D. stramonium</i>	P1	Schieder, 1980
<i>Datura innoxia</i> + <i>D. discolor</i>	P1	Schieder, 1980
<i>Daucus carota</i> + <i>D. capillifolius</i>	P1	Dudits et al., 1977; Kameya et al., 1981
<i>Medicago sativa</i> + <i>M. falcata</i>	P1	Teoulé, 1983
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. nesophyla</i>	P1	Evans et al., 1982
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. rustica</i>	P1	Douglas et al., 1981b
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>N. langsdorfii</i>	P1	Uchimiya et al., 1983; Kung et al., 1975
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. knightiana</i>	P1	Menczel et al., 1981
<i>Nicotiana knightiana</i> + <i>N. silvestris</i>	P1	Menczel et al., 1978
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. glutinosa</i>	P1	Horn et al., 1983; Uchimiya et al., 1983
<i>Nicotiana stocktonii</i> + <i>N. tabacum</i>	P1	Evans et al., 1981
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>N. tabacum</i>	P1	Evans et al., 1980
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. otophora</i>	P1	Evans et al., 1983
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. sylvestris</i>	P1	Evans et al., 1982
<i>Petunia hybrida</i> + <i>P. parodii</i>	P1	Power et al., 1976; Boeshore et al., 1983
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>N. brevídens</i>	P1	Barsby et al., 1984
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>S. nigrum</i>	P1	Binding et al., 1982

a) P1 = regeneración de plantas.

Cuadro 34.2. Obtención de híbridos somáticos intergenéricos.

Progenitores	Resultados <sup>a</sup>	Referencias
<i>Daucus carota</i> + <i>Petroselinum hortense</i>	P1	Dudits et al., 1980b
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Solanum tuberosum</i>	P1	Melchers et al., 1978
<i>Datura innoxia</i> + <i>Atropa belladonna</i>	P1	Krumbiegel et al., 1979
<i>Daucus carota</i> + <i>Aegopodium podagraria</i>	P1	Dudits et al., 1979
<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>Brassica campestris</i>	P1	Gleba et al., 1979
<i>Atropa belladonna</i> + <i>Nicotiana chinensis</i>	P1	Gleba et al., 1982
<i>Hyosclamus muticus</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	P1	Potrykus et al., 1984
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>Glycine max</i>	C	Kao, 1977
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Glycine max</i>	C	Chien et al., 1982
<i>Physalis minima</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	C	Gupta et al., 1982
<i>Datura innoxia</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	C	Gupta et al., 1982
<i>Daucus carota</i> + <i>Angelica archangelica</i>	C	Dudits et al., 1980b
<i>Daucus carota</i> + <i>Pisum sativum</i>	C	Dudits et al., 1980b
<i>Daucus carota</i> + <i>Secale cereale</i>	C	Dudits et al., 1980b
<i>Glycine max</i> + <i>Vicia hajastana</i>	C	Constabel et al., 1977

a. P1 = regeneración de plantas; C = callos.

—por ejemplo, la resistencia a la estreptomina citoplásmica, un patrón de subunidad mayor de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa, un patrón de la endonucleasa de restricción del ADN del plástido, la resistencia a la tentoxina, y la resistencia a la atrazina— en los diferentes híbridos somáticos ha confirmado la segregación de los cloroplastos. Este resultado conduce a la producción de células con uno u otro tipo de cloroplastos (Pelletier et al., 1983; Menzel et al., 1981; Belliard et al., 1978; Glimelius et al., 1981). Los experimentos de Akada et al. (1983) han mostrado que el

Cuadro 34.3. Obtención de 'cíbridos'.

Progenitores	Resultados <sup>a</sup>	Referencias
<i>Brassica napus</i> x <i>Raphanus sativus</i>	PI	Pelletier et al., 1983
<i>Brassica campestris</i> x <i>Raphanus sativus</i>	PI	Pelletier et al., 1983
<i>Nicotiana tabacum</i> ( <i>N. suaveolens</i> , citoplasma: ECM) x <i>N. silvestris</i>	PI	Zelcer et al., 1978; Fluhr et al., 1983.
<i>Nicotiana tabacum</i> (Str. <sup>R</sup> ) x <i>N. silvestris</i>	PI	Medgyesy et al., 1980
<i>Nicotiana tabacum</i> ( <i>N. megalosyphon</i> , citoplasma: Str. <sup>R</sup> , ECM) x <i>N. plumbaginifolia</i>	PI	Menczel et al., 1983
<i>Nicotiana tabacum</i> (mutante plastoma) x <i>N. plumbaginifolia</i>	PI	Sidorov et al., 1981b
<i>Nicotiana tabacum</i> (fertilidad masculina) x <i>N. silvestris</i>	PI	Aviv et al., 1980
<i>Nicotiana tabacum</i> (fotoautotrofia) x <i>N. tabacum</i>		Glimelius et al., 1981
<i>Nicotiana tabacum</i> (Str. <sup>R</sup> ) x <i>N. tabacum</i> (ECM)	PI	Fluhr et al., 1983

a. PI = regeneración de plantas. ECM = esterilidad citoplásmica masculina.  
Str.<sup>R</sup> = 'strain' R (raza o cepa R).

