

**Mejoramiento biotecnológico
de plantas y modificación
genética**

. Juan Morales M.
Viviana Chiluisa-Utreras

**Mejoramiento biotecnológico
de plantas y modificación
genética**

© . Mg. Sc. Juan Morales; M. Biol. Viviana Chiluisa-Utreras.
Gerente General GENNBIO, Quito, Ecuador; Grupo BIOARN-
Universidad Politécnica Salesiana; Quito, Ecuador.

Título del libro

Mejoramiento biotecnológico de plantas y modificación genética

ISBN: 978-9942-33-536-4

Publicado 2022 por acuerdo con los autores.

© 2022, Editorial Grupo Compás, Gennbio

Guayaquil-Ecuador

Cita.

Morales, J., Chiluisa-Utreras, V. (2022) Mejoramiento biotecnológico de plantas y modificación genética. Editorial Grupo Compás.

Grupo Compás apoya la protección del copyright, cada uno de sus textos han sido sometido a un proceso de evaluación por pares externos con base en la normativa del editorial.

El copyright estimula la creatividad, defiende la diversidad en el ámbito de las ideas y el conocimiento, promueve la libre expresión y favorece una cultura viva. Quedan rigurosamente prohibidas, bajo las sanciones en las leyes, la producción o almacenamiento total o parcial de la presente publicación, incluyendo el diseño de la portada, así como la transmisión de la misma por cualquiera de sus medios, tanto si es electrónico, como químico, mecánico, óptico, de grabación o bien de fotocopia, sin la autorización de los titulares del copyright.

   @grupocompas.ec
compasacademico@icloud.com


Grupo de capacitación e investigación pedagógica

GENNBIO
Breeding Genetics Biotechnology

Agradecimientos

La Biotecnología es una aplicación apasionante y sus avances en la actualidad no serían posible, sin el aporte de mentes jóvenes y brillantes, como la del autor principal de esta obra: Juan Morales Segovia.

También agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana por el apoyo y financiamiento para la publicación de este libro y otros artículos relevantes, que aportan con un granito de arena, en el fascinante mundo de la ciencia.

Viviana Chiluisa-Utreras

Quito, febrero 2022

Índice

Índice.....	10
Prefacio	15
MEJORAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE PLANTAS Y MODIFICACIÓN GENÉTICA	17
INTRODUCCIÓN	17
Domesticación de plantas cultivadas	19
Centros de origen (según de Candolle).....	22
Centros de origen (según Vavilov)	23
3 Centros y no centros de origen	29
Centros nucleares, regiones de diversificación y centros menores	32
Centros de origen de plantas cultivadas en el siglo presente	34
Cambios evolutivos durante la domesticación	36
Acervo génico	37
Sistema del acervo génico.....	39
Breve introducción a la biología molecular clásica ..	41
Genética molecular y centros de origen	60
Selección de plantas usando marcadores moleculares	62
Referencias bibliográficas	63
CONSERVACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LAS PLANTAS... 73	
Generalidades acerca de la conservación de recursos fitogenéticos	75
Estrategias para la conservación de germoplasma... 76	
Conservación <i>in situ</i>	77

Proyectos multidisciplinarios.....	79
Dificultades técnicas	82
Conservación <i>ex situ</i>	83
Bancos de germoplasma	83
Centros con especies	92
Conservación <i>in vitro</i>	92
Criopreservación.....	92
Propósitos de la conservación <i>ex situ</i>	95
Erosión genética.....	96
Referencias bibliográficas	98
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	104
Constituyentes del medio de cultivo.....	106
Carbono	108
Sales minerales.....	108
Vitaminas	111
Fitorreguladores.....	112
Auxinas	113
Citocininas	115
Giberelinas.....	116
Ácido abscísico	117
Etileno.....	117
Agente gelificante	118
Otros compuestos	118
pH del medio.....	118
Explantos, organogénesis y embriogénesis	119
Esterilización de explantos	121

Contaminación de cultivos.....	123
Aplicación de técnicas de cultivo <i>in vitro</i>	126
Cultivo de meristemos.....	126
Cultivo de anteras.....	127
Fusión de protoplastos.....	128
Polinización	131
Inducción de mutaciones.....	133
Variación somaclonal	133
Propagación <i>in vitro</i>	135
Referencias bibliográficas	137
EXPRESIÓN GÉNICA Y TRANSCRIPTOS DE INTERÉS	
AGROINDUSTRIAL.....	146
Aplicación de técnicas moleculares	149
Generalidades acerca de oligonucleótidos.....	150
Extracción de ARN	152
Síntesis de ADN complementario con transcriptasa inversa.....	153
Transcripción inversa seguido de PCR semicuantitativa (RT-PCR) y transcripción inversa seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR)	154
Electroforesis	157
Cuantificación absoluta.....	160
Análisis comparativos.....	168
Referencias bibliográficas	169
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA Y DESARROLLO DE	
CULTIVARES MODERNOS	180
Generalidades acerca de la transformación genética	181

Mecanismos de transformación genética.....	184
Mecanismos biológicos	184
Mecanismos físicos.....	185
Plantas y bacterias como organismos modelo	186
Genes marcadores de selección	188
Clonamiento de ADN.....	189
Transformación genética vegetal.....	192
Transformación plastidial	203
Eliminación de genes marcadores de selección	204
Sistema Cre/lox	205
Transformación genética intra (intragénesis) e inter (cisgénesis) especies	207
Consideraciones acerca de la transformación genética	211
Referencias bibliográficas	211
BIOINFORMÁTICA EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS.....	225
Generalidades acerca de la bioinformática.....	225
Bioinformática, biología computacional y biocomputación.....	226
Bioinformática o biología molecular computacional	226
Biología computacional.....	227
Biocomputación	227
Aplicación de técnicas computacionales	227
Conceptos GO	228
Formato FASTA	229
Secuencias de ADN.....	229

Bases de datos o repositorios	230
NCBI.....	231
UniProt/SWISS-PROT.....	231
KEGG	233
Homología de secuencias en internet	235
Supuesto de partida	235
Determinación.....	236
Búsqueda de homología.....	237
Consideraciones acerca de la bioinformática.....	238
Referencias bibliográficas	238

Prefacio

El conocimiento, la creatividad y la innovación tecnológica de las ciencias agrarias son fundamentales en el desarrollo cultural y económico de las naciones, permiten al hombre la obtención de resultados y experiencias que idealmente se plasman como producto de la investigación científica. Tal como lo dijo el visionario de la estructura molecular del ADN Francis Crick, «Una de las características más sorprendentes de la ciencia moderna es que suele avanzar con tal rapidez que un investigador puede comprobar, con cierta aproximación si sus ideas anteriores, o las de sus contemporáneos, eran correctas o incorrectas. En el pasado esta posibilidad no se daba con tanta frecuencia. Ni tampoco actualmente en los campos que avanzan con lentitud».

“Mejoramiento Biotecnológico de Plantas y Modificación Genética” es una obra sobre el fitomejoramiento actual de los cultivos, en la cual se presenta una conjugación inédita de seis temas secuenciales relevantes (Introducción, Conservación y utilización de las plantas, Cultivo de tejidos vegetales, Expresión génica y transcritos de interés agroindustrial, Transformación genética y desarrollo de cultivares modernos, y Bioinformática en el mejoramiento genético de plantas) con un enfoque fundamentalmente

teórico y aplicativo en su totalidad, que aborda aspectos de la ciencia y tecnología contemporáneas con un lenguaje atractivo y preciso que pretende servir de guía o reforzamiento en el desarrollo de asignaturas afines. El esfuerzo realizado responde a la necesidad de contar con una obra científica de enseñanza-aprendizaje en lengua española; la organización y profundidad de su contenido es el producto de la investigación y la enseñanza universitaria; se ha procurado concentrar en un solo ejemplar una selecta información temática que se encuentra diseminada globalmente, señalando fuentes originales, muchas de las cuales constituyen verdaderos clásicos para sustentar el contenido de esta obra.

El desarrollo de la biotecnología y la información hace que se oferten nuevas tecnologías tal como se exponen en esta publicación, esperando que sea de utilidad para el reforzamiento de los cursos de grado y posgrado: Fitomejoramiento, Genética Molecular y Biotecnología Vegetal; y para toda persona interesada en los avances vanguardistas de la investigación científica en referencia al mejoramiento genético de los cultivos.

Juan Morales
Quito, febrero 2022

MEJORAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE PLANTAS Y MODIFICACIÓN GENÉTICA

INTRODUCCIÓN

La riqueza biológica de los países del tercer mundo aporta el 91.1% del germoplasma al Banco Internacional de Recursos Genéticos de Plantas, siendo el 23% proveniente de Latinoamérica (Bravo 1991), esto explica el gran aporte de los países andinos para la alimentación y la agricultura (INIAP 2003).

La configuración climatológica y orográfica destacable del Ecuador, repercute en la disposición de una amplia gama de recursos en las cuatro regiones naturales (Costa, Sierra, Oriente y el Archipiélago de Galápagos); las condiciones ambientales generan una impresionante diversidad de hábitats y tipos de vegetación, es así que la flora comprende casi 25000 especies de plantas vasculares, con un endemismo estimado del 32.25% (INIAP 2008).

Las características oceanográficas y continentales complejas y heterogéneas del Perú, dan lugar a tres regiones naturales (Costa, Sierra y Selva), 84 zonas de vida y 17 zonas transicionales, con influencia de factores geográficos como la cordillera de los Andes, corrientes marinas, ciclones etc.; presenta una gran diversidad biológica, con más del 70% de la biodiversidad del planeta; se estiman unas 25000 especies en cuanto a flora se refiere, y un 30% de endemismo (MINAM 2014).

La gran variedad de ambientes altitudinales y ecológicos en las diversas regiones de los países andinos generan una flora extremadamente diversa, debido al ecosistema tropical húmedo y el efecto de la cordillera de los Andes, que crean pisos altitudinales que dan lugar a los distintos climas, microclimas, sistemas ecológicos y formaciones vegetales. Sin embargo, se deberán considerar los impactos más importantes previstos en la agricultura como son el incremento en la temperatura global, riesgo de pérdida de la biodiversidad, salinización y desertificación de tierras agrícolas, etc., y proponer soluciones biotecnológicas capaces de garantizar la seguridad alimentaria de las naciones.

Las especies nativas comestibles son fundamentales para la seguridad alimentaria de los países andinos y del mundo entero, debido a que son recursos fitogenéticos de gran potencial por su valor nutricional, medicinal y económico.

Por ejemplo, el género *Solanum* L. al cual pertenecen unas 1500 especies, uno de los más grandes entre plantas con flores (Frodin 2004), incluye a especies cultivadas tales como tomate (*S. lycopersicum* L.), papa (*S. tuberosum* L.), y otras de importancia en Suramérica, tales como pepino (*S. muricatum* Aiton) y naranjilla (*S. quitoense* Lam.) (Särkinen *et al.* 2015).

La colección de germoplasma permite obtener bases para iniciar programas de manejo y conservación *in situ* y *ex situ*, con propósitos de generar alimento para las comunidades; también ayuda a explotar su uso en programas de mejoramiento biotecnológico de plantas, conservación y producción, los cuales contribuyen a incrementar la economía de los agricultores; y además fomentan el progreso de la agroindustria y la agroexportación.

Domesticación de plantas cultivadas

Los investigadores Alexander von Humboldt y Alfonso de Candolle en el siglo XIX hacen referencia pionera al origen de las especies domesticadas; desde entonces el tema es muy debatido por la comunidad científica internacional. Hace unos 11000 años los hábitos humanos empezaron a cambiar para conseguir alimento (Harlan 1975); el hombre pasa de ser cazador-cosechador a productor, aparece la agricultura y el hombre se convierte en sedentario, luego la

producción de alimentos se torna más eficiente, surgen aldeas o pueblos, a través del tiempo se forman ciudades y comienza la civilización, cuya producción de alimentos permitió al hombre tener más tiempo para desarrollar las artes y la ciencia (Vallejo y Estrada 2002).

Los procesos evolutivos y años de evidencias indican que la agricultura se originó en diferentes partes del mundo; primero en el Oriente Medio, en las regiones montañosas y semiáridas próximas a la Mesopotamia, particularmente en la zona nombrada Creciente Fértil, en las cuencas de los ríos Tigris y Éufrates, en el actual Irak, parte de Turquía, Siria e Irán, donde la domesticación de trigo y cebada se inició hace aproximadamente 11000 años (Harlan 1975; Hawkes 1983); continuando, posiblemente en el Viejo Mundo, donde se considera que la agricultura se originó independientemente, unos 2000 años después que en el Oriente Medio, en China entre los ríos Yang-Tse-Kiang y Hoang-Ho, India y el Sureste Asiático, la Franja Subsahariana de África y Etiopía (Harlan 1975; Hawkes 1983; Vavilov 1992); y en el Nuevo Mundo, en el continente americano la antigüedad de la agricultura es cercana a 9000 años para Mesoamérica y la región andina (MacNeish 1967, 1992; Flannery 1986), con orígenes en México y posteriormente en Perú (Vallejo y Estrada 2002); recientemente, el noreste de los Estados Unidos y la Amazonía se proponen como importantes centros de

domesticación (Smith 1998; 2001), pero debido a que los restos arqueobotánicos son más recientes que los de Mesoamérica y la Región Andina (MacNeish 1992), se debate si su origen es independiente o resultado de la difusión de experiencias técnicas de los agricultores desde áreas más antiguas. Estudios sobre procesos de domesticación contemporáneos indican que a miles de años de iniciar la domesticación de algunos organismos, aún hoy en día continúan originándose dichos procesos en diversas regiones del mundo.

La domesticación es un proceso continuo de intervención selectiva del hombre en la evolución de las especies, que integra plantas, medio ambiente y hombre; atraviesa por estado silvestre, domesticación inicial, variedad primitiva y variedad mejorada. Por su parte, el efecto fundador es un proceso por el cual la diversidad genética de una especie cultivada es muy estrecha, debido a que durante la domesticación se ha utilizado una porción pequeña de la diversidad total (Sevilla y Holle 2004).

El enlace de estudios arqueológicos y datos del pasado, con información etnográfica y etnobiológica, que permiten la documentación de procesos actuales, así como los de genética molecular, que permiten el establecimiento de puentes entre pasado y presente, ayudan a un mayor entendimiento de la domesticación en distintas

dimensiones temporales (Casas *et al.* 2015; Aguirre y González 2016).

Centros de origen (según de Candolle)

Alphonse de Candolle (1806-1893) fue uno de los primeros investigadores que se interesó por el estudio de los centros de origen de la agricultura y la dispersión de los cultivos, basándose en variabilidad y datos históricos. El origen de las plantas cultivadas (1882), y asignación de criterios que definen el centro de origen de las especies (1886), en los que prevalecen los criterios arqueológicos, históricos, lingüísticos y botánicos: morfológicos, citológicos, diversidad (número de géneros, familias, especies) (Sevilla y Holle 2004), son las bases teóricas para analizar las áreas de origen de la domesticación, la distribución de los cultivos y la de sus parientes silvestres. Según de Candolle se propone la existencia de tres centros importantes de origen de plantas cultivadas: (A) China, (B) el suroeste de Asia, incluyendo Egipto, y (C) América Tropical; y menciona que las regiones de China y América Tropical son centros claramente independientes entre sí, con una larga historia agrícola, mucho antes de que sus cultivos fueran conocidos en Europa desde el suroeste de Asia (Parra y Casas 2016).

Centros de origen (según Vavilov)

Nicolás Vavilov (1887-1943) en la teoría del origen de las plantas cultivadas (1926), propone el método diferencial botánico geográfico que define los centros de origen si presentan la mayor variabilidad de la especie, presentan especies silvestres relacionadas, existe endemismo de la especie, presentan parásitos especializados, existe una cultura agrícola antigua, presentan zonas de montaña o si existe mayor frecuencia de genes dominantes.

Vavilov recorrió gran parte del mundo colectando especies cultivadas (razas primitivas), al analizar su variabilidad morfológica concluye que ésta no está distribuida al azar, sino que se concentra en ciertas regiones; entre 1923 y 1939 determina que la región de los Andes Centrales (sur de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia) constituye uno de los cinco principales centros de domesticación de plantas alimenticias en el mundo, asignándole 45 especies nativas económicamente útiles (Tapia y Fries 2007); considera el área geográfica con la mayor diversidad de especies como probable centro de domesticación u origen (Vavilov 1951). Existe diferencias entre centro de origen y centro de diversidad (Vallejo y Estrada 2002).

Zohary (1970) plantea que un centro de alta diversidad no es necesariamente un centro de origen de plantas cultivadas como lo menciona Vavilov (1926, 1951, 1992); más bien propone que el centro de origen corresponde al lugar donde se origina la domesticación (centros primarios de Vavilov) de una especie, y que requiere diversas fuentes de evidencias; el centro de domesticación u origen es la región o zona geográfica en que se origina un cultivo, el sitio donde la planta silvestre se domestica por el hombre y luego se dispersa; es un hecho histórico.

Mientras que, el centro de diversidad es más directamente comprobable (centros secundarios de Vavilov), puede ser un área de alta diversificación que a su vez puede ser o no el sitio de origen de la domesticación de una especie; el centro de diversidad se relaciona con la región o zona ecogeográfica que presenta gran variación o diversidad genética de la especie; es un hecho biológico. Hay dos tipos de centros de diversidad:

- Centro de diversidad primaria: además de la especie de interés económico, social o cultural presenta especies silvestres relacionadas con características primitivas y alta frecuencia de caracteres dominantes.

- Centro de diversidad secundaria: presenta pocas especies silvestres relacionadas, bajos niveles de

variación genética, y alta frecuencia de caracteres recesivos.

Se considera útil retomar lo propuesto por de Candolle (1882), en tal sentido que la identificación de parientes silvestres de los cultivos y su distribución es crucial para inferir en la ubicación de un centro de origen, y enfatiza que esa información debe respaldarse en estudios arqueológicos (Zohary 1970); más aún, se propone la identificación de sitios en los cuales coexisten cultivos y sus ancestros silvestres, para analizar la probable existencia de procesos de hibridación, ya que se considera que estos procesos son fundamentales en el surgimiento de plantas domesticadas.

Así, se revela la complejidad para la identificación de un lugar de origen, y parece ser más apropiado el termino origen difuso planteado por Harlan (1956, 1961), pues las hibridaciones que dan origen a algunos cultivos pueden resultar de la fusión de genomas de múltiples fuentes, múltiples ancestros. No obstante, Vavilov (1951) determina ocho centros de domesticación u origen primario (Centro de diversidad primaria) (Figura 1.1):

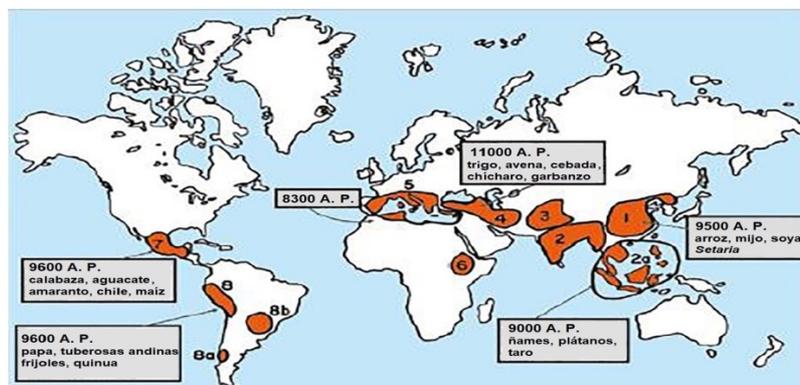


Figura 1.1. Los centros de origen propuestos por N. Vavilov (modificado de Vavilov, 1992). Se incluye información de algunas especies domesticadas más representativas en el área y las estimaciones de la antigüedad de los restos más tempranos de domesticación sistematizados en el trabajo de MacNeish (1992).

Fuente: Parra y Casas (2016)

A) China

Centro de domesticación considerado más antiguo y rico en número de especies (140 especies diferentes), destacan cereales como arroz y mijo, legumbres como soya, especies de bambú, rábano, especies de *Brassica*, *Allium*, *Prunus*, *Pyrus* y *Citrus*.

Ba) India

En el Centro de la India (120 especies domesticadas) sobresalen sorgo, guandul, berenjena, pepino, mango, especies de citrus, caña de azúcar, coco, algodón, crotalaria y pimienta.

Bb) Indo-Malayo

Complementario a India Central, y que incluye todo el archipiélago Malayo y la Indochina (55 especies) es importante el banano, coco, caña de azúcar y pimienta, y cultivos particulares, como algunos tubérculos, principalmente *Dioscorea* spp., *Tacca*.

C) Asia Central

En la región central de Asia (alrededor de 40 especies) destaca el trigo, centeno, arveja, garbanzo, lino, algodón, zanahoria, cebolla de bulbo, ajo, pera, uva y melón.

D) Cercano Oriente

En Cercano Oriente (83 especies) sobresale nueve especies de *Triticum*, centeno, avena, alfalfa, remolacha, repollo, col, coliflor, lechuga, higo, especies de *Pyrus* y de *Prunus*.

E) Mediterráneo

En el centro Mediterráneo (84 especies) destaca la lenteja, remolacha, nabo, ajo, espárrago, especies de *Triticum* y especies productoras de aceite.

F) Etiopía (antes Abisinia)

Considerado como un refugio de cultivos procedentes de otras regiones (38 especies), destaca especies de *Triticum*, cebada, sorgo, vigna, haba, higuera y café.

G) México (Meso América)

Incluye las Antillas (50 especies), sobresale el maíz, frijol, especies de cucurbitáceas, batata, algodón, agave, papaya, aguacate, guayaba y cacao.

Ha) Andes Sudamericanos

Incluye áreas montañosas de Perú, Bolivia, y parte de Ecuador (45 especies), sobresale la papa, otras tuberosas, raíces, maíz, frijol, tomate, *Cucurbita maxima*, algodón, guayaba y drogas como tabaco, coca, quinina, otras.

Hb) Chile

En Chile (4 especies) la especie más importante es la papa *Solanum tuberosum*, derivada a partir de las solanáceas de los Andes.

Hc) Brasil-Paraguay

En la región Brasil-Paraguay (13 especies), destaca la yuca (*Manihot*), maní (*Arachis*), cacao (*Theobroma*), piña, maracuyá y cayu, de domesticación más reciente.

De la teoría vaviloniana original queda muy poco; solamente persiste la afirmación que los cultivos son más variables en algunos lugares que en otros; sin embargo, ha sido muy importante en la búsqueda y colecta de germoplasma para los diferentes cultivos (Vallejo y Estrada 2002).

3 Centros y no centros de origen

Harlan (1971) propone la integración de evidencias para obtener un alto nivel de confiabilidad; afirma que la agricultura se origina independientemente en tres áreas diferentes, y en cada área existe un sistema compuesto de un centro de origen y un no centro, cuyas actividades de domesticación se dispersan en radio de 5000 a 10000 kilómetros. La clasificación de las plantas según el origen de las especies (Harlan 1971), diferencia entre plantas endémicas (se encuentran solamente en sus centros de origen), semiendémicas (en su centro de origen y limitadamente en otras regiones), monocéntricas (en un único centro de origen), oligocéntricas (de amplia distribución y varios centros de diversificación), y no céntricas (de domesticación simultánea en varios centros) (Sevilla y Holle 2004).

El centro de origen es un área geográficamente estrecha, perfectamente localizada, documentada y fechada, donde el material vegetal salvaje se transforma en domesticado y dispersado por el hombre; los centros se sitúan en la zona templada, donde hay condiciones y necesidad para guardar o conservar semillas, y se encuentran bien documentados debido a la existencia de restos arqueológicos, en la misma latitud (México, Cercano Oriente y norte de China), presentan clima mediterráneo con vegetación rastrera,

periodos de sequía (6 a 8 meses); debido a la escasez de lluvias la cobertura vegetal no es densa y existe menor cantidad de enfermedades, malezas e incidencia de plagas. Los centros de origen son ecosistemas especializados de diversidad, producción primaria y equilibrio interno bajos, con presión de selección natural tipo 2 (planta de porte pequeño, ciclo corto y alto esfuerzo reproductivo); son regiones montañosas, con gran diversidad de microclimas y cierto aislamiento favorable para la creación de variabilidad genética (subpoblaciones locales) (Harlan 1971).

Mientras que, el no centro es un área geográficamente amplia, escasa en documentación y no fechada, donde ocurre alguna domesticación; los no centros se localizan en la región tropical, en lugares sin condiciones para conservar el material vegetal a causa de alta humedad y temperatura, siendo impedimento para que en ésta zona no haya sido posible encontrar restos arqueológicos vegetales (Harlan 1971).

Los centros de origen según Harlan (1971) no siempre corresponden al centro de máxima variabilidad, ahora es un patrón común que los centros de máxima variabilidad ocurran lejos del centro de origen; son los siguientes (Figura 1.2):

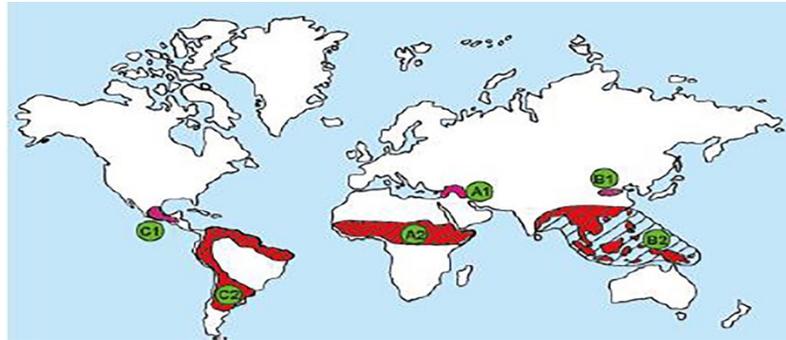


Figura 1.2. La propuesta de centros (áreas punteadas A1, B1 y C1) y no-centros (áreas con líneas A2, B2 y C2) de origen de la agricultura desarrollada por Harlan (1971). Modificado de Harlan (1975).

Fuente: Parra y Casas (2016)

A1) Centro del Cercano Oriente

Localizado entre Irán, sudeste de Turquía y sur de las tierras altas del Jordán (7000 a. de C.), y ampliamente documentado; se domestica el trigo, cebada, centeno, arveja, lenteja, corderos, cabras, cerdos y ganado.

A2) No centro de África

Ubicado al sur del Sahara y norte del Ecuador (aproximadamente 4000 a. de C.); la agricultura se origina en las sabanas (ecotones), donde los africanos domestican el sorgo, caupí, café, algodón, palma africana, otros.

B1) Centro del norte de China

Centro ligado a la civilización de Yan-Shao (4000 a. de C.), donde se domestica la soya, cítricos y algunas hortalizas.

B2) No centro del sudoeste de China

Aquí se origina la caña de azúcar y el banano.

C1) Centro de Meso América

Centro definido en tiempo y espacio donde la agricultura se origina y dispersa (aproximadamente 6000 a 4000 a. de C.); se domestica el maíz, zapallo, fríjol, amarantos, otros.

C2) No centro de Suramérica

En Suramérica, especialmente en Perú, la agricultura se origina después que la de México (3000 a. de C.); aunque Kaplan (1973) menciona que la agricultura peruana se origina al mismo tiempo o más temprano que la mexicana (6000 a. de C.); se domestica la papa, pimentón, tomate, frijol.

Entre los centros de origen parece no existir comunicación, solo es posible la existencia de ligamiento entre México y Suramérica; entonces se afirma que la domesticación es independiente en las tres áreas (A, B y C).

Centros nucleares, regiones de diversificación y centros menores

Hawkes (1983) contribuye a aclarar los términos en relación a los centros primarios y secundarios de origen de la domesticación propuestos por Vavilov; plantea que los

centros primarios son centros nucleares del origen de la agricultura y los secundarios son regiones de diversificación que se desarrollan después de difundirse la agricultura fuera del sitio núcleo. Hawkes (1983) basado en las propuestas de Vavilov, Harlan y otros autores, define a los centros nucleares como lugares donde inició la agricultura, y propuso a: (A) el norte de China (región de los loess al norte del río Amarillo, Hoang-Ho); B) el Cercano Oriente (Creciente Fértil); C) el sur de México y D) el centro y sur de Perú (los Andes, la región oriental de los Andes y la costa); el autor también destaca la importancia de obtener más datos arqueológicos para el preciso esclarecimiento de áreas de los centros nucleares.

Además, Hawkes (1983) sostiene que las regiones de diversidad, denominadas así por tener amplia distribución, son áreas donde las plantas domesticadas pueden haberse dispersado a partir de los centros nucleares, lo que motivó al surgimiento de nuevas variantes de especies como producto de la selección artificial; e incluye el término centros menores para aquellos donde se domestica uno o pocos cultivos más recientemente, probablemente producto de la difusión de técnicas de domesticación de regiones cercanas (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. *Centros nucleares y regiones de diversidad de plantas domesticadas.*

Centros nucleares	Regiones de diversidad	Centros menores
A. Norte de China	I. China II. India III. Sureste asiático	1. Japón 2. Nueva Guinea 3. Islas Solomon, Fidji, y Pacífico Sur 4. Noroccidente de Europa
B. Cercano Oriente	IV. Asia central V. Cercano oriente VI. Mediterráneo VII. Etiopía VIII. África occidental	
C. Sur de México	IX. Mesoamérica	5. Estados Unidos, Canadá 6. El caribe
D. Centro y sur de Perú	X. Andes del norte (Venezuela y Bolivia)	7. Sur de Chile 8. Brasil

Fuente: Parra y Casas (2016)

Centros de origen de plantas cultivadas en el siglo presente

En el siglo XXI se reconoce la existencia de por lo menos seis centros de origen de plantas cultivadas: Mesoamérica, los Andes en Sudamérica (incluyendo las áreas de piedemonte), el suroeste asiático (Creciente Fértil), África (Etiopía y el Sahel), el sur de China y el sudeste asiático (Gepts 2001), coincidiendo con Harlan (1975) y Hawkes (1983). Últimamente, se reconoce más de seis centros de domesticación que surgen independientes entre sí, de acuerdo con Doebley (2006); tales centros se identifican principalmente en base a evidencias arqueológicas, por lo cual aparecen como centros de origen relativamente nuevos las regiones centro oriental de Estados Unidos y Nueva Guinea, donde se habría domesticado girasol y plátano, respectivamente.

Además, se propone la existencia de una amplia diversidad de centros de domesticación, tratándose de regiones variables en su extensión geográfica, el número y diversidad de especies domesticadas localmente y su potencial relativo como fuente de alimentos para los sistemas de producción locales, regionales o mundiales, variando en ellas la velocidad del desarrollo económico basado en especies domesticadas y en la amplitud de expansión a regiones adyacentes (Smith 1998; Piperno y Pearsall 1998).

En el continente americano, tras una extensa revisión de sitios se han encontrado restos arqueológicos en las tierras bajas Neotropicales, que son parte de evidencias del origen independiente de la agricultura; los registros del origen de cultivos en Mesoamérica y Sudamérica datan de hasta más de 10000 años antes del presente, tal es el caso de *Cucurbita ecuadorensis*, o más de 9000 años para la domesticación de calabazo (*Lagenaria siceraria*) y del tubérculo lerén (*Calathea allouia*) en tierras y asentamientos de la cultura Las Vegas en Ecuador, así como más de 9000 años para cucurbitáceas en Siches, y el Valle de Zaña en el norte de Perú donde además se registra el surgimiento de cultivos como pallares (*Phaseolus lunatus*), maní (*Arachis hypogaea*), otros (Piperno 2011).

Cambios evolutivos durante la domesticación

Los cambios por evolución en plantas domesticadas se mencionan a continuación (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. *Cambios evolutivos en plantas cultivadas.*

Características	Plantas silvestres	Plantas domesticadas
Variabilidad en competencia con otras especies	Buena	Pobre
Rango de adaptación	Estrecho Intermedio	Amplio

Órganos de reserva	Medianos No muy suculentos	Grandes Suculentos
Variabilidad del órgano útil	Escasa	Mayor
Órganos protectores: Espinás Sabor amargo o venenoso Pubescencia	Presencia Presencia Presencia	Ausencia Ausencia Ausencia
Hábito de crecimiento	Perenne	Anual

Tabla 1.2. Continuación.

Reacción a patógenos	Resistentes Tolerantes	Susceptibles
Forma de reproducción	Alógamas	Autógamas
Germinación de la semilla	No sincronizada	Sincronizada y uniforme
Reproducción sexual en especies tuberíferas	Presente	Ausente Reducida
Dispersión de la semilla: Raquis de cereales Estolones en papa Vainas de maní Dehiscencia explosiva Poros para dispersión Arista en cereales	Quebradizo Largos Alejados de la planta Presencia Presencia Presencia	No quebradizo Cortos Próximos a la planta Ausencia Ausencia Ausencia

Fuente: adaptado de Vallejo y Estrada (2002), y Sevilla y Holle (2004)

Acervo génico

El acervo génico o *pool* génico se refiere al germoplasma total y el posible intercambio de genes; el acervo génico primario corresponde a especies que se cruzan libremente e intercambian genes; el secundario abarca a especies que intercambian genes con ciertas limitaciones, mediante introgresión por ejemplo; y el terciario contiene a especies cuya transferencia génica se realiza con métodos artificiales (Sevilla y Holle 2004).

La estructura del acervo génico es diferente según las especies, éstas forman parte de complejos híbridos que tienden a poseer amplias reservas génicas secundarias. En ocasiones se superan las barreras naturales que mantienen la identidad de las especies, pues los taxas emparentados constituyen una fuente adicional de variabilidad genética y un importante reservorio de genes útiles para el mejorador.

La hibridación interespecífica se utiliza para transferir resistencia o tolerancia a insectos y enfermedades o estrés ambiental, mejor calidad de semilla, otros; y requiere de mayor esfuerzo para el desarrollo de líneas con caracteres agronómicos aceptables. La fertilidad es más satisfactoria en híbridos de especies relacionadas estrechamente; ya que en cualquier generación después de las cruzas se observa un amplio rango de reacción en el crecimiento variando desde no germinación de semilla hasta plantas con floración

vigorosas y productivas. Un problema común es la presencia de genotipos desbalanceados (*hybrid breakdown*) con anormalidades, debido a falta de homología cromosómica y de arreglos cromosómicos o heterocigocidad de intercambios cromosómicos (Camarena *et al.* 2010).

Sistema del acervo génico

Harlan y de Wet (1971) proponen el término *pool* génico (PG) basado en el grado de aislamiento reproductivo entre poblaciones, para el establecimiento de relaciones entre especie cultivada y sus posibles ancestros, según el presente sistema categórico (Figura 1.3):

- *Pool* génico primario (PG-1), incluye todas las poblaciones o razas que se cruzan con la especie cultivada, produciendo híbridos fértiles, con buen apareamiento de los cromosomas y segregación génica normal.

- *Pool* génico secundario (PG-2), incluye todas las especies biológicas que pueden cruzarse con la especie cultivada; con flujo génico restringido.

- *Pool* génico terciario (PG-3), incluye especies que pueden cruzarse con la especie cultivada; híbridos letales, completamente estériles o anormales.

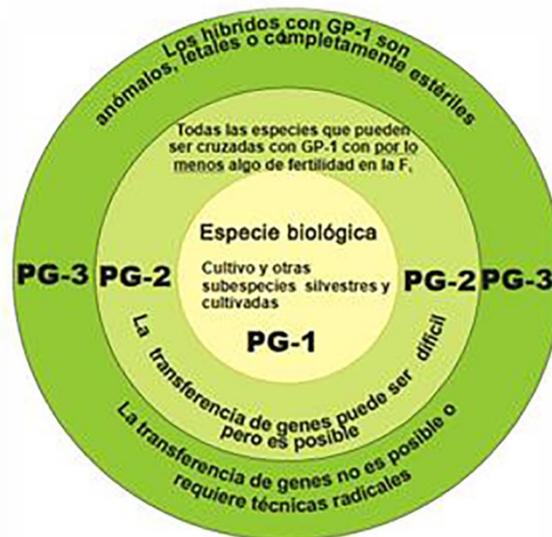


Figura 1.3. Sistema del acervo génico de los cultivos. *Pool* génico primario (PG-1), secundario (PG-2) y terciario (PG-3).

Fuente: Harlan (1971), modificado por Hammmer *et al.* (2003)

En el sistema del acervo génico de los cultivos (Figura 1.4) (Gepts 2000), adaptado de Harlan y de Wet (1971), se clasifica las relaciones de cruzabilidad entre cultivos y otros taxas según resultados experimentales de polinización cruzada; se menciona que el mayor riesgo de flujo génico ocurre con miembros del *pool* génico primario, menor riesgo con miembros del *pool* génico secundario, y sin riesgo con miembros de los acervos

génicos terciario y cuaternario. Los mejoradores de plantas pueden romper artificialmente barreras internas para permitir el flujo de genes con miembros del *pool* génico terciario y así lograr cruzas amplias; al *pool* génico cuaternario se accede mediante técnicas de ingeniería genética (Newstrom *et al.* 2003).

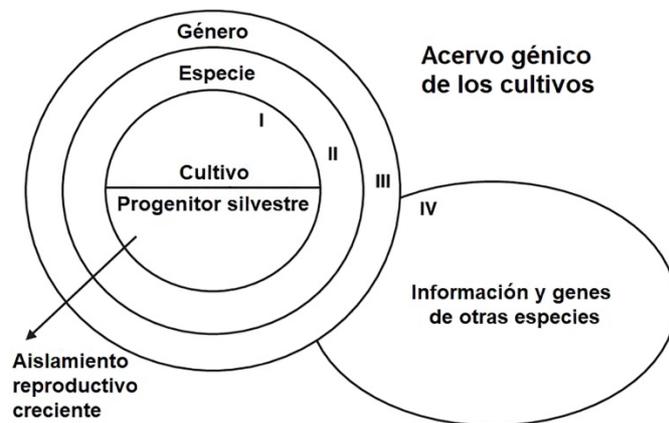


Figura 1.4. Acervo génico de los cultivos como fuentes de biodiversidad genética para propósitos de mejoramiento.

Fuente: Gepts (2000)

Breve introducción a la biología molecular clásica

La biología molecular es una herramienta poderosa, que puede acelerar la obtención de nuevos genotipos, más resistentes, con mayor calidad alimenticia y con altos rendimientos. Consecuentemente, ayudará en la reducción de plagas y enfermedades de cultivos, convirtiendo a la

agricultura en más productiva y eficiente (Camarena *et al.* 2014).

El material genético de todos los organismos naturales corresponde a ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico); las moléculas de ADN y ARN son largas y delgadas, a veces extremadamente largas. El ADN es un polímero con un esqueleto regular que tiene grupos alternados de fosfato y de azúcar (desoxirribosa); a cada grupo de azúcar se une una base, grupo molecular pequeño y plano; hay cuatro principales tipos de bases: A (adenina), G (guanina), T (timina) y C (citosina); A y G son purinas; T y C son pirimidinas. La información genética está determinada por el orden de las bases a lo largo de una secuencia específica de ADN. Erwin Chargaff descubrió que en el ADN de procedencias distintas, la cantidad de A es igual a la cantidad de T y la cantidad de G es igual a la cantidad de C; estas regularidades se conocen como reglas de Chargaff (Chargaff 1950; kresge *et al.* 2005). El ARN tiene la misma estructura que el ADN, excepto que el azúcar es un poco diferente (ribosa) y en lugar de T tiene U (uracilo); así, el par A=T se reemplaza por el par A=U, que es muy similar (Crick 1989).

El ADN se encuentra normalmente en forma de una doble hélice, con dos cadenas distintas enrolladas una alrededor de otra en un eje común, y que corren en direcciones

opuestas ($5' \rightarrow 3'$ corriente abajo en cadena codificante o con sentido y $5' \rightarrow 3'$ corriente arriba en cadena molde o antisentido) (Figura 1.5); si la secuencia de átomos en el esqueleto de una cadena corre hacia arriba, entonces la otra corre hacia abajo. Únicamente ciertos pares de bases son posibles: $T=A$, $A=T$, $G \equiv C$ y $C \equiv G$ (Crick 1989).

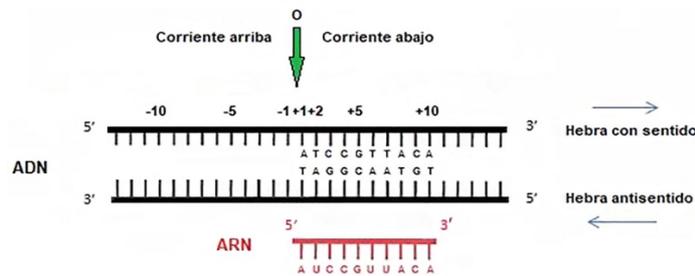


Figura 1.5. Un diagrama que ilustra el ADN bicatenario y el ARN monocatenario, y sus bases.

Fuente: readaptado de Belmonte (2018), sistematizado en Claros (2010)

Los pares de bases están unidos por enlaces débiles, enlaces o puentes de hidrógeno (Figura 1.6), el par $A=T$ forma dos enlaces de hidrógeno y el par $C \equiv G$ forma tres. Este apareamiento de las bases es la característica fundamental de la estructura.

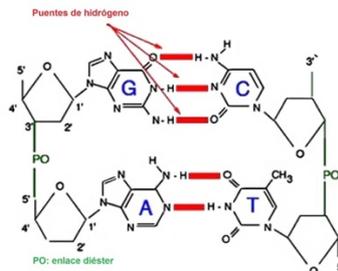


Figura 1.6. Pares de bases A=T y G≡C unidos por puentes de hidrógeno.

Fuente: PQBio (2020)

En la replicación del ADN, la célula deshace las cadenas y usa cada cadena simple como un molde o patrón para guiar la formación de una nueva cadena hermana. La cantidad de ADN que se puede sintetizar partiendo de un único origen de replicación se denomina replicón o unidad funcional de replicación. El genoma bacteriano es un replicón único circular. En organismos eucariontes hay varios replicones, la replicación del ADN se inicia en múltiples orígenes a la vez (hay uno cada 20 kb aproximadamente) (Watson *et al.* 2006).

En la célula ambas cadenas del ADN doble hélice se duplican al mismo tiempo. Principalmente, la enzima helicasa se encarga de separar las dos hebras del ADN mediante la rotura de los puentes de hidrógeno que se establecen entre las bases nitrogenadas. Las proteínas de unión a cadena sencilla SSB (*single-stranded DNA-binding proteins*) en procariontes y RPA (*replication protein A*) en eucariontes evitan la formación de puentes de hidrógeno

entre cadenas separadas por la helicasa y permiten que se copien. Las topoisomerasas son enzimas isomerasas que actúan sobre la topología del ADN, cortando o formando enlaces fosfodiéster en una de las hebras (topoisomerasa I) o en ambas (topoisomerasa II); la escisión selectiva libera la tensión contorsional del ADN, y se deshace el superenrollamiento, que en caso de persistir detendría la replicación. La enzima primasa sintetiza pequeños fragmentos de ARN de entre 8 y 10 nucleótidos de longitud, conocidos como cebadores o *primers*, complementarios a un fragmento del ADN, cuya unión al mismo proporciona un extremo 3' necesario para que la ADN polimerasa (ADNpol) lleve a cabo su actividad. La enzima RNasa H1 se encarga de degradar los cebadores de ARN que son sustituidos por ADN por acción de otra ADNpol durante la síntesis de los fragmentos de Okazaki, y de procesos de reparación del ADN. La ligasa cataliza la formación del enlace fosfodiéster entre nucleótidos contiguos (Floresvillar y Macías 2013).

La replicación es semiconservadora, se refiere a que en cada replicación una molécula de ADN recién sintetizada conserva una de las cadenas originales y la otra es sintetizada *de novo*. La replicación del ADN en eucariontes es bidireccional, a partir de sitios de origen (ORI), también llamados secuencias de replicación autónoma (ARS, *autonomous replicating sequences*), se sintetizan las dos

cadena en ambos sentidos, con dos puntos de crecimiento que forman horquillas de replicación (Floresvillar y Macías 2013).

De este modo, la replicación avanza con una estructura en forma de horquilla formándose una burbuja u ojo de replicación, en dirección a la región de ADN no duplicado dejando atrás los dos moldes de ADN de cadena simple donde se está produciendo la replicación. La replicación siempre se produce en sentido $5' \rightarrow 3'$, siendo el extremo $3'$ -OH libre el punto para el avance de la polimerasa y la elongación del ADN; solamente el carbono de la posición $3'$ de la pentosa posee un radical hidroxilo (OH) libre, con el que puede formar un nuevo enlace fosfodiéster con otro desoxirribonucleótido (dNTP) y así generar la hebra creciente de ADN; el proceso de polimerización consiste en la unión de un dNTP complementario a la hebra molde según las reglas de Chargaff. Hacia la década de 1960, Reiji Okazaki y Tsuneko Okazaki, descubrieron que una de las nuevas cadenas de ADN se sintetiza en forma de trozos cortos, denominados fragmentos de Okazaki cuya longitud suele variar entre 1000 y 2000 nucleótidos en bacterias y entre 100 y 400 nucleótidos en eucariontes (Watson *et al.* 2006).

La cadena que se sintetiza continuamente mediada por la ADNpol, en el mismo sentido que avanza la horquilla de replicación, es la hebra adelantada, líder o conductora

(*leading strand*); mientras que la cadena que se sintetiza discontinuamente y en sentido contrario, a la espera de que la horquilla de replicación avance para disponer de cierta longitud de ADN molde, es la hebra rezagada o retrasada (*lagging strand*) (Watson *et al.* 2006). La replicación del ADN es semiconservadora, bidireccional y discontinua.

Las ADN polimerasas (ADNpol) son enzimas clave en el proceso de replicación, sintetizan nuevas cadenas de ADN a partir de una hebra molde y las unidades estructurales correspondientes (dNTPs); la actividad polimerasa añade nucleótidos en dirección 5'→3' si hay un extremo 3' disponible, por tanto la dirección de lectura de la cadena molde por la ADNpol es 3'→5'. En eucariontes se describen al menos cinco polimerasas con actividad durante la replicación del ADN: α (alfa), β (beta), γ (gamma), δ (delta) y ϵ (épsilon). ADNpol α o primasa, inicia la síntesis del ADN mediante la formación un cebador ARN. ADNpol β se involucra en la reparación de errores o daños en el ADN, no interviene en la replicación. ADNpol γ lleva a cabo la replicación del ADN mitocondrial. ADNpol δ (replicación de la hebra retardada) y ADNpol ϵ (replicación de la hebra conductora) actúan en mayor parte de la elongación de ambas hebras del ADN (Watson *et al.* 2014). Las polimerasas α , β , δ y ϵ están involucradas en la replicación

del ADN nuclear. Existen otras ADNpol (Θ , theta), (ζ , zeta), (η , eta), (ι , iota) y otras poco conocidas, creyéndose involucradas sobre todo en mecanismos de reparación. Las ADN polimerasas δ , γ y ϵ tienen actividad exonucleasa-3' (de 3' a 5'), son capaces de corregir errores cometidos al incorporar nucleótidos a la hebra en síntesis, eliminando el nucleótido equivocado y añadiendo el correcto. Ninguna ADN polimerasa en eucariontes presenta actividad exonucleasa-5' (de 5' a 3') (Floresvillar y Macías 2013).

A diferencia de lo que ocurre en eucariontes, en la replicación de procariontes participan otras enzimas polimerasas para la síntesis del ADN (Floresvillar y Macías 2013). Solo ADNpol I presenta actividad de reparación exonucleasa-5', se especializa en la remoción de cebadores ARN usados o de ADN, inmediatamente corriente arriba del sitio de síntesis de ADN. ADNpol III es la principal enzima involucrada en la replicación del cromosoma bacteriano, debe ser altamente procesiva para replicar el genoma completo por medio de dos horquillas de replicación, por lo que se considera que forma parte de un complejo conocido como holoenzima ADNpol III que confiere muy alta procesividad (Watson *et al.* 2014). Posterior al proceso de replicación se forman dos dobles hélices, cada una conteniendo una cadena antigua y una nueva, que obedecen las reglas del apareamiento, por ende, cada una de ellas es idéntica en secuencia de bases a la otra.

Este mecanismo de apareamiento es la base molecular para que un semejante reproduzca a otro semejante (Crick 1989).

Continuando, con el primer paso relacionado a la expresión génica, la transcripción que ocurre en el núcleo celular consiste en la síntesis de una cadena de ARN complementaria y antiparalela a la secuencia de nucleótidos de la cadena molde de ADN; entonces posee la secuencia de nucleótidos idéntica a la cadena codificadora de ADN, sustituyendo timina por uracilo en el ARN. La transcripción es necesaria para la generación de proteínas funcionales que definen el metabolismo y la identidad de las células (Hernández 2013); aunque la transcripción es muy precisa (un error cada 10000 nucleótidos añadidos), es menos rigurosa que la replicación (un error cada 10000000 nucleótidos añadidos) (Watson *et al.* 2014).

Las secuencias de ADN que se copian en cada proceso de transcripción se denominan genes (Hernández 2013). Un gen es una unidad de información dentro del genoma (secuencia lineal de nucleótidos en el ADN, con la información necesaria para la síntesis de un ARN funcional, que puede ser ARNm, ARNt o ARNr), que contiene todos los elementos necesarios para su expresión de manera regulada (Figura 1.7) (Camarena *et al.* 2014).

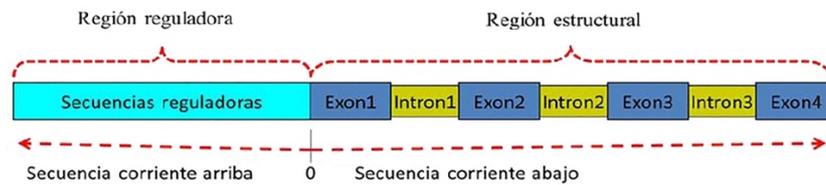


Figura 1.7. Estructura básica de un gen eucariótico

Fuente: Camarena *et al.* (2014)

Los genes se sitúan a lo largo de cada cromosoma en una posición determinada llamada locus. Las unidades transcripcionales en eucariontes son monocistrónicas; los genes están constituidos por secuencias regulatorias y codificantes. El sitio inicial de transcripción se denomina +1, en dirección corriente abajo (*downstream*) hacia el extremo 3', donde se encuentran las secuencias codificantes del gen, los exones (y otras regiones que no se traducen, los intrones); y en dirección opuesta, corriente arriba (*upstream*) hacia el extremo 5', corresponde a la numeración -1, donde se encuentra la mayoría de regiones regulatorias. Los intrones se retiran mediante corte y empalme (*splicing*) del ARNm primario o heterogéneo nuclear (ARNhn), cuyo producto final (ARN mensajero maduro, ARNr y ARNt), ocurre tras modificaciones postranscripcionales del transcripto primario. En procariontes el ARN apenas sintetizado no sufre modificaciones postranscripcionales, la traducción surge de forma inmediata (Hernández 2013).

La enzima encargada de la transcripción es la ARN polimerasa (ARNpol); en bacterias existe solo una ARNpol *core* cuyas subunidades son β' , β , α' , α'' y ω ; mientras que las células eucariontes tienen tres ARN polimerasas, ARNpol I que transcribe el gen precursor de ARNr (subunidades RPA1, RPA2, RPC5, RPC9, RPB6 y otras nueve más), ARNpol II (subunidades RPB1, RPB2, RPB3, RPB11, RPB6 y otras siete más) y ARNpol III que transcribe genes de ARNt, algunos genes de ARN pequeño nuclear (ARNsn) y el gen de ARNr 5S (subunidades RPC1, RPC2, RPC5, RPC9, RPB6 y otras once más), de las cuales la enzima ARNpol II es la más estudiada y en la cual se enfoca la transcripción eucariótica de la mayoría de genes. Además, recientemente se han identificado otras ARNpol, denominadas ARNpol IV y V, encontradas solo en plantas, donde transcriben pequeños ARNs interferentes (ARNi) involucrados en silenciamiento postranscripcional; relativamente ambas enzimas están cercanamente relacionadas a ARNpol II y claramente evolucionaron a partir de tal enzima. Las subunidades grandes β y β' de la ARNpol *core* bacteriana se relaciona de cerca a polimerasas eucarióticas, específicamente son homólogas a las dos subunidades grandes RPB1 y RPB2 encontradas en la ARNpol II; y las subunidades α son homólogas a RPB3 y RPB11, y ω es homóloga a RPB6 (Watson *et al.* 2014).

Los promotores son secuencias de ADN regulatorias, no codifican para el producto génico, no obstante regulan su expresión; un promotor mínimo regulatorio es indispensable, puede modificar la tasa de transcripción del gen, más no es imprescindible para la unión de la ARN polimerasa; por su parte un promotor basal es requerido para la unión de la maquinaria basal de transcripción y la ARNpol II, incluye secuencias consenso como iniciador (Inr) localizado entre -3 y +5, y la caja TATA en la mayoría de promotores localizada de -31 a -25 pares de bases (bp) hacia el extremo 5' del punto de inicio, o el DPE (*downstream promoter element*) que es un elemento común en promotores TATA menos (carecen de caja TATA) localizado de +28 a +32. Las proteínas reguladoras denominadas factores transcripcionales (TF, *transcriptional factors*) se unen a los promotores y su función es regular (aumentar o disminuir) la tasa de transcripción; en promotores basales los factores transcripcionales basales o generales son requeridos para el inicio de la transcripción, éstos se unen a la ARNpol y forman un complejo rodeando el sitio de inicio; los TF reciben el nombre de la ARNpol con la que actúan (TF I actúa con ARNpol I, TF II con ARNpol II, y TF III con ARNpol III), junto con ésta forman el aparato básico de transcripción (Hernández 2013).

La mayoría de promotores basales ubicados en genes procariontes y virales son fuertes, su tasa de transcripción es elevada debido a la eficacia de la maquinaria de transcripción basal; al contrario, promotores de genes eucariontes son débiles, con un inicio de transcripción menos frecuente, pues requieren secuencias accesorias de promotores proximales localizados generalmente a menos de 200 pb corriente arriba del sitio de inicio, como por ejemplo las cajas GC, CAAT y el octámero. También hay promotores distales, generalmente a más de 200 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, aunque también se encuentran corriente abajo. Estas regiones más complejas pueden activar o desactivar genes que controlan la transcripción génica, y no necesariamente se ubican cerca de la región codificadora (Hernández 2013).

La transcripción se conjuga en procesos simultáneos de iniciación, elongación y terminación. El inicio es la síntesis de los primeros nueve enlaces nucleotídicos de ARN mediados por la ARNpol II que permanece en el promotor, y termina cuando la enzima comienza a alargar la cadena y abandona el promotor con el complejo de iniciación. En la elongación las proteínas TFIIE y TFIIH se unen corriente arriba de la ARNpol II, son requeridas para moverse a lo largo del ADN y abandonar el promotor basal; se une TFIIE, y luego TFIIH que excepcionalmente continúa

unida a la ARNpol II y tiene actividades ATPasa, helicasa y cinasa, que fosforila el dominio carboxiterminal (CTD) de la ARNpol II e implica el abandono del promotor basal y el inicio de la elongación; los nucleótidos se añaden covalentemente al extremo 3'-OH, y se forma un híbrido ADN-ARN. Finalmente, en la terminación se reconoce una secuencia de ADN que contiene una región palindrómica rica en GC, que precede a otra de seis o más adeninas, la cual en la transcripción del ARN se lee como señal de poliadenilación y determina el final de la adición de nucleótidos y la desintegración del complejo de transcripción. Al añadirse el último nucleótido a la burbuja de transcripción, se libera la ARNpol II. Al terminar los procesos transcripcionales y postranscripcionales existe un ARNm maduro listo para transportarse al citoplasma (Hernández 2013).

Los ácidos nucleicos codifican para proteínas, una molécula de proteína también es un polímero de esqueleto regular o cadena polipeptídica, cada cadena polipeptídica se forma uniendo cabeza y cola de aminoácidos (Figura 1.8), y difiere en cada uno de los veinte aminoácidos (Crick 1989).

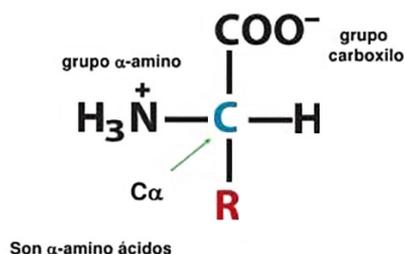


Figura 1.8. Fórmula general de los aminoácidos. Grupo amino (NH_3^+), grupo carboxilo (COO^-), grupo lateral (R).

Fuente: Simarro (2019)

La traducción para la síntesis de una proteína se lleva a cabo en los ribosomas ubicados en el citoplasma celular, con ayuda de pequeñas moléculas de ARNt y un número de enzimas especiales. La información de las secuencias se encuentra en el ARNm, que en muchos es de una sola cadena, y se sintetiza como copia de un fragmento particular de ADN utilizando las reglas del apareamiento de bases; el ribosoma viaja a lo largo del ARNm leyendo su secuencia de bases en grupos de tres (codón) cada vez; siendo el proceso general $\text{ADN} \rightarrow \text{ARNm} \rightarrow \text{proteína}$, en el cual las flechas señalan la dirección en que se transfiere la información de secuencia (Crick 1989).

Los ARNt son pequeños en tamaño, con estructura de bucles, se encargan de transportar aminoácidos hasta el ARNr, donde se unen, uno tras otro, por medio de enlaces peptídicos utilizando la enzima aminoacil-ARNt-sintetasa y consumiendo adenosín trifosfato (ATP). Un triplete de

bases que se encuentra en el asa central de la secuencia del ARNt denominado anticodón, se une complementariamente al codón del ARNm durante la síntesis de una proteína para la introducción de un aminoácido específico a la cadena polipeptídica naciente o creciente (Vera *et al.* 2013).

La estructura de cada ribosoma se construye con un conjunto de moléculas de proteína y varias moléculas de ARN no mensajeros (Crick 1989); según su coeficiente de sedimentación medido en Svedbergs (S), en organismos eucariontes la subunidad mayor de ARN ribosomal (60S, PM = 2800000) consta de ARNr 28S, ARNr 5S y ARNr 5.8S, y la subunidad menor (40S, PM= 1400000) consta de ARNr 18S; presentan 4700, 120, 160 y 1900 nucleótidos, respectivamente (Watson *et al.* 2014). En el proceso de traducción el ribosoma permite la unión del ARNm al ARNt, proporcionando los sitios de interacción entre el codón y el anticodón, y cataliza la transferencia del aminoacil-ARNt (ARNt unido a su aminoácido) al peptidil-ARNt (ARNt unido a la cadena peptídica naciente), siguiendo la secuencia de codones del ARNm y la lectura del código genético. Además, el ribosoma posee tres sitios o centros llamados A, P y E; los dos primeros se encuentran en ambas subunidades del ARNr y participan directamente en la decodificación del ARNm. Por el sitio A (aminoacilo) entra el aminoacil-ARNt al complejo

traduccional y luego se transfiere un aminoácido al peptidil-ARNt para la generación del enlace peptídico en la subunidad mayor; en el sitio P (peptidilo) se localiza al peptidil-ARNt, y es donde se observa la elongación de la cadena peptídica; y el sitio E (eliminación o salida) es por donde el ARNt sale del complejo ribosomal una vez que dejó al aminoácido en la cadena polipeptídica en formación (Vera *et al.* 2013).

Una cadena polipeptídica en síntesis se va plegando sobre sí misma formando una compleja estructura tridimensional necesaria para cumplir una función proteica específica. Frecuentemente un gen es un fragmento de ADN de unos millares de pares de bases que codifica para una única cadena polipeptídica. El dogma central es una magnífica hipótesis que intenta predecir qué flujos de la información de secuencia no pueden darse (Figura 1.9) (Crick 1970, 1989; Cobb 2017).

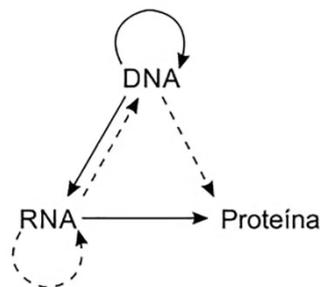


Figura 1.9. Un diagrama que ilustra el dogma central. Las flechas representan los varios flujos de información de secuencia. Las flechas continuas muestran los flujos normales. Las flechas de puntos muestran

los flujos extraños. Nótese que los flujos que faltan son las flechas que deberían empezar en las proteínas.

Fuente: Crick (1970, 1989), Cobb (2017)

Los flujos normales se han descrito anteriormente. El flujo ARN \rightarrow ARN es poco frecuente, usado por ciertos virus de ARN como el virus de la gripe y el de la polio; el flujo ARN \rightarrow ADN (transcripción inversa) es usado por virus de ARN, por ejemplo el virus del SIDA. El flujo ADN \rightarrow proteína no existe, aunque bajo condiciones especiales en tubo de ensayo el ADN monocatenario puede actuar como mensajero, pero probablemente nunca ocurre de forma natural (Crick 1989).

El código genético es un diccionario que relaciona el lenguaje de cuatro letras de las bases de los ácidos nucleicos con el lenguaje de veinte letras de las proteínas. Un codón (tripleto de bases) codifica para un aminoácido, hay $4 \times 4 \times 4 = 64$ codones en total. Hay aminoácidos que están codificados por más de un codón. Tres codones señalan el fin de cadena. En el código genético (Tabla 1.3) las tres bases de cada tripleto se leen en cada entrada de la tabla, la primera base se escribe a la izquierda, la segunda arriba y la tercera a la derecha (Crick 1968). Así, la valina (Val) está codificada por GUU, GUC, GUA, y GUG, la histidina (His) por CAU y CAC, etc.; los tres codones para el final de la cadena polipeptídica (STOP) son UAA, UAG y UGA. El extremo izquierdo de una cadena de ARN o ADN

como se escribe habitualmente, se denomina extremo 5', y el derecho extremo 3', por razones químicas. El código parece ser exactamente el mismo para plantas y animales estudiados, sin embargo, se conocen pequeñas variaciones, especialmente para el ADN de algunas mitocondrias y para ciertos hongos.

Tabla 1.3. *El código genético.*

Primera Posición (extremo 5')	Segunda Posición			Tercera Posición (extremo 3')	
	U G	C	A		
U ↓	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Fuente: Crick (1968, 1989)

Las abreviaturas correspondientes a las bases son U → Uracilo (para ADN se encuentra T → timina, en lugar de U); C → Citosina; A → Adenina; G → Guanina.

Las abreviaturas correspondientes a los aminoácidos son Ala → Alanina; Arg → Arginina; Asn → Asparragina; Asp → Ácido aspártico; Cys → Cisteína; Gln → Glutamina; Glu → Ácido glutámico; Gly → Glicina; His → Histidina; Ile → Isoleucina; STOP → significa fin de cadena; Lys → Lisina; Met → Metionina; Phe → Fenilalanina; Pro → Prolina; Ser → Serina; Thr → Treonina; Trp → Triptófano; Tyr → Tirosina; Val → Valina; Leu → Leucina.

Genética molecular y centros de origen

La genética molecular permite complementar la interpretación de estudios arqueológicos (Zeder 2006), contribuyendo significativamente a identificar parientes silvestres de los cultivos, y precisando información acerca de áreas geográficas donde la domesticación de los primeros organismos aportó para el desarrollo de diversos cultivos. La genética de poblaciones permite la documentación de mecanismos evolutivos asociados al manejo humano, el moldeamiento y distribución espacial de la diversidad genética e interacción de poblaciones cultivadas y silvestres;

patrones actuales de distribución espacial de la diversidad genética constituyen un reflejo de procesos ecológicos y culturales que influyeron en el pasado.

La genética de poblaciones permite el análisis de distribución espacial de la variabilidad genética de una especie e identificación de sitios de alta diversidad genética en poblaciones silvestres, regiones cuyo manejo de poblaciones presenta mayores o menores efectos cuello de botella (Doebly 1992; Doebly *et al.* 2006), las cuales a su vez pueden derivar en uno o varios efectos fundadores (Mayr 1942; Gross y Olsen 2010); poblaciones domesticadas pueden ser o no simpátricas con las silvestres, el nivel de diferenciación y variación en las frecuencias génicas revela el grado de intensidad en manejo y domesticación, y la información conjunta contribuye a la identificación del centro de origen de un proceso de domesticación.

La filogeografía comienza a hacer contribuciones refinadas sobre las áreas de origen y rutas de difusión de haplotipos característicos de organismos domesticados, lo que permitirá la documentación de suficientes estudios de caso para proponer patrones históricos en diversos contextos geográficos y culturales; la filogeografía es el estudio de los principios que rigen las distribuciones geográficas de linajes genealógicos, especialmente aquellos dentro de, y entre, especies emparentadas (Avice 2000), es integradora y establece puentes entre las disciplinas microevolutivas

(etología, demografía, genética de poblaciones) y las macroevolutivas (geografía histórica, paleontología, biología filogenética) a través de la genética molecular (Vásquez 2008).

Selección de plantas usando marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se utilizan para la estimación de la distancia genética entre genotipos y orientación al mejorador en la elección de progenitores. La identificación de líneas con alta aptitud combinatoria (AC) en combinaciones híbridas es bastante costosa en programas de mejoramiento. El uso de marcadores moleculares se recomienda para la determinación de grupos heteróticos y también para hacer las predicciones del comportamiento de híbridos en base a la distancia genética entre los progenitores. En programas de retrocruzas, el uso de marcadores moleculares puede facilitar la elección de progenitores donadores de menor distancia genética del progenitor recurrente (Camarena *et al.* 2014).

La biotecnología en complemento y no en reemplazo al fitomejoramiento tradicional, es necesaria para elevar el rendimiento de los cultivos. Se espera que las aplicaciones de las técnicas de cultivo de tejidos, manipulación y transferencia génica, tipificación del ADN, selección asistida por marcadores moleculares, selección y clonación de

plantas, etc., proporcionen nuevos mecanismos para el mejoramiento de plantas, otorgándoles resistencia a plagas y enfermedades y a peligros naturales, sin efectos secundarios perjudiciales que acarreen muchos pesticidas y fertilizantes, además de incorporarles características deseables en algunos cultivos (valor nutritivo, mayor rendimiento, producción de metabolitos secundarios, etc.). La rapidez en el mejoramiento vegetal a través de la biotecnología es mucho mayor que cuando se aplican métodos tradicionales (Camarena *et al.* 2014).

Referencias bibliográficas

- Aguirre-Dugua, X. y González-Rodríguez, A. 2016. Phylogeographical approaches to the study of plant domestication, with special emphasis on perennial plants. En R. Lira, A. Casas y J. Blancas (Eds.), *Ethnobotany of Mexico. Interactions of people and plants in Mesoamerica* (págs. 319-366). New York, NY: Springer International Publishing. Doi: 10.1007/978-1-4614-6669-7_13
- Avise, J. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.

Belmonte, V. 2018. Síntesis de proteínas. Reforzando conocimientos. En línea: <https://slideplayer.es/slide/12564058/>

Bravo, E. 1991 La problemática mundial de los recursos fitogenéticos. En: Memorias de la 11 reunión nacional sobre recursos fitogenéticos. R. Castillo, C. Tapia y J. Estrella (Eds.), Quito.

Camarena, F., Chura, J. y Blas, R. 2014. Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas. UNALM/AGROBANCO. 278 p.

Camarena, F., Huaranga, A. y Mostacero, E. 2010. Mejoramiento genético de especies del género *Phaseolus* mediante metodologías convencionales e innovadoras con el fin de incrementar la producción y la oferta exportable del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Primera Edición. UNALM-CONCYTEC. 284 p.

Casas, A., Parra, F., Rangel, S., Guillén, S., Blancas, J. y Figueredo, C. J. 2015. Evolutionary ecology and ethnobiology. En U. P. Albuquerque, P. Medeiros, y A. Casas (Eds.), *Evolutionary ethnobiology* (págs. 37-57). Springer, Países Bajos,

Chargaff, E. 1950. Chemical Specificity of Nucleic Acids and Mechanism of their Enzymatic Degradation.

Claros, M. G. 2010. Apuntes de biología molecular. Transcripción en los procariotas. BioRom. Ayudas al aprendizaje de bioquímica, biotecnología y biología molecular.

Cobb, M. 2017. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. PLOS Bio. 115(9):e2003243. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003243>

Crick, F. 1968. The origin of the genetic code. J. Mol. Biol. 38:367-369.

Crick, F. 1970. Central dogma of molecular biology. Nature 227:561-563.

Crick, F. 1989. Qué loco propósito. Metatemas. Tusquets Editores S.A. Edición: edición en español. 216 p.

De Candolle, A., 1882. Origine des plantes cultivées. Germer Bailliere, Paris.

De Fossard, R. 1976. Tissue culture for plant propagation. Armidale: University of New England.

Doebley, J. 1992. Molecular systematics and crop evolution. En P. S. Soltis, D. Soltis, y J. J. Doyle (Eds.), *Molecular systematics of plants* (págs. 202–222) Chapman & Hall, Londres.

Doebley, J., Gaut, B. y Smith, B. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 1309-1321.

Flannery, K. V. (Ed.). 1986. *Guilá Naquitz*. Academy Press, New York.

Floresvillar, J. y Macías, J. 2013. Capítulo 4. Replicación. En A. Salazar, A. Sandoval, y J. Armendáriz (Eds.), *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (págs. 36-43). McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C. V., México D. F.

Frodin, D. G. 2004. History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53:753-776.
<http://dx.doi.org/10.2307/4135449>

Gepts, P. 2000. A phylogenetic and genomic analysis of crop germplasm: a necessary condition for its rational conservation and utilization. En Gustafson J (Ed.), *Proc. Stadler Symposium, Plenum* (págs. 163–181). New York.

- Gepts, P. 2001. Origins of plant agriculture and major crop plants. En M. Tolba (Ed.), *Our fragile world: Challenges and opportunities for sustainable development* (págs. 629-637) EOLSS Publishers, Oxford.
- Gross, B. y Olsen, K. 2010. Genetic perspectives on crop domestication. *Trends in Plant Science* 15:529–537.
- Hammer, K., Arrowsmith, N. y Gladis, T. 2003. Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources. *Naturwissenschaften* 90:241-250.
- Harlan, J. 1956. Distribution and utilization of natural variability in cultivated plants. En Brookhaven Symposium of Biology, no. 9, *Genetics plants breeding* (págs. 191-206), Brookhaven National Laboratory, N.Y.
- Harlan, J. 1961. Geographic origin of plants useful to agriculture. *Publs. Am. Ass. Advmt. Sci.* 66:3-19.
- Harlan, J. 1971. Agricultural origin: Centers and non-centers. *Science* 174:468-474.

- Harlan, J. y de Wet, J. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20(4):509–517.
- Harlan, J. 1975. Crops and man (foundations for modern crop science). American Society of Agronomy, Madison. 295 p.
- Hawkes, J. G. 1983. The diversity of crop plants. Harvard University Press, Londres.
- Hernández, Z. 2013. Capítulo 5. Transcripción. En A. Salazar, A. Sandoval, y J. Armendáriz (Eds.), *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (págs. 44-51). McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C. V., México D. F.
- INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). 2003. Diversidad de frutales nativos comestibles Caricaceae - Solanaceae, fenología, usos y recolección de germoplasma en el Sur del Ecuador. Estación Experimental Chuquipata, Granja Experimental Bullcay. 52 p.
- INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). 2008. Informe Nacional sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación. Quito, Ecuador. 106 p.

- Kresge, N. Simoni, R. y Hill, R. 2005. Chargaff's rules: the work of Erwin Chargaff. *J. Biol. Chem.* 280(24):e21.
- MacNeish, R. S. 1967. A summary of the subsistence. En D. S. Byers (Ed.). *The prehistory of the Tehuacán valley. Volume one: Environment and subsistence* (págs. 290–331). University of Texas Press, Austin.
- MacNeish, R. S. 1992. The origins of agriculture and settled life. University of Oklahoma Press, Norman and London.
- Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press. Nueva York.
- MINAM (Ministerio del Ambiente). Pulgar, M. y Otálora, V. 2014. Informe nacional del estado del ambiente 2012-2013. Lima, Perú. 323 p.
- Newstrom, L., Armstrong, T., Robertson, A., Lee, W., Heenan, P., Peltzer¹, D., Wilton, A., FitzJohn, R., Breitwieser¹, I. y Glenny, D. 2003. Environmental risks to the New Zealand flora from transgenic crops: the role of gene flow. Landcare Research New Zealand Ltd. 76 p.

Parra, F. y Casas, A. 2016. Origen y difusión de la domesticación y la agricultura en el Nuevo Mundo. En A. Casas, J. Torres-Guevara, y F. Parra (Eds.), *Domesticación en el continente americano. Tomo 1. Manejo de biodiversidad y evolución dirigida por las culturas del nuevo mundo* (págs. 159-187). UNAM/UNALM, Ciudad de México/Lima

Piperno, D. R. y Pearsall, D. 1998. The origins of agriculture in the lowland Neotropics. Academic Press, Nueva York.

Piperno, D. 2011. The origins of plant cultivation and domestication in the New World Tropics. *Current Anthropology* 52.

PQBio (Por Qué Biotecnología). 2020. El cuaderno 32. Los ácidos nucleicos, estructura y función. En línea: https://www.porquebiotecnologia.com.ar/Cuadernos/El_Cuaderno_32.pdf

Särkinen T., Baden, M., Gonzáles, P., Cueva, M., Giacomini, L., Spooner, D., Simon, R., Juárez, H., Nina, P., Molina, J. y Knapp, S. 2015. Listado anotado de *Solanum* L. (Solanaceae) en el Perú. *Revista peruana de biología* 22(1):003-062. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v22i1.11121>

- Sevilla, R. y Holle, M. 2004. Recursos genéticos vegetales. Luis León Asociados S.R.L. Lima, Universidad Nacional Agraria La Molina. 445 p.
- Simarro, P. 2019. Lección 4.1: Aminoácidos. En línea: <http://www.biolocus.es/lesson-2-1-aminoacidos/>
- Smith, B. D. 1998. The emergence of agriculture. W. H. Freeman, Nueva York.
- Smith, B. 2001. Documenting plant domestication: The consilience of biological and archaeological approaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(4): 1324-1326.
- Tapia, M. E. y Fries, A.M. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. FAO y ANPE. Lima.
- Vallejo, F. y Estrada, E. 2002. Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira. 402 p.
- Vavilov, N. 1926. Studies on the origin of cultivated plants. Institut Botanique Appliqui. Et d'Amlioration des Plantes, Leningrado.

- Vavilov, N. 1951. The origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. Ronald Press, New York, New York, USA.
- Vavilov, N. 1992. Origin and geography of cultivated plants. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vázquez, E. 2008. Filogeografía y vertebrados. En L. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre (Comp.). *Ecología molecular, Capítulo 14*. SEMARNAT/INE/UNAM, México.
- Vera, J., Álvarez, B. y Gómez, B. 2013. Capítulo 5. Traducción. En A. Salazar, A. Sandoval, y J. Armendáriz (Eds.), *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (págs. 52-65). McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C. V., México D. F.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. 2014. Molecular biology of the gene. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Seventh Edition. 872 p.
- Zeder, M. 2006. Central questions in the domestication of plants and animals. *Evolutionary Anthropology* 15:105–117.

Zohary, D. 1970. Centers of diversity and centers of origin.
En D. H. Frankel, y E. Bennett (Eds.), *Genetic resources in plants: their exploration and conservation* (págs. 33-42). Blackwell Scientific Publications, Oxford.

CONSERVACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LAS PLANTAS

En Suramérica pese a existir naciones con porcentajes altos de diversidad fitogenética a nivel mundial, la productividad, la seguridad alimentaria y el desarrollo sostenible son influidos por factores como el incremento poblacional, la tecnificación de procesos, las áreas disponibles para siembra, el desgaste de suelos, el cambio climático, etc., que conllevan a una inminente erosión genética en varias especies, que es preciso evitar mediante acciones vinculadas a la protección de la biodiversidad.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) identifica que la biodiversidad está mejor conservada *in situ*, y *ex situ*

debe aplicarse como apoyo a la conservación *in situ*. Cuando las amenazas a las especies en su propio hábitat o al hábitat mismo son considerables, las posibilidades de que sobrevivan mucho tiempo son remotas, siendo entonces importante evaluar la necesidad de iniciar un programa de conservación *ex situ* (Lascuráin *et al.* 2009).

La conservación de recursos genéticos en bancos de germoplasma pretende preservar la variabilidad genética de cultivos de interés comercial, debido a su potencial valoración agrícola, y contribuir al control de la erosión genética; la utilización más importante de las plantas se dirige hacia la investigación en producción de alimentos, conservación de suelos, fruticultura, extracción de principios activos, entre otros; también favorece al intercambio de germoplasma, la educación, la repoblación y la producción industrial.

Los recursos fitogenéticos se consideran naturales, limitados y perecederos; proporcionan la materia prima o genes que debidamente utilizados o combinados por el hombre permiten la obtención y valorización de variedades vegetales nuevas y mejoradas. Son fuente insustituible de resistencia a enfermedades y plagas, tolerancia a estrés, adaptación, calidad y productividad. Los recursos fitogenéticos no son inagotables, sino un capital cuyo nivel es preciso mantener e incrementar si

queremos seguir disfrutándolos; la responsabilidad corresponde a la humanidad, y más a quienes los utilizan y se benefician de ellos (Vallejo y Estrada 2002).

Los recursos fitogenéticos constituyen la despensa alimenticia de la humanidad; su importancia real y estratégica es enorme, y su pérdida es una amenaza grave a mediano y largo plazo para el progreso agrícola y la seguridad alimentaria internacional. Se estima la existencia de unas 250000 especies vegetales en el mundo; solo 100 especies suministran más del 90% del alimento, 20 proveen la mayoría de proteínas, calorías y aceites, tres especies (maíz, arroz y trigo) suministran el 66% de las proteínas y calorías. La humanidad depende de menos del 1% de las especies vegetales existentes, mientras que las restantes son aún desconocidas o en mejor caso subutilizadas (Vallejo y Estrada 2002).

Generalidades acerca de la conservación de recursos fitogenéticos

La conservación de recursos fitogenéticos preserva la habilidad de germinación de las semillas y garantiza la existencia y la diversidad de las especies; el germoplasma es el bagaje o *pool* genético de una especie; el banco de germoplasma es el lugar físico para la conservación de semillas; accesión es la unidad de conservación, una

muestra de semillas que ingresa a un banco de germoplasma identificada con un código y reproduce la identidad genética de procedencia; colección es un grupo de muestras o accesiones; colección base es aquella destinada a largo plazo y de uso restringido para regeneración (semillas sexuales a - 20 °C; < 40% HR; granos de 5% de humedad); colección activa se refiere a muestras accesibles o disponibles para diferentes usuarios; duplicados representan colecciones ingresadas a otros bancos, genéticamente iguales a las accesiones de origen; las semillas ortodoxas se secan y mantienen a bajas temperaturas; mientras que, las semillas recalcitrantes no pueden secarse ni mantenerse a baja temperatura (Sevilla y Holle 2004).

Estrategias para la conservación de germoplasma

El germoplasma es un conjunto de genes que se transmiten dentro y entre poblaciones de una especie vegetal, es el plasma germinal, el plasma de la vida; incluye cultivares nativos, cultivares mejorados, poblaciones en mejoramiento, especies silvestres relacionadas y especies cultivadas obsoletas (Sevilla y Holle 2004).

Una estrategia nacional para la conservación de germoplasma toma en cuenta lo siguiente (UBA 2019):

- Recursos biológicos contenidos dentro de los límites nacionales, sean plantas silvestres o exóticas, plantas de importancia económica, plantas medicinales o nativas.
- Recursos institucionales y expertos disponibles para documentación, investigación, colección, manejo y utilización de dichos recursos.
- Necesidades destacadas presentes y futuras de entrenamiento, educación y cooperación técnica.

Conservación *in situ*

El CDB define la conservación *in situ* como “la conservación de los ecosistemas (hábitats), el mantenimiento y recuperación de poblaciones de especies en sus medios naturales”; estratégicamente, la Comisión de Recursos Genéticos (FAO 1991) la recomienda como complementaria en programas de conservación; también se recomienda preservar las especies silvestres, ordenar y mejorar la conservación en fincas (“chacra”), y mejorar la gestión de los agricultores conservacionistas. La conservación *in situ* requiere el trabajo conjunto de comunidades, organizaciones no gubernamentales, instituciones nacionales y gobiernos locales; requiere la valorización y rescate de métodos y prácticas tradicionales ecológicamente compatibles, de bajo costo, y la

identificación de variedades con potencial comercial (Sevilla y Holle 2004).

La conservación *in situ* abarca ámbitos relacionados a áreas naturales protegidas, parques, y reservas con mínima intervención humana, con orientación hacia los parientes silvestres; también llega al nivel familiar campesino o nativo, con orientación hacia las especies cultivadas; comprende la conservación de los ecosistemas tradicionales de cultivo y las culturas locales, la diversidad total de especies. Esta modalidad es practicada por nuestras comunidades y agricultores durante muchas generaciones, con base en variedades locales y regionales, las cuales utilizan para su subsistencia. Con el pasar del tiempo, los agricultores y las comunidades adicionan un valor económico al material vegetal a través de su selección y utilización; las variedades fruto de la innovación del agricultor, fueron, son y serán esenciales para el desarrollo de futuras variedades comerciales (Vallejo y Estrada 2002).

El Plan de Acción Mundial promovido por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, incluye como actividades de ordenación y mejoramiento de los recursos fitogenéticos *in situ* el estudio e inventario para evaluación de diversidad, el apoyo a la ordenación y mejoramiento en fincas, la asistencia a agricultores en caso de catástrofe para el restablecimiento de sistemas agrícolas, y

la promoción de la conservación *in situ* de especies silvestres y afines a las cultivadas para la producción de alimentos (Vallejo y Estrada 2002).

Proyectos multidisciplinarios

En el proyecto conservación *in situ* de los cultivos nativos y sus parientes silvestres llevado a cabo en Perú (2001-2005), por varias instituciones públicas y ONGs, que tiene por objeto fortalecer las organizaciones campesinas, promover la cultura conservacionista, el consumo y eventual comercialización, se identifica 8 microgenocentros y 750 agricultores conservacionistas, se desarrolla una metodología estandarizada para inventario de diversidad, además se fomenta la identificación participativa de parientes silvestres; también se registra información etnobotánica, de usos de los cultivos y prácticas conservacionistas; finalmente, se registra la introducción y complementación de nuevas tecnologías, y se identifica ferias locales, 113 tecnologías tradicionales y 26 tipos de amenazas a la conservación (CCTA 2006).

La gran parte de la diversidad está en manos de pequeños agricultores marginados, que utilizan el cultivo de recursos fitogenéticos para autoconsumo, y poseen una cultura antigua y tradicional. La diversidad de tubérculos andinos por ejemplo, se conserva por medio de diferentes

estrategias ancestrales como la siembra de variedades en mezcla, siembra en pisos ecológicos diferentes, siembra de varias parcelas del mismo cultivo, siembra en diferentes fechas, las labores agrícolas en “minka”, el uso de indicadores meteorológicos, el trueque de semillas, el uso de variedades con diferentes propósitos, y rituales en manifestación del respeto a la naturaleza (CCTA 2006).

El proyecto programa de colaboración sobre biodiversidad de raíces y tubérculos andinos (RTA) (CIP/COSUDE) desarrollado en Bolivia, Ecuador y Perú (1993-1997), en cuatro fases destinadas a la caracterización y conservación en microcentros; los microcentros son áreas geográficas definidas cuya conservación es sostenible en tiempo, espacio y a nivel familiar, su unidad de análisis es la familia en un contexto holístico (sociocultural, agroecológico y económico) (CIP 1998).

La fase uno corresponde a la identificación de microcentros mediante aproximaciones con la información disponible; se identifica áreas geográficas con al menos tres RTAs en el sistema productivo, siendo las de mayor interés de interés oca (*Oxalis tuberosa*), olluco (*Ullucus tuberosus*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*), arracacha (*Arracacha xanthorrhiza*), yacón (*Polymnia sonchifolia*), ahipa (*Pachyrrhizus ahipa*), mauka (*Mirabilis expnsa*), achira (*Canna edulis*), papa nativa

(*Solanum spp.*) y maca (*Lepidium meyenii*). La fase dos se refiere a la caracterización de microcentros mediante organización de la producción por características y uso de las especies, factores limitantes o favorables, interacción de familias, comunidades, organizaciones y población urbana, y estimación de la agrobiodiversidad en ferias de semilla. La fase tres enmarca la dinámica de conservación en microcentros, es decir los factores que afectan la estructura poblacional y la frecuencia de genes; su unidad de análisis es la familia, comunidad, cuenca o región; y conlleva al flujo de semillas entre agricultores, intercambio en ferias locales, distritales u otros, trueque, regalo o pago por trabajo. Posteriormente, en la fase cuatro se realizan intervenciones en microcentros consolidados, para el establecimiento de relaciones con la conservación *ex situ*, repatriación de semillas sanas de variedades locales, capacitación en selección positiva de RTAs, selección masal de cultivos con reproducción sexual, implementación de tecnología de almacenamiento, complementariedad de técnicas tradicionales con modernas, monitoreo de la dinámica espacial y temporal y acompañamiento comercial (CIP 1998).

La conservación *in situ* teóricamente corresponde a todos los alelos de todos los loci de todas las poblaciones; como estrategia se clasifica la diversidad en razas o ecotipos, siendo la unidad de conservación un grupo de individuos

con la misma morfología, fenología y patrón adaptativo (genéticamente homogéneo); la diferencia entre grupos se basa en el accionar de muchos genes. Es necesario el mejoramiento del sistema de conservación para revertir la situación de marginalidad y pobreza; el mantener los sistemas tradicionales de producción, la cultura y los ecosistemas es la mejor estrategia para la conservación de la diversidad de plantas cultivadas (Sevilla y Holle 2004).

Dificultades técnicas

Las dificultades técnicas para la conservación *in situ* se enfocan en la taxonomía y relaciones de las especies, pues no se puede conservar lo que no se conoce, además se requiere definir categorías intraespecíficas y relaciones interespecíficas; en cuanto a la diversidad total de una especie, se dificulta debido a que las poblaciones representan solamente una porción del total, y se requiere clasificar las poblaciones en grupos homogéneos, estudiar la variabilidad total (entre y dentro de poblaciones), y definir la estructura genética; en el ámbito geográfico (ecogeografía y ecotopografía), se requiere definir núcleos (ámbitos geográficos con condiciones ambientales en los que se adapta una especie o raza), la selección natural en pisos altitudinales define caracteres adaptativos útiles; en relación a la dinámica de las poblaciones, se requiere conocer el

equilibrio genético y sus cambios; además, limitantes bióticos y abióticos o un accidente climático pueden destruir una población susceptible; en cuanto a selección artificial se refiere, es requerimiento saber si los agricultores priorizan la biodiversidad o la orientación comercial; para la integración de la especie en el sistema productivo se considera su orientación de producción: autoconsumo o mercado, la importancia relativa del cultivo (primario o secundario) y la importancia cultural (usos de la cosecha y costumbres); también influye el tamaño de propiedad y demografía de poblaciones antiguas en áreas pequeñas; así como, las prácticas de manejo conservacionista; y las reglamentaciones nacionales sobre acceso, uso y conservación de recursos genéticos (Sevilla y Holle 2004).

Conservación *ex situ*

Consiste en el mantenimiento de algunos componentes de la biodiversidad fuera de sus hábitats naturales.

Bancos de germoplasma

Los bancos de germoplasma ponen énfasis en la conservación de especies útiles para la alimentación y la agricultura. En bancos de semilla la temperatura de conservación varía entre 0 y 8 °C para conservación a corto-

mediano plazo, y usualmente es $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para conservación a largo plazo, dependiendo de especie y tipo de semilla a conservar. Las cámaras de conservación mantienen la integridad genética de la semilla el mayor tiempo posible mediante el control de refrigeración y humedad relativa, aislamiento térmico y sellos de vapor de agua; las especies varían ampliamente en el periodo de conservación de sus semillas, en general los cereales presentan mayor longevidad de semilla, en leguminosas es intermedia y varía según la especie, y en hortícolas es menor (Sevilla y Holle 2004).

El vigor de semilla es la fuerza para germinar en condiciones adversas, y la viabilidad de semilla es la habilidad para germinar y producir plantas normales. El vigor y la viabilidad declinan muy lento (75 a 90% de germinación), con rápido deterioro (25 a 10% de germinación), y nuevamente lento; el máximo vigor y viabilidad ocurre cuando la semilla alcanza el máximo peso seco (en madurez fisiológica). El vigor se mide directamente con la germinación en condiciones adversas o indirectamente con el uso de tetrazolio (coloración roja en tejidos indica actividad respiratoria); la viabilidad se mide mediante pruebas de germinación estándar (Ruiz 2009). La humedad de semilla en madurez fisiológica varía según especie y variedad, 60 a 70% en leguminosas (Sevilla y Holle 2004).

El índice de germinación se entiende como el número medio de días requeridos para la emergencia de la radícula (Cabrera *et al.* 2010); una semilla se considera germinada cuando la radícula supera 1.0 mm de longitud fuera de su cubierta (Prohens *et al.* 1999); se calcula mediante la siguiente fórmula, para cada tratamiento (Nerson y Paris 1988):

$$IG = (S_1T_1 + S_2T_2 + \dots S_nT_n) / (S_1 + S_2 + \dots S_n)$$

donde: S es el número de semillas germinadas y T es el tiempo de incubación en días (Loy y Evensen 1979).

Las condiciones ideales para conservación en bancos de semilla son humedad relativa (HR) baja entre 15 y 20%, temperatura a -20 °C, ausencia de luz y atmosfera baja en oxígeno. Semillas de tomate almacenadas a 4 °C durante 50 años pierden 0.4% de viabilidad cada año, semillas de trigo pierden 0.5%, semillas de sorgo pierden 1.9%. Semillas de frijol almacenadas a -18 °C durante 17 años presentan 99% de germinación, semillas de pepinillo 98%, semillas de sandía 94%. También se menciona que la reducción de la temperatura de 20 a 10 °C multiplica por 3.0 la longevidad en semillas ortodoxas, de 10 a 0 °C multiplica por 2.4 la longevidad, de 0° a -10 °C multiplica por 1.9 la longevidad, y de -10 a -20 °C multiplica por 1.5 la longevidad. Si no se dispone de equipos se recurre a la regla práctica de “la suma

de grados Fahrenheit y humedad relativa debe ser igual o menor a 100”. En otros casos, se seca la semilla hasta 5%, se coloca en envases herméticos y ubica en ambientes secos, ventilados, bajo sombra y con temperaturas no mayores a 20 °C (Sevilla y Holle 2004).

La humedad de semilla es generalmente el mayor causante del deterioro en la conservación *ex situ*, un rango óptimo va de 4 a 8%. La humedad de equilibrio es la humedad de semilla cuando se equilibra con la humedad del aire, a mayor humedad del aire mayor humedad de semilla por imbibición; los envases herméticamente cerrados reducen el flujo de la humedad del aire a la semilla; la humedad de equilibrio varía entre especies y variedades, por ejemplo en semillas de arroz o trigo con 5% de humedad de semilla almacenada a 10% de HR, la primera cambia a 8% si la HR es 20%, cambia a 18% si la HR es 80% (Sevilla y Holle 2004).

Los factores que afectan la conservación de semilla corresponden a caracteres estructurales (con o sin cubierta, necesidad o no de escarificación), tamaño, localización del embrión, madurez, daños (físicos o sanitarios), humedad, composición química; y factores del medio ambiente como temperatura relacionada a la respiración (cada 5 °C de menor temperatura duplica el periodo de conservación), y humedad relativa relacionada con la sanidad (ocurre condensación en

atmosferas saturadas con vapor de agua y temperaturas menores a 14 °C) (Sevilla y Holle 2004).

El secado de semilla requiere eliminación de humedad superficial y humedad interior, el agua interior se encuentra en forma constitutiva intracelular (protoplasma) y libre extra celular (espacios intercelulares). El secado es afectado por temperatura, humedad relativa y tasa de flujo del aire de secado; la tasa de flujo del aire de secado es la cantidad de aire que pasa a través de la semilla por unidad de tiempo; el ritmo de secado depende de la humedad de semilla, en general varía entre 5 y 10%. Un factor muy influyente en el tiempo de secado es la temperatura, ya interviene en la determinación del ritmo de difusión de la humedad interna, generación de diferencias en la presión de vapor entre semilla y atmósfera, y determinación de la capacidad del aire externo para disipar humedad (Sevilla y Holle 2004).

Peso final semilla seca = peso inicial x (100 – humedad inicial) / (100 – humedad final)

Las formas del secado de semilla incluyen secado con flujo de aire caliente, secado con desecantes o en ambientes con baja humedad relativa; no es posible el secado si la humedad del aire es mayor que la humedad de equilibrio; el aumento de la temperatura del ambiente de secado en 10 °C

reduce a la mitad la HR del mismo; no es conveniente el secado de semilla bajo temperaturas mayores comprendidas entre 35 y 40 °C; el secado de semilla en el trópico se complica por presencia de temperatura y humedad relativamente altas.

Los desecantes de semilla basados en sílica gel ventajosamente cambian su color de azul–seco a rosado–húmedo; los factores que determinan el tiempo requerido para secado con sílica gel son tamaño y clase de semilla, humedad inicial de semilla y proporción peso sílica gel/peso de semilla; es recomendable una relación 1/1 en los pesos sílica gel/semilla.

Las semillas recalcitrantes son de gran tamaño (cacao, mango, palta, otras), rodeadas de endocarpio grueso (verdaderos frutos), cubiertas por estructuras carnosas o jugosas generalmente asociadas a ambientes húmedos, poseen alto contenido de humedad, son sensibles al secado, a bajas temperaturas y a la descomposición, y su longevidad varía desde pocas semanas a varios meses. La recalcitrancia puede ser alta, mediana o mínima; las semillas recalcitrantes requieren de oxígeno, carecen de latencia, son sensibles al frío, no soportan temperaturas menores a 0 °C; semillas tropicales sufren daño por debajo de la temperatura ambiental, el cacao por ejemplo sufre daños a menos de 15 °C. Se recomienda el almacenamiento de semilla recalcitrante en envases abiertos,

tratamientos con fungicidas o bactericidas, y tratamientos con inhibidores de germinación; el contenido de la humedad de semilla es alto (25% en palma; 55% en café), variable aún dentro de un grupo de la misma planta, y la humedad crítica varía entre especies, variando entre 12 a 35% (Sevilla y Holle 2004).

En Perú los bancos de germoplasma a nivel nacional se organizan en una Red de Bancos de Recursos Genéticos coordinados por el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA); el objetivo de la red es conservar la diversidad genética *in situ* y *ex situ* de plantas cultivadas (Figura 2.1), animales domésticos, especies silvestres afines, entre otros; desde el año 2000 surge un inventario de instituciones privadas y públicas que mantienen bancos de germoplasma activos de diferentes especies, siendo en Perú 31 instituciones que mantienen 42 bancos de germoplasma (Consortio GTZ 2001).



Figura 2.1. Germinación de semillas; desecantes en frascos herméticos; conservación en bolsas de papel y aluminio; conservación *ex situ* de oca, olluco, maca, mashua y yuca.

En Ecuador, instituciones nacionales como el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) dirigen proyectos para la conservación *in situ* de los recursos genéticos de interés agrícola, que deben ser complementados con proyectos orientados a la conservación *ex situ*, enfatizando la conservación de los recursos genéticos agrícolas mediante la constitución y manejo de bancos de germoplasma. El país cuenta con varias colecciones nacionales de recursos fitogenéticos que se mantienen en entidades públicas y privadas, universidades y centros e instituciones de investigación. El INIAP, a través del Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF) maneja un banco de germoplasma nacional que ejecuta y coordina las acciones en materia de conservación *ex situ* (González 2002), el cual contiene aproximadamente 17920 accesiones provenientes de colectas, intercambio y custodia, de las cuales aproximadamente 13711 se almacenan como semillas, 4209 en campo o duplicadas en colecciones *in vitro*; incluye colecciones de un sinnúmero de cultivos relevantes para la agrobiodiversidad ecuatoriana como son una variedad de tubérculos andinos, maíz, quinua, chocho, fréjol, haba, arveja, lenteja, maní, ají, naranjilla, chirimoya, arroz, yuca, cacao, tomate de árbol, uvilla, amaranto, entre otros (Tapia *et al.* 2008).

En Ecuador existe una gran diversidad de recursos vegetales útiles, muchos son utilizados por diferentes

grupos sociales; se resalta que las principales especies consumidas por diez pueblos indígenas y una comunidad rural de colonos mestizos son el achiote (*Bixa orellana*), ají (*Capsicum annum*), papaya (*Carica papaya*), guaba (*Inga edulis*), yuca (*Manihot esculenta*) y guayaba (*Psidium guajava*). En cuanto a plantas medicinales empleadas por nueve pueblos indígenas y una comunidad rural de colonos mestizos, se determinó el uso común del paico (*Chenopodium ambrosioides*), hierbaluisa (*Cymbopogon citratus*), tía Tina (*Scoparia dulcis*), ortiga (*Urera baccifera*) y verbena (*Verbena litoralis*) (González 2002).

Entre la vegetación natural del Ecuador, las diversas regiones geográficas son muy ricas en parientes silvestres afines a las especies cultivadas. Algunos ejemplos, son los materiales silvestres de papa, fréjol, tomate, frutales tropicales y frutales subtropicales. También los bosques naturales del país contienen parientes silvestres de especies como aguacate (*Persea* spp.) y papaya (*Carica* spp.). Un caso muy conocido es el germoplasma de tomates silvestres ecuatorianos (*Lycopersicum esculentum* cerasiforme, *L. hirsutum* y *L. pimpinellifolium*), que ha sido utilizado para mejorar el contenido de vitamina C y de sólidos solubles, así como para ampliar el rango de cultivo de las variedades domesticadas. *Lycopersicum cheesmani*, endémico de las Islas Galápagos, tolera altos niveles de salinidad del suelo

y sequía, características que han sido aprovechadas para el fitomejoramiento de variedades comerciales. Las especies medicinales representan otro grupo de interés por su amplia variedad biológica y de usos (González 2002; Torres 2010).

Centros con especies

Los centros con especies se dividen en centros de fauna como lo son zoológicos, acuarios y centros de rescate; y centros de flora tales como jardines botánicos y viveros.

Conservación *in vitro*

La conservación *in vitro* es una modalidad complementaria para semillas de difícil conservación, plantas que no producen semilla, semillas de genotipos especiales cuya segregación se necesita evitar. Se conserva tejidos diferenciados en un medio sólido (meristemos, plántulas, tallos, raíces, microtubérculos, etc.), y tejidos no diferenciados en un medio líquido (callos, células en suspensión, otros).

Criopreservación

La criopreservación se refiere a la conservación a través del tiempo de germoplasma existente en forma de células u órganos a bajas temperaturas, cercanas a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$; consiste en almacenar material biológico en nitrógeno líquido, a cuya temperatura todo el metabolismo se suspende, pues teóricamente no existen daños biológicos en el proceso, salvo posibles cambios que involucran radiaciones ionizantes naturales (Jordan 2005b). En ese contexto, se menciona que los descensos de temperatura producen cristales de hielo extra celular y pérdida de agua celular; es así que, el enfriamiento lento produce daños por pérdida de agua celular (deshidratación), mayor concentración osmótica y desintegración de la membrana celular, el enfriamiento moderado puede dar lugar a pérdida parcial de agua, y el enfriamiento rápido no presenta estos daños pues no da tiempo a la salida de agua (Camarena *et al.* 2014).

La criopreservación permite la conservación de material de valor, omitiendo gastos operacionales *in vivo* e *in vitro* por períodos prolongados, lo cual es relevante en programas de mejoramiento genético de especies arbóreas o forestales (Smith 1997), que requieren superar un período largo de juvenilidad y/o esperar la expresión de características fenotípicas de las plantas sujetas a su conservación para su propagación sexual programada (Haines 1994); así como posibilita la conservación de

material en inminente peligro de extinción, el mantenimiento al alcance inmediato de material original genéticamente invariable a lo largo del tiempo.

En general el proceso es gradual con ciertas etapas, una de ellas es el acondicionamiento previo mediante cultivo de explantos en presencia de niveles altos de osmóticos y el uso de crioprotectores (sorbitol, manitol, otros). Los osmóticos reducen el contenido de agua intracelular de los explantos; y los crioprotectores impiden la formación de cristales de agua que puedan dañar estructuralmente las células. Así, se reduce gradualmente la temperatura del explanto por debajo del punto de congelación sin causar mayor daño. A continuación, se coloca el material ya protegido directamente en nitrógeno líquido, o en ocasiones se procede a una interfase de desecación previa mediante encapsulado del material en alginato de Ca (Jordan 2005b).

La crioprotección puede lograrse, por ejemplo, con combinaciones de dimetilsulfoxido (DMSO) (0.5 M hasta 15%) en presencia de glicerol, o puede incluir combinaciones de polietilenglicol (PEG) 10%, sorbitol 0.4 a 0.5 M, etilenglicol 10 a 15%, sacarosa 2 a 3%, glucosa 6 a 10%, prolina 0.5%; comúnmente bajando la temperatura a razón de 0.5 a 1.0°C por minuto hasta -40 °C, para luego sumergir en nitrógeno líquido. Mientras que, la

descongelación es más bien rápida hasta aproximadamente -40 °C, y después en presencia de algunos criopreservantes hasta el punto de congelación. Posteriormente, se transfiere el material a medios sin criopreservantes y se establece la temperatura usual de cultivo de 20 a 25°C (Jordan 2005b).

Propósitos de la conservación *ex situ*

Los propósitos de la conservación *ex situ* contemplan (Wyse y Sutherland 2000):

- El rescate de germoplasma amenazado, la producción de material para investigación.
- La producción de material para reintroducción, restauración y manejo de hábitats.
- El almacenamiento de germoplasma en bancos de semillas, colecciones de campo, bancos de germoplasma.
- El suministro de material a fin de reducir la presión contra la recolección de plantas silvestres.
- La disposición de material para programas de educación.

- La conservación de especies locales económicamente importantes, especies de interés científico, endémicas o pertenecientes a relictos geográficos.

Erosión genética

La erosión genética es un proceso de pérdida de recursos genéticos; involucra la pérdida de variabilidad genética existente en organismos individuales cuyos genomas son únicos, la pérdida de diversidad genética que existe entre individuos que componen una población de una especie, o entre varias poblaciones de esa misma especie, algunas de las cuales han alcanzado grados de divergencia reconocibles como niveles taxonómicos intraespecíficos como subespecies, razas o variedades. También incluye la disminución o desaparición de especies que componen las comunidades bióticas y los ecosistemas, en donde los ensambles e interacciones y adaptaciones suelen ser singulares (Dirzo y Raven 2003; Convention on Biological Diversity 2010; Butchart *et al.* 2010). La pérdida gradual de la diversidad por erosión genética ocurre en tres niveles: pérdida de especies, pérdida de diversidad, y pérdida de variabilidad por desaparición de genes responsables del valor adaptativo (Sevilla y Holle 2004).

Los parientes silvestres, que incluye a antepasados y otras especies más o menos vinculadas a los cultivos, contribuyen a la biodiversidad como fuentes génicas de resistencia a enfermedades, plagas y factores de estrés como sequías y temperaturas extremas; también han sido empleados para aumentar el valor nutricional de algunos cultivos, por ejemplo el contenido de calcio de la papa. Estos materiales amplían y enriquecen la diversidad genética de un cultivo en particular y deben ser conservados para enfrentar posibles riesgos que abarca la creciente uniformidad genética de las variedades cultivadas (Bioversity International 2006).

De 511 familias de plantas identificadas, sólo 173 tienen representantes domesticados. Por ejemplo, la familia de las Poaceae (antiguamente llamadas gramíneas) abarca el mayor número de especies domesticadas (370 especies), las leguminosas tienen 337 especies domesticadas de muy diferente origen, aunque fundamentalmente amazónico y mediterráneo, y Solanaceae contiene 115 especies domesticadas, provenientes principalmente de Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Hawksworth y Kalin-Arroyo 1995).

Aparte de las especies ya domesticadas, más de 10000 plantas se conocen como comestibles o útiles; éstas constituyen una reserva potencial para el desarrollo de

futuros cultivos y para una posible diversificación de fuentes alimenticias en un planeta donde la capacidad para producir suficientes alimentos de calidad para la población mundial tiende a disminuir por varias razones. Entre ellas se puede mencionar a la erosión genética, los costos crecientes de los alimentos y la disminución de la fertilidad de la tierra (desertificación) (González 2002). La contribución global de las regiones geográficas para la producción agroalimentaria e industrial basada en la riqueza de sus recursos genéticos, muestra que la región andino-amazónica contribuye 35.6% de la producción agroalimentaria, y 34.5% (área cubierta) de cultivos industriales (González-Rosquel 1997; Torres 2010).

Diversos factores como destrucción de hábitats, explotación forestal, cambios en los hábitos alimenticios, conversión de bosques en pastizales y/o plantaciones, inseguridad en la tenencia de la tierra que promueve la deforestación, conversión de los bosques y destrucción de otros hábitats naturales, causan la pérdida irreparable de especies y variedades, incrementando así la erosión genética de materiales vegetales (Josse 2000).

Referencias bibliográficas

Bioversity International. 2006. Parientes silvestres de cultivo. Proyecto parientes silvestres de cultivos. Bioversity International. Roma.

Butchart, S., Walpole, M., Collen, B., Van Strien, A., Scharlemann, J., Almond, R., Baillie, J., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., Carpenter, K., Carr, G., Chanson, J., Chenery, A., Csirke, J., Davidson, N., Dentener, F., Foster, M., Galli, A., Galloway, J., Genovesi, P., Gregory, R., Hockings, M., Kapos, V., Lamarque, J., Leverington, F., Loh, J., McGeoch, M., McRae, L., Minasyan, A., Hernández, M., Oldfield, T., Pauly, D., Quader, S., Revenga, C., Sauer, J., Skolnik, B., Spear, D., Stanwell-Smith, D., Stuart, S., Symes, A., Tierney, M., Tyrrell, T., Vié, J. y Watson, R. 2010. Global biodiversity: Indicators of recent declines. *Science* 328:1164-1168.

Cabrera, V. A., Dottori, N. y Cosa, M. T. 2010. Germinación, éxito reproductivo y fenología reproductiva de *Solanum chenopodioides* (SOLANACEAE). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 45(1-2):73-80.

CCTA (Coordinadora de Ciencia y Tecnología en los Andes). 2006. Proyecto Perú: Conservación *in situ* de cultivos nativos y sus parientes silvestres PER/98/G33. Informe de Cierre 2001-2005. Lima, Perú. 107 p.

CIP (Centro Internacional de la Papa). 1998. Raíces y tubérculos andinos: Informe sobre la colaboración en investigaciones de biodiversidad, 1993-1997. Lima, Perú. 27 p.

Consorcio GTZ. 2001. III Taller regional de conservación *ex situ*. Documento temático. Estrategia regional de biodiversidad para los países del trópico andino.

Convention on Biological Diversity. 2006. Framework for monitoring implementation of the achievement of the 2010 target and integration of targets into the thematic programmes of work, COP 8 Decision VIII/15 (www.cbd.int/decisions).

Dirzo, R. y Raven, P. 2003. Global state of biodiversity and loss. *Annual Reviews of Environment and Resources* 28:137–67.

González, E. 2002. Agrobiodiversidad. Documento temático preparado para la elaboración de la estrategia regional de biodiversidad para los países del trópico andino. Convenio de cooperación técnica no reembolsable ATN/JF-5887-RG. Comunidad Andina-Banco Interamericano de Desarrollo. Maracay, Venezuela.

González-Rosquel, V. 1997. La valoración económica de los recursos fitogenéticos de la región de América Latina y el Caribe. I Foro parlamentario venezolano-colombiano sobre diversidad biológica en áreas de interés común. Maracaibo.

Haines, R. 1994. Biotechnology in forest tree improvement. FAO Forestry Paper 118, Rome, Italy.

Hawksworth, P. M. y Kalin-Arroyo, M. T. 1995. Magnitude and distribution of biodiversity. En V. H. Heywood, y R. T. Watson (Eds.), *Global biodiversity assessment* (págs. 107-191). Cambridge University Press, Cambridge.

Jordan M. 2005b. Aplicaciones de la técnica de cultivo de tejidos. En H. Prieto, M. Jordan, L. Barrueto, M. Cordeiro, y D. Durzan (Eds.), *Bioteconología vegetal* (págs. 73-98). Colección Libros INIA N° 15, Santiago de Chile.

Josse, C. 2000. La biodiversidad del Ecuador. Informe 2000. Ministerio de Ambiente, EcoCiencia y Unión Mundial para la Naturaleza (UICN). Quito.

- Lascuráin, M., List, R., Barraza, L., Díaz, E., Gual, F., Maunder, M., Dorantes, J. y Luna, V. 2009. Conservación de especies *ex situ*. En A. Aguirre-Muñoz, R. Mendoza, y E. Campos (Eds.), *Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio* (págs. 517-544). CONABIO, México.
- Loy, J. B. y Evensen, K. B. 1979. Phytochrome regulation of seed germination in a dwarf strain of watermelon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 104:496-499.
- Nerson, H. y Paris, H. 1988. Effects of fruit age, fermentation and storage on germination of cucurbit seeds. *Scientia Horticulturae* 35(1-2):15-26.
- Prohens, J., Soler, S. y Nuez, F. 1999. The effects of thermotherapy and sodium hypochlorite treatments on pepino seed germination, a crucial step in breeding programmes. *Annals of Applied Biology* 134(3):299-305.
- Ruiz, M. 2009. El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. E. E. A. INTA Anguil. Publicación técnica N° 77:1-19.

Sevilla, R. y Holle, M. 2004. Recursos genéticos vegetales. Luis León Asociados S.R.L. Lima, Universidad Nacional Agraria La Molina. 445 p.

Smith, D. 1997. The role of *in vitro* methods in pine plantation establishment: the lesson from New Zealand. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 3:63-73.

Tapia C., Zambrano E. y Monteros, A. 2008. Estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y alimentación en el Ecuador: A más uso, más conservación. Publicación Miscelánea no. 114, INIAP. Quito. 101 pp.

Torres, M. de L. 2010. Agrobiodiversidad y biotecnología. *Polémika* 2(5). En línea <https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/polemika/article/view/380>

UBA. 2019. Biología de la conservación. Ex situ. Universidad de Buenos Aires. En línea <http://server.ege.fcen.uba.ar/biolocons/PDFs/Ex%20ositu.pdf>

Vallejo, F. y Estrada, E. 2002. Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira. 402 p.

Wyse, P. y Sutherland, L. 2000. International agenda for botanic gardens in conservation. Botanic Gardens Conservation International, U.K. 56 p.

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos vegetales se conoce también como cultivo *in vitro* de organismos vegetales o simplemente cultivo de tejidos; se basa en la totipotencialidad celular, que es la capacidad de una célula para regenerar a partir de ella, todos los diferentes tipos celulares que componen un organismo multicelular (Pérez 2006); consiste en el aislamiento experimental de explantos (protoplastos, células, tejidos u órganos), su posterior desinfección y siembra en un medio de cultivo nutritivo, y el suministro de condiciones ambientales, en cámaras de crecimiento que alcanzan temperaturas comprendidas entre 20 y 28 °C, con iluminación ajustada de 1000 a 5000 lux y humedad relativa entre 70 y 80% (Roca y Mroginski 1992a); el cultivo de tejidos abarca un conjunto de técnicas a desarrollarse en

laboratorio bajo condiciones estrictas de asepsia (Roca y Mroginski 1992a).

El cultivo de tejidos es el área biotecnológica con mayor aplicación práctica en la agricultura actual, representa una herramienta versátil para el estudio de problemas básicos y aplicados de la biología vegetal; constituye el puente necesario para llevar manipulaciones genéticas de laboratorio hacia el campo. Las técnicas de cultivo *in vitro* se fundamentan en principios como la totipotencialidad celular y el balance hormonal, contribuyen no sólo al mejor entendimiento de los eventos de diferenciación celular, sino al mejor aprovechamiento de los mismos y a la explotación más eficiente de las plantas. La totipotencialidad planteada por Schwann y Schleiden fue el núcleo del cultivo de tejidos y células; los primeros intentos sobre cultivo de tejidos realizados por Haberlandt en 1902 fracasaron debido a la utilización de un medio relativamente simple y tejidos vegetales demasiado diferenciados; en 1939 se consigue el primer cultivo de tejidos auténtico, y después de la segunda guerra mundial este campo biotecnológico se ha desarrollado muy a prisa (Thorpe 2007).

El cultivo de tejidos permite la propagación vegetal de grandes volúmenes en menor tiempo y el manejo de los mismos en espacios reducidos; es utilizado en la obtención de plantas libres de patógenos, conservación de

germoplasma y estudios de ingeniería genética (Seguí 2010); representa la posibilidad de hacer viable la aplicación de técnicas de ADN recombinante en el mejoramiento vegetal (Casal *et al.* (Eds.) 2000). Los términos propagación *in vitro* y micropropagación son usados para referirse al establecimiento, multiplicación y subsiguiente enraizamiento de brotes (Capuana y Giannini 1997).

Constituyentes del medio de cultivo

Los tejidos vegetales se cultivan en medios semisólidos que contienen agentes gelificantes o en medios líquidos; el tipo de medio depende del tipo de cultivo y su objetivo (Sathyanarayana 2007), la mayoría de medios son de composición conocida (Tabla 3.1), constituidos básicamente por carbono, sales minerales nutritivas, vitaminas, fitorreguladores, agente gelificante y, ocasionalmente otros compuestos asociados (Seabrook 1980); y otros en adición.

Tabla 3.1. *Composición de algunos medios para el cultivo de tejidos.*

Constituyentes	Medio de cultivo (mg·L ⁻¹)						
	White ^a	Heller ^b	MS ^c	ER ^d	B ₅ ^e	Nitsch ^f	NT ^g
Inorgánico							
NH ₄ NO ₃	-	-	1650	1200	-	720	825

KNO ₃	80	-	1900	1900	2527.5	950	950
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	75	440	440	150	-	220
CaCl ₂	-	-	-	-	-	166	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	750	250	370	370	246.5	185	1233
KH ₂ PO ₄	-	-	170	340	-	68	680
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	134	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	300	-	-	-	-	-	-
NaNO ₃	-	600	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	200	-	-	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₂ ·H ₂ O	19	125	-	-	150	-	-
KCl	65	750	-	-	-	-	-
KI	0.75	0.01	0.83	-	0.75	-	0.83
H ₃ BO ₃	1.5	1	6.2	0.63	3	10	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5	0.1	22.3	2.23	-	25	22.3
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	-	10	-	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3	1	8.6	-	2	10	-
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	-	-	-	-	-	-	8.6
ZnNa ₂ ·EDTA	-	-	-	15	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	-	-	0.25	0.025	0.25	0.25	0.25
MoO ₃	0.001	-	-	-	-	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	0.03	0.025	0.0025	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	0.025	0.0025	0.025	-	-
CoSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-	-	-	-	0.03
AlCl ₃	-	0.03	-	-	-	-	-
NiCl ₂ ·6H ₂ O	-	0.03	-	-	-	-	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	1	-	-	-	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5	-	-	-	-	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	27.8	27.8	-	27.8	27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	-	-	37.3	37.3	-	37.3	37.3
Sequestrene 330Fe	-	-	-	-	28	-	-

Tabla 3.1. Continuación.

Orgánico							
Inositol	-	-	100	-	100	100	100
Ácido nicotínico	0.05	-	0.5	0.5	1	5	-
Piridoxina·HCl	0.01	-	0.5	0.5	1	0.5	-
Tiamina·HCl	0.01	-	0.1	0.5	10	0.5	1

Glicina	3	-	2	2	-	2	-
Ácido fólico	-	-	-	-	-	0.5	-
Biotina	-	-	-	-	-	0.05	-
Sacarosa	2%	-	3%	4%	2%	2%	1%
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	12.7%

Fuente: Bhojwani y Razdan (1996); ^a White (1963), ^b Heller (1953), ^c Murashige y Skoog (1962), ^d Eriksson (1965), ^e Gamborg *et al.* (1968), ^f Nitsch (1969), ^g Nagata y Takebe (1971)

Carbono

Las células iniciales de un cultivo, en general, no son fotosintéticamente activas, requieren de una o más fuentes de carbono; sacarosa y glucosa de 2 a 5% (p/v) son los carbohidratos más usados en cultivo de tejidos vegetales (Smith 2000), también se usan otros compuestos como lactosa, galactosa, maltosa, fructosa y almidón (Saad y Elshahed 2012).

Sales minerales

La fuerza iónica total en un medio corresponde a la concentración total de sales minerales (McCown y Sellmer 1987); las sales se disuelven en agua y experimentan disociación e ionización (Tabla 3.2); es así que, los factores

activos dentro del medio de cultivo son los diferentes tipos de iones que se generan, y no sus constituyentes (Bhojwani y Razdan 1996).

Tabla 3.2. Hoja de balance de iones para los medios incluidos en la Tabla 3.1.

Ion	Unidad	Medio de cultivo						
		White	Heller	MS	ER	B ₅	Nitsch	NT
NO ₃	mM	3.33	7.05	39.41	33.79	25.00	18.40	19.69
NH ₄		-	-	20.62	15.00	2.00	9.00	10.30
Total N		3.33	7.05	60.03	48.79	27.03	27.40	29.99
P		0.14	0.90	1.25	2.50	1.08	0.50	5.00
K		1.66	10.05	20.05	21.29	25.00	9.90	14.39
Ca		1.27	0.51	2.99	2.99	1.02	1.49	1.50
Mg		3.04	1.01	1.50	1.50	1.00	0.75	5.00
Cl	uM	0.87	11.08	5.98	5.98	2.04	2.99	3.00
Fe		12.50	3.70	100.00	100.00	50.10	100.00	100.00
S		4502.00	1013.5	1730.00	1610.00	2079.90	996.80	5236.50

Tabla 3.2. Continuación.

Na	uM	2958.0	7966.0	202.00	37.20	1089.00	202.00	202.00
B		24.20	16.00	100.00	10.00	48.50	161.80	100.00
Mn		22.40	0.40	100.00	10.00	59.20	112.00	100.00
Zn		10.40	3.40	30.00	37.30	7.00	34.70	36.83
Cu		0.04	0.10	0.10	0.01	0.10	0.10	0.10

Mo		0.01	-	1.00	0.10	1.00	1.00	1.00
Co		-	-	0.10	0.01	0.10	-	0.10
I		4.50	0.06	5.00	-	4.50	-	5.00
Al		-	0.20	-	-	-	-	-
Ni		-	0.10	-	-	-	-	-

Fuente: Bhojwani y Razdan (1996)

Los denominados macroelementos Nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S), calcio (Ca), potasio (K) y magnesio (Mg) se requieren en cantidades superiores a 0.5 mmol·L⁻¹; mientras que, los microelementos hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), boro (B) y molibdeno (Mo), son necesarios en pequeñas proporciones, menores a 0.5 mmol·L⁻¹ (De Fossard 1976). El rol fisiológico de los nutrientes (Tabla 3.3) se basa en la capacidad de los elementos minerales para influenciar cambios en la turgencia celular y la permeabilidad de las membranas biológicas, para participar en diferentes reacciones catalíticas, otros (Duca 2015). El tipo y óptima concentración de nutrientes para alcanzar niveles máximos en el crecimiento de explantos varían según la especie (Saad y Elshahed 2012).

Tabla 3.3. *Rol de los diferentes elementos químicos importantes en fisiología vegetal.*

Elemento químico	Fuente	Funciones
Carbono	CO ₂	Es parte de la estructura de todos los componentes orgánicos.

Oxígeno	H ₂ O, O ₂	Es parte de la estructura de todos los componentes orgánicos.
Hidrógeno	H ₂ O	Es parte de la estructura de todos los componentes orgánicos.
Nitrógeno	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺	Es parte de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofila, nucleótidos, coenzimas.
Cloro, Sodio	Cl ⁻ , Na ⁺	Importante en el mantenimiento del equilibrio iónico y en la regulación de la presión osmótica.
Potasio	K ⁺	Asegura la conformación estructural de proteínas, importante en la apertura y cierre estomáticos, sirve como activador para varias enzimas.

Tabla 3.3. Continuación.

Fósforo	H ₂ PO ₄ ⁻ , HPO ₄ ²⁻	Es parte de la estructura de ácidos nucleicos, compuestos macroérgicos, fosfolípidos, participa en reacciones de fosforilación.
Magnesio	Mg ²⁺	Parte de la coenzima A y la clorofila.
Azufre	SO ₄ ²⁻	Parte de proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos.
Hierro	Fe ³⁺ , ²⁺	Importante en la síntesis de clorofila, citocromos y nitrogenasa.
Cobre, Magnesio	Cu ²⁺ , Mg ²⁺	Activadores enzimáticos.
Calcio	Ca ²⁺	Parte de la estructura de la pared celular, tiene un rol en la permeabilidad celular, cofactor enzimático.

Fuente: Duca (2015)

Vitaminas

La vitamina tiamina (B1) se considera importante para las células vegetales, otras tales como el ácido nicotínico o niacina (B3) y la piridoxina (B6) se añaden al medio pues posibilitan una mejora en la respuesta celular (Smith

2000). La tiamina añadida al medio (0.1 a 10.0 mg·L⁻¹) es necesaria y requerida por todas las células durante su crecimiento (Ohira *et al.* 1976); el ácido nicotínico se usa en concentraciones de 0.1 a 5.0 mg·L⁻¹; mientras que, la piridoxina se utiliza en cantidades de 0.1 a 10.0 mg·L⁻¹ (Saad y Elshahed 2012). La vitamina E se usa como antioxidante; la vitamina C previene el ennegrecimiento de explantos; la vitamina D se aplica tiene efecto regulador sobre el crecimiento; y la riboflavina inhibe la formación de callos y mejora el crecimiento y la calidad de los brotes (Drew y Smith 1986).

Fitorreguladores

Los fitorreguladores o reguladores del crecimiento o fitohormonas, son sustancias naturales o sintéticas que regulan la respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y humedad; ayudan a coordinar procesos esenciales para el normal desarrollo de las plantas (Doemer 2000; Wain 1980); se utilizan con frecuencia en cultivos *in vitro* porque asumen labores de vital importancia en procesos de elongación, tropismos y dominancia apical (Skoog y Miller 1957). Es necesario agregar al medio uno o más reguladores del crecimiento para sustentar el desarrollo de tejidos y órganos, fundamentalmente auxinas, citocininas y giberelinas

(Bhojwani y Razdan, 1996). A continuación se detallan los principales fitorreguladores:

Auxinas

Las auxinas se utilizan para promover la división celular y la proliferación de raíces, debido a su influencia en la formación de meristemos (George *et al.* 2008); auxinas junto a citocininas, son capaces de inducir crecimiento de callo, suspensiones celulares y órganos (Bhojwani y Razdan 1996).

Las auxinas naturales más comunes son el ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA), ácido fenilacético (AFA) y ácido indol propiónico (AIP) (Saad y Elshahed 2012), (Ludwig-Müller y Cohen 2002); el AIA es la principal auxina de plantas superiores, la más abundante pese a encontrarse comúnmente en concentraciones nanomolares, y fisiológicamente la más relevante; el AIB se clasificó inicialmente como auxina sintética, pero es un compuesto vegetal endógeno más eficiente que el AIA en promover la formación de raíces laterales, se usa comercialmente con dicho propósito (Jordan y Casaretto 2006); AIA y AIB se utilizan frecuentemente para enraizamiento, y en interacción con una citocinina para proliferación de brotes (Bhojwani y Razdan 1996).

Otras sustancias de origen sintético con actividad auxínica se utilizan como herbicidas, por su capacidad para funcionar como inhibidores al encontrarse en altas concentraciones (Duca 2015); entre las auxinas sintéticas se menciona al ácido naftoxi acético (ANO), ácido naftalen acético (ANA), ácido 2-4-diclorofenoxi acético (2,4-D), ácido 3-6-dicloro-2-metoxi benzoico (dicamba) y ácido 4-amino-3-5-6-tricloro picolínico (picloram) (Bhojwani y Razdan 1996); y otras como el ácido triclorofenoxi acético (2,4,5-T) y ácido para-clorofenoxi acético o 4-clorofenoxi acético (p-CPA, 4-CPA) (Mroginski *et al.* 2010); además, algunas se usan en procesos de enraizamiento, obtención de partenocarpia, cambio de sexo, otros (Duca 2015).

Las auxinas poseen actividades biológicamente similares a las del AIA, tienen la capacidad de promover elongación celular en coleóptilo y secciones de tallo, división celular de callos en presencia de citocininas, formación de raíces adventicias en hojas y tallos, otras (Taiz y Zeiger 2006); circulan principalmente a través del floema y parénquima de forma polar y en dirección basípeta, a una velocidad de 10 a 20 mm·h⁻¹; el transporte requiere de energía y puede ser bloqueado por presencia de alcaloides o falta de oxígeno (Duca 2015). Las auxinas se diluyen en etanol o hidróxido de sodio (NaOH) (Bhojwani y Razdan 1996); en general, AIA y 2-4-D se disuelven en un pequeño volumen de

alcohol etílico 95% (v/v); ANA, 2-4-D y AIA se diluyen en una pequeña cantidad de NaOH 1.0 N; se recomienda la preparación de soluciones frescas de AIA para el medio, debido a que solo pueden ser almacenadas en contenedores ámbar a 4 °C, por no más de una semana (Saad y Elshahed 2012).

Citocininas

Las citocininas o citoquininas se incorporan al medio para la generación de división celular y diferenciación de brotes adventicios a partir de callos y órganos (Bhojwani y Razdan 1996), también se han probado retardando la formación de raíces (Saad y Elshahed 2012). Las citocininas más utilizadas son la 6-bencil aminopurina (BAP), 6-dimetil aminopurina (2iP), N-2-furanilmetil-1-H-purina-6-amina (KIN), 6-4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenil aminopurina (ZEA, zeatina) y 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea (TDZ, thidiazuron); ZEA y 2iP son naturales, siendo la zeatina más efectiva (Saad y Elshahed 2012).

Los compuestos de citocininas se derivan de la base adenina, en su posición N6 muestran algunas sustituciones (Jordan y Casaretto 2006); la actividad funcional de citocininas ocurre en presencia de auxinas

(Duca 2015). Semillas verdes y tejidos meristemáticos, y principalmente meristemos apicales de raíz son ricos en síntesis de citocininas, desde allí el transporte es pasivo y ascendente, con flujo en dirección acrópeta (Duca 2015). Las citocininas se disuelven con adición de unas cuantas gotas de HCl o NaOH 1.0 N; para TDZ se puede utilizar el solvente dimetilsulfóxido (DMSO) que no daña el tejido vegetal y actúa como agente esterilizante (Saad y Elshahed 2012).

Giberelinas

Las giberelinas representan un amplio grupo de compuestos relacionados que, en contraposición a las auxinas, se definen más por su estructura química que por su actividad biológica; frecuentemente asociadas a promoción del crecimiento de tallo (Taiz y Zeiger 2006), deben su nombre al hongo *Gibberella fujikuroi*, del cual fueron identificadas por primera vez (Jordan y Casaretto 2006). Las giberelinas son moléculas diterpenoides tetracíclicas, se considera como la giberelina más activa al ácido giberélico (GA₃) (Duca 2015); recorren los flujos floemático y xilemático a una velocidad de 5 a 20 mm·h⁻¹, se mueven de forma similar a metabolitos orgánicos y se acumulan en áreas de crecimiento (Duca 2015); GA₃ es soluble en agua fría (Bhojwani y Razdan 1996).

Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es una hormona que inicialmente se designó como responsable de la abscisión en hojas; luego, se demostró que interviene de forma esencial controlando el desarrollo del embrión, induciendo su reposo e inhibiendo el crecimiento vegetativo (Barceló *et al.* 2001); ABA es requerido con frecuencia para un normal crecimiento y desarrollo de embriones somáticos, solo en su presencia éstos pueden asemejarse a embriones cigóticos (Ammirato 1988); además, el ABA ocasionalmente causa la inhibición del crecimiento de cultivos de callo y tallo (Pérez 2006).

Etileno

El etileno es una hormona en estado gaseoso que estimula la germinación de semillas, inhibe el crecimiento de tallos y raíces, controla procesos de maduración y senescencia; se produce en respuesta a situaciones de estrés (Barceló *et al.* 2001), también se genera cuando los constituyentes orgánicos del medio son expuestos a calor, oxidación, luz solar o radiación ionizante (Matthys *et al.* 1995). El etileno promueve o inhibe un mismo proceso cuando se trata con especies diferentes (Bhojwani y Razdan 1996).

Agente gelificante

Un agente gelificante es capaz de resistir a la esterilización por autoclavado, los agentes más utilizados en cultivo *in vitro* de organismos vegetales son agar, agarosa, Gelrite y Phytigel (Bhojwani y Razdan 1996).

Otros compuestos

La incorporación de agentes antioxidantes como L-cisteína, ácido ascórbico y polivinilpirrolidona previenen el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en explantos. El carbón activado (0.1 a 5.0%) suele incorporarse al medio con el fin de absorber metabolitos tóxicos para el cultivo (Mroginski *et al.* 2010).

pH del medio

El pH interviene en aspectos importantes como la solubilidad de sales, la disponibilidad de nutrientes y la gelificación adecuada del medio (Sathyanarayana 2007). El pH del medio se ajusta a valores entre 5.5 y 6.0 antes de ser autoclavado, añadiendo pequeñas cantidades de diluciones preparadas de NaOH o HCl, a concentraciones 0.1 o 1.0 N (Smith 2000), principalmente. Medios de cultivo con pH

inferior a 5.5 no gelifican apropiadamente, aquellos con pH superior a 6.0 son demasiado firmes (Murashige 1973).

Explantos, organogénesis y embriogénesis

El cultivo *in vitro* se inicia a partir de un explanto que puede ser un fragmento de tejido u órgano de cualquier parte de la planta (hoja, tallo, raíz, yemas, capítulos florales, anteras, otros). Los explantos se tratan con alcohol e hipoclorito de sodio o calcio y se lavan exhaustivamente con agua estéril para la eliminación superficial de microorganismos; se incuban en un frasco de cultivo adecuado (tubo de ensayo, matraz, caja petri, frasco magenta, otros) que contiene el medio de cultivo líquido o semisólido adicionado con agar, del que se nutrirán las células. Prosiguiendo, las células o tejidos se comportan de diferentes formas, dependiendo de los factores físicos del ambiente, pero principalmente del tipo de nutrientes y concentración fitohormonal de auxinas y citoquininas presentes en el medio (Camarena *et al.* 2014).

El término organogénesis o morfogénesis se refiere a la generación de nuevas formas y estructuras donde no las había (Jordan 2005a). La caulogénesis se produce a partir de callos que se cultivan bajo condiciones adecuadas de luz, temperatura y nutrientes, cuando el cociente citoquinina/auxina es elevado, iniciando en algunas células

una división ordenada (promeristemos) generadora de brote que desarrolla en tallo; la transferencia de explantos formados a un medio fresco con menor cociente citoquinina/auxina, usualmente carente de citoquininas, induce la formación de raíces en la base del tallo, dando origen a la rizogénesis.

Los callos forman raíces directamente a elevadas concentraciones de auxina, si los brotes se transplantan a medios con citoquinina se posibilita la inducción de nuevos brotes adventicios en su base, los cuales se separan y resiembran otra vez para formar más brotes adventicios; este proceso de multiplicación se repite indefinidamente antes de transferir los tejidos a medio de enraizamiento. Posteriormente, las plántulas formadas se transplantan a bandejas con tierra o mezcla de sustratos donde completan su desarrollo; para facilitar la aclimatación de las vitroplantas se mantiene una atmósfera con humedad relativa muy elevada, así como intensidad luminosa elevada y riego con soluciones nutritivas, luego se plantan en viveros o directamente en el campo (Jordan 2005a).

La embriogénesis ocurre cuando células cultivadas *in vitro* dan origen a estructuras con organización bipolar muy semejante a aquella para embriones producto del desarrollo de un óvulo fertilizado; el proceso *in vitro* se diferencia de la embriogénesis sexual, por lo cual se

denomina embriogénesis somática. En la embriogénesis directa los embriones se forman directamente a partir de células del explanto (células epidérmicas por ejemplo); mientras que, en la embriogénesis indirecta la estructura embriogénica se forma a partir de callo; los embriones somáticos germinan y desarrollan en plántulas completas que son transferidas a tierra, otra alternativa es la encapsulación en matrices gelatinosas para formar semillas artificiales (Jordan 2005a).

Esterilización de explantos

Los agentes desinfectantes (Tabla 3.4) se usan en la esterilización superficial de explantos; los tejidos se esterilizan entera y superficialmente antes de ser plantados en el medio nutritivo para librarlos de contaminantes microbiológicos (Bhojwani y Razdan 1996).

Tabla 3.4. Principales agentes desinfectantes de explantos.

Desinfectante	Concentración (%)	Duración (min)	Efectividad
Hipoclorito de calcio	9 a 10	5 a 30	Muy bueno
Hipoclorito de sodio	20	5 a 30	Muy bueno
Peróxido de hidrógeno	10 a 12	5 a 15	Bueno
Agua bromada	1 a 2	2 a 10	Muy bueno
Nitrato de plata	1	5 a 30	Bueno
Cloruro de mercurio	0.1 a 1	2 a 10	Satisfactorio
Antibióticos	4 a 50 mg·L ⁻¹	30 a 60	Bastante bueno

Fuente: Yeoman y Macleod, citado en Bhojwani y Razdan (1996).

La esterilización superficial de explantos se puede iniciar con la inmersión en alcohol etílico (etanol) 70% (v/v) durante 20 a 60 segundos, seguido de los demás desinfectantes (Mroginski *et al.* 2010); también se menciona el uso de alcohol isopropílico (Bhojwani y Razdan 1996).

El hipoclorito cálcico ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) se usa de 5 a 30 minutos (Smith, 2000), en concentraciones comprendidas entre 1 y 6% (p/v), dependiendo de la naturaleza del material a desinfectar; el $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ penetra los tejidos más lentamente y es menos tóxico que el hipoclorito sódico (Pérez 2006).

El hipoclorito sódico (NaOCl) es la lejía comercial diluida a una concentración general entre 5 y 25% (v/v); el NaOCl se aplica durante 5 a 30 minutos, seguido de varios enjuagues con agua destilada estéril (Smith 2000), pues hay plantas muy sensibles a este agente (Pérez 2006).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un antioxidante usado de 1 a 30 minutos en concentraciones de 3 a 10% (v/v); la interacción entre H_2O_2 y NaOCl es tóxica para los tejidos, por ello es importante enjuagar minuciosamente los explantos, después de cada procedimiento (Smith 2000); el H_2O_2 es considerado como un desinfectante eficaz, ejerce su actividad antimicrobiana oxidando componentes celulares de los microbios (Tortora *et al.* 2007).

El cloruro de mercurio (HgCl_2) se aplica generalmente en concentraciones de 0.1 a 1.0% (p/v) durante 2 a 10 minutos (Pérez 2006), es altamente efectivo para la esterilización superficial, y tremendamente tóxico. Hojas y células de plantas herbáceas se desinfectan con HgCl_2 al 0.1% (p/v) durante 1 a 3 minutos, segmentos nodales y apicales de plantas madereras por 8 a 10 minutos, y semillas durante 10 a 20 minutos (Iliev *et al.* 2010).

Los antibióticos más usados para eliminación de microorganismos son gentamicina y ampicilina, soluciones de 50 a 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 30 minutos; además, pueden ser aún más benéficos después de la desinfección con alcohol o cloro (Smith 2000).

El detergente sorbitán polioxietileno monolaurato (Tween-20) (0.01 a 0.1%) adicionado a las sustancias desinfectantes o el uso de unas gotas de Triton (Mroginski *et al.* 2010), pueden mejorar la efectividad de esterilización rompiendo la tensión superficial entre agua y explanto (Torres 2012).

Contaminación de cultivos

La contaminación de cultivos ocurre en cualquier instante durante el proceso de introducción, se genera por

transferencia de esporas a través del aire o contacto con superficies esterilizadas de forma incorrecta (Sathyanarayana 2007). Los microorganismos patógenos generalmente aparecen de 3 a 5 días después de la introducción (Torres 2012). Los principales agentes contaminantes se nombran a continuación.

a) El recipiente de cultivo

El aire en recipientes de cultivo debe hallarse libre de gérmenes; los recipientes se esterilizan por medio de autoclavado y se sellan con tapas especiales que impiden la contaminación interior y permiten un adecuado intercambio gaseoso (Pérez 2006).

b) El medio de cultivo

Los medios de cultivo se contaminan durante la manipulación manual después del autoclavado entre el 2 y 5% (Leifert *et al.* 1994). Algunas especies del género *Bacillus* sobreviven al autoclavado, después de ser expuestas a presión y temperaturas entre 110 y 120 °C, durante 20 minutos; por tal motivo, se recomienda el almacenamiento de los medios preparados por varios días antes de ocuparlos (Bhojwani y Razdan 1996). Previo a la esterilización del medio es fundamental considerar su composición, algunas sustancias termolábiles requieren procedimientos especiales de esterilización como la

filtración por membrana (Bhojwani y Razdan 1996; Pérez 2006).

c) El explanto

Los contaminantes superficiales del explanto se eliminan mediante agentes desinfectantes, aquellos que se encuentran dentro de los tejidos son difíciles de eliminar y se neutralizan con inclusión de fungistáticos o bacteriostáticos en el medio. Tratamientos para las plantas donantes con temperaturas de 35 a 40 °C también se utilizan para obtención de explantos libres de bacterias y hongos sistémicos (Roca y Mroginski 1992a).

d) El ambiente del área de cultivo

El aire que rodea el lugar de la siembra también tiene que ser estéril, las manipulaciones de material vegetal se realizan en cámaras de flujo laminar que permiten mantener en su interior estrictas condiciones de asepsia (Pérez 2006), y la utilización de luz ultravioleta (UV) para una mejor esterilización superficial, la cual interviene en la replicación de ADN de los agentes contaminantes causando su muerte (Sathyanarayana 2007).

e) El instrumental utilizado

Se aconseja trabajar con varios juegos, previamente esterilizados, de los mismos instrumentos (pinzas, bisturís, cucharillas, otros) y mantener su respectiva asepsia

colocándolos en alcohol etílico 70% durante 2 a 3 minutos y flameándolos cuidadosamente (Roca y Mroginski 1992b).

f) El operador

El operador es una fuente primaria de contaminación, es necesario lavarse las manos con abundante agua y jabón, y enjuagárselas con alcohol 70% previo al inicio del cultivo; además, se reduce la contaminación usando batas de laboratorio, máscaras, protectores de cabello y guantes limpios (Roca y Mroginski 1992b).

Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*

Las técnicas de cultivo *in vitro* más adoptadas en el área biotecnológica y de mayor aplicación práctica en la agricultura actual se presentan a continuación:

Cultivo de meristemos

El cultivo de meristemos que presentan gran estabilidad genética incluye yemas axilares y yemas apicales principalmente; es importante debido a que los meristemos apicales se encuentran por lo general libres de patógenos. Los meristemos son muy pequeños (0.8 mm), el aislamiento desde la planta madre se realiza bajo microscopio, con gran cuidado y habilidad para remover

primordios foliares sin estropear el ápice; los meristemas se forman directamente en tallos, su desarrollo no es un proceso *de novo* pues son tejidos ya organizados; ocasionalmente, se injertan a un patrón tierno (microinjertación), como un brote decapitado de semilla germinada *in vitro* que recibe un nuevo ápice, siendo de gran importancia para el cultivo de algunas especies arbóreas (Camarena *et al.* 2014).

Cultivo de anteras

La técnica del cultivo *in vitro* de anteras permite la inducción de doble haploides o haploides duplicados a partir de células gaméticas y el subsecuente doblaje cromosómico por medios químicos con colchicina; los métodos más usados son la hibridación interespecífica o intergenérica y el cultivo de gametos masculinos o femeninos en una etapa específica de desarrollo; por ejemplo un grano de polen en fase temprana de su ontogenia (microspora unicelular o uninuclear, cuya función es fecundar a la megaspora), que cambia de función y constituye un embrión de origen gamético reduciendo su porción cromosomal (n) (Jordan 2005a). La habilidad de regenerar plantas a partir de microsporas conlleva a la obtención de líneas homocigotas estables de un híbrido en un solo paso con la utilización de un menor

número de plantas para la detección de combinaciones deseadas, y acelerando el proceso pues de la generación F1 se pasa directamente al nivel de homocigosis de una generación F7. El resultado es la generación de plantas dihaploides (diploides homocigotas) que expresan un solo alelo para todas sus características y que son de enorme valor en programas de fitomejoramiento (Camarena *et al.* 2014).

Fusión de protoplastos

La fusión de protoplastos se usa en la producción de híbridos entre especies no relacionadas y especies afines que no se pueden cruzar naturalmente, permite la obtención de combinaciones génicas nucleares y citoplasmáticas que no se pueden obtener a través del mejoramiento convencional; los protoplastos son células vegetales desprovistas temporalmente de pared celular y aisladas bajo condiciones de cultivo. La técnica de fusión de protoplastos es importante para la incorporación de resistencia a herbicidas y características que dependen de la esterilidad citoplasmática.

La posibilidad de obtener, mantener y cultivar protoplastos surge hacia 1960, en la década siguiente se establecen grandes avances sobre aspectos básicos de

aislamiento y cultivo (Cocking 1960). La viabilidad de los protoplastos depende de las condiciones del medio de cultivo, su tonicidad y composición; bajo condiciones óptimas la delgada membrana plasmática unitaria mantiene la integridad de los organelos internos, así como de sus funciones metabólicas, y pueden regenerar su pared celular si parte de sus componentes nutritivos se encuentran presentes o pueden ser resintetizados, por ejemplo, en presencia de un conjunto de pentosas.

Los protoplastos son evidencia adicional de totipotencia celular, se puede regenerar plantas a partir de un protoplasto en particular, designándose al producto como protoclones; mientras que, la fusión posibilita recombinaciones genéticas que no ocurren naturalmente debido a incompatibilidad, así como la recombinación de genes pertenecientes a otras variedades, especies y plantas de otro género o familia (fusión interespecífica); no obstante, la forma final aleatoria de recombinación genética determina el producto de fusión alcanzado. Los productos de fusión más cercanos en parentesco tienen mayor probabilidad de expresarse como células totipotentes, y emprender respuestas morfogénicas conducentes a plantas; aunque la inestabilidad cariotípica de los productos de fusión es frecuente (Camarena *et al.* 2014).

Las fusiones somáticas crean productos diferentes a los de fusiones gaméticas, técnicamente es factible juntar dos protoplastos y fusionarlos, lo que implica la posesión de estructuras y propiedades en el citoplasma, incluyendo mitocondrias y otros plastidios; el aporte citoplasmático en fusión somática es compuesto, contrario al de fusión gamética donde solo el óvulo aporta al contenido citoplasmático; los protoplastos haploides son aún más importantes, sirven como excelente herramienta para la inducción de mutaciones con o sin fusión de otro material recombinante.

El aislamiento de protoplastos se realiza a partir de tejidos en crecimiento activo utilizando material de tamaño homogéneo; el tejido u órgano elegido desinfectado se coloca en solución estéril con agentes osmóticos (manitol, sacarosa) en alta concentración, lo cual conlleva a la plasmólisis del protoplasma, la contracción de la plasmalema y su separación de la pared celular; bajo tales condiciones, se subcultiva tejidos en un medio similar, pero conteniendo celulasa, pectinasa y en algunos casos hemicelulasas. La incubación con enzimas degrada la pared celular y sus restos se eliminan mediante centrifugación, posteriormente los remanentes enzimáticos se eliminan mediante varios subcultivos. Existen diferencias a considerar según el cultivo, por ejemplo, en gramíneas a diferencia de las paredes de dicotiledóneas que contienen además glucoarabinoxilanos,

las mezclas de celulasas con xilanasas y pectiliasas son más eficientes. Los factores a considerar son características como tamaño o pigmentación, pues la presencia de antocianinas puede utilizarse como indicador al fusionar protoplastos derivados de otras plantas (Camarena *et al.* 2014).

Polinización

La fertilidad a veces puede ser extremadamente baja por problemas de incompatibilidad genética, provocando la muerte de embriones en desarrollo, o completando sólo parte de su desarrollo (Raghavan y Srivastava 1982). La polinización *in vitro* se aplica para superar la no formación de semilla en programas de hibridación que transfieren polen viable de un progenitor al estigma receptor del otro progenitor. Existen genes de incompatibilidad que evitan cruzamientos interespecíficos naturales, así como en otros casos el problema se da entre variedades incompatibles.

Las barreras pre-cigóticas de la fertilización *in vitro* impiden la germinación del polen y/o crecimiento del tubo polínico, por lo que el cigoto no se forma; entre ellas destacan la incapacidad del polen para germinar en estigmas foráneos, fallas del tubo polínico para alcanzar el

óvulo debido a excesiva longitud del estilo o lento crecimiento del tubo polínico. En relación a las barreras post-fertilización, se produce el cigoto, pero éste no es aceptado por el endosperma; la fertilización podría ocurrir normalmente, pero el embrión híbrido no alcanza la madurez debido a incompatibilidad embrión endospermo o por pobre desarrollo del endospermo; la falta de nutrición del cigoto por parte del endosperma, provoca su desintegración o aborto (Dimantoglou y Banilas 1996).

En la polinización *in vitro* y desarrollo de embriones se extrae los ovarios de las flores, y previa escisión del estilo después de unos pocos días ocurre la fertilización en un medio del cultivo; bajo estas circunstancias, se promueve el desarrollo de dichos embriones subcultivándolos en estadios tempranos de su ontogenia, y retirándolos de factores inhibitorios del tejido placentar materno, de modo que, se posibilita el rescate de embriones derivado de combinaciones que no sucediesen en la naturaleza (Raghavan y Srivastava 1982); además se usa en la obtención de material con características juveniles de mayor potencial regenerativo para multiplicación clonal, material libre de patógenos debido a que la frecuencia de transmisión a través de gametos es sólo de un 5%, y material mutante pues es posible someter polen (haploide) a tratamientos mutagénicos y luego polinizar los ovarios (Jordan 2005b).

Inducción de mutaciones

La inducción de mutaciones *in vitro* con sustancias químicas (etilmetanosulfonato, colchicina) o agentes mutagénicos físicos (rayos X, rayos gamma), la irradiación o exposición a radiaciones ionizantes es el método más usado. Las denominadas quimeras se obtienen al irradiar semillas, porciones de plantas con yema o plantas enteras; el meristemo irradiado contiene células mutadas y no mutadas, para la obtención de mutantes completos, después de la inducción se desarrollan brotes adventicios que generalmente se originan a partir de una única célula. La inducción de mutaciones *in vitro* es una herramienta útil para el fitomejorador, pues se obtiene con frecuencia micromutaciones que afectan el tamaño de planta, color de flor, otros, mientras que otras características deseables se mantienen (Camarena *et al.* 2014).

Variación somaclonal

La variación somaclonal es un fenómeno observado en protoplastos, células en suspensión, explantos de hojas, tejidos desorganizados (callos), y otros tipos de material; las variaciones fenotípicas y genotípicas aparecen sin mediar causa conocida, y presentan efectos diversos y

aprovechables que pueden ser heredables y no heredables, que se reconocen y seleccionan posterior a la regeneración derivada del cultivo de células que forman somaclones (Larkin y Scowcroft 1981).

La variación somaclonal puede causar cambios leves de carácter genético y epigenético en uno o más cromosomas, y no se transmite meióticamente. Los cambios genéticos asociados con variación somaclonal, corresponden a mutaciones puntuales, cambios en el cariotipo, cambios crípticos asociados con rearrreglos cromosomales (poliploidía, aneuploidía), secuencia alterada del número de copias y de elementos transponibles, entrecruce somático (*crossing over*), intercambio de cromátidas hermanas, amplificación de ADN y delección (Jain y De Klerk 1998), o referidos a un locus particular con cambios en un solo gen (Dennis *et al.* 1987).

El concepto de variación somaclonal apareció en la literatura hacia 1980, y durante un período de diez años numerosos reportes respecto a especies frutales evidenciaron su generalización como fuente de variabilidad (Hammerschlag 1992), denominándose al material derivado cuyas características difieren de la planta donante como protoclones y si derivan de callo como calliclones (Jordan 2005b). En América Latina el uso de variantes somaclonales se intensificó para la

obtención de plantas resistentes a la roya y el virus del mosaico de la caña de azúcar, por ejemplo (Camarena *et al.* 2014).

No hay certeza para afirmar que esta variación existe por acumulación de mutaciones somáticas en células vegetativas y que sólo se manifiesta en cultivos *in vitro*, o por ejemplo que elevadas concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo causan alta incidencia de mutantes; talvez ambas causas operen, lo cierto es que la variación somaclonal generada o manifestada *in vitro* es factible de emplearse en la obtención de gran cantidad de variantes genéticas de cultivos establecidos (Camarena *et al.* 2014).

Propagación *in vitro*

La propagación *in vitro* o micropropagación es la herramienta biotecnológica comercial, para la regeneración de plantas a partir de órganos, tejidos, células o protoplastos. Además, es un prerrequisito en programas de mejoramiento vegetal; pues, antes de obtener una planta completa a partir de un explanto modificado genéticamente y capaz de generar otras nuevas, es necesario el establecimiento de un protocolo viable de propagación *in vitro* (Sathyanarayana 2007).

Las fases que componen la propagación *in vitro* pueden resumirse en (Figura 3.1): establecimiento o inicio de un

cultivo axénico (Iliev *et al.* 2010), multiplicación de brotes, su subsecuente enraizamiento y aclimatación de las vitroplantas generadas al ambiente externo (Castillo 2004; Morales y Vaca 2016).



Figura 3.1. Inicio de un cultivo axénico; multiplicación de brotes; enraizamiento; y aclimatación de vitroplantas de tzímballo al ambiente externo.

La micropropagación consiste en la propagación vegetativa en masa para la obtención de material genéticamente homogéneo (clones). Los procesos más comunes son el cultivo de meristemos seguido de multiplicación por brotes adventicios, y la embriogénesis directa a partir de tejidos somáticos; en ambos casos se obtienen frecuencias de multiplicación elevadas y gran estabilidad genética, que hacen muy eficiente el proceso, pues se evita fases con tejidos desorganizados o desdiferenciados (callos) (Camarena *et al.* 2014).

Es posible producir cientos de miles de individuos clonales a partir de una sola planta madre en cuestión de meses; no obstante, se requiere mucha mano de obra y el costo de

producción de micropropágulos supera al de plántulas producidas por metodologías tradicionales. Debido a esto, la micropropagación comercial se desarrolla con especies de alto valor agregado, principalmente ornamentales como flores de corte, follaje o algunas hortalizas (Camarena *et al.* 2014).

Referencias bibliográficas

Ammirato, P. 1988. Role of ABA in regulation of somatic embryogenesis. *HortScience* 23:520.

Barceló Coll, J., Nicolás, G., Sabater, B. y Sánchez, R. 2001. *Fisiología vegetal*. Madrid, España: Pirámide.

Bhojwani, S. S. y Razdan, M. K. 1996. *Plant tissue culture: Theory and practice* (Ed. rev.). Delhi, India: ELSEVIER. 767 p.

Camarena, F., Chura, J. y Blas, R. 2014. *Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas*. UNALM/AGROBANCO. 278 p.

Capuana, M. y Giannini, R. 1997. Micropropagation of young and adult plants of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *The Journal of horticultural science* 72(3):453-460.

- Casal, I., García, J., Guisán, J. y