callo híbrido es un mosaico de células que contienen, en diferentes proporciones, dos tipos de genomas de cloroplastos. Este hecho indica la segregación temprana de los diferentes cloroplastos. Las plantas que contienen mezclas de cloroplastos sólo se han regenerado en unos pocos híbridos (Glimelius et al., 1981; Fluhr et al., 1983). En los experimentos de hibridación somática no se observó recombinación entre los genomas de los cloroplastos (Menczel et al., 1981; Galun, 1982).

En los híbridos somáticos, las mitocondrias presentan una selección independiente de los cloroplastos (Glimelius et al., 1981; Fluhr et al., 1983; Galun, 1982; Galun et al., 1982). La recombinación entre los diferentes genomas de las mitocondrias también puede lograrse. En los híbridos somáticos, según se ha indicado, los patrones de restricción del mtADN fueron similares, pero no idénticos, a uno u otro de los patrones de los progenitores, y contenían también nuevos fragmentos. Se ha sugerido que

la recombinación del ADN produjo los nuevos patrones de restricción (Belliard et al., 1979; Nagy et al., 1981).

Se encontró una correlación entre los genomas de las mitocondrias y la esterilidad citoplásmica masculina (ECM) en las progenies híbridas de *Nicotiana* (Galun et al., 1982; Belliard et al., 1979). No se encontró una clara correlación entre el patrón de restricción del mtADN y la ECM en algunos híbridos somáticos de *Petunia* sp. (Izhar et al., 1983; Boeshore et al., 1983). Tal vez la naturaleza de la ECM en *Petunia* difiere de la ECM del tabaco. El estudio de la transmisión de la esterilidad masculina mediante hibridación somática mostró que la heterogeneidad de las mitocondrias en las plantas híbridas regeneradas se puede mantener en *Petunia* y *Nicotiana* (Izhar et al., 1980; Izhar et al., 1983; Menczel et al., 1983).

Se ha descrito un sistema donante-receptor para la transferencia de las características citoplásmicas. Se fusionaron protoplastos de tabaco portadores de ECM —inactivados e irradiados con rayos X (donante: *N. tabacum* con ECM recibida de *N. suaveolens*)— con protoplastos de plantas fértiles de *N. silvestris* (receptor). De los productos de esta fusión se regeneraron plantas estériles masculinas de *N. silvestris* (Zelcer et al., 1978). El sistema donante-receptor ha sido utilizado para transferir las mitocondrias de *N. tabacum* a *N. silvestris* (Aviv et al., 1980), las de *N. tabacum* a *N. plumbaginifolia* (Menczel et al., 1983), los cloroplastos de *N. tabacum* a *N. plumbaginifolia* (Sidorov et al., 1981b), y los de *N. tabacum* a *N. silvestris* (Fluhr et al., 1983).

El comportamiento independiente del genoma de los cloroplastos y de las mitocondrias permite la combinación de diferentes características citoplásmicas, codificadas ya sea en el mtADN o en el chlADN, mediante la fusión de protoplastos. Pelletier et al. (1983) describieron la corrección de una deficiencia de los cloroplastos de *Brassica napus* y una transferencia de la característica ECM de *Raphanus sativus*. En otro experimento describieron la combinación de la característica ECM de *R. sativus* y de los cloroplastos resistentes a la atrazina de *B. campestris* con el núcleo de una tercera especie, *B. napus*.

Otro método de transferir los orgánulos citoplásmicos es la fusión de citoplastos (protoplastos enucleados) con protoplastos. La centrifugación de protoplastos a alta velocidad en presencia de citocalasina B (Wallin et al., 1978) o la centrifugación a alta velocidad en los gradientes de densidad iso-osmótica de Percoll (Lorz et al., 1981) fragmenta los protoplastos y conduce a la formación de citoplastos (protoplastos enucleados) y cario-plastos (núcleos cubiertos sólo por una membrana plasmática). Los citoplastos así preparados son aptos para la transferencia de orgánulos después de la fusión con los protoplastos (Maliga et al., 1982b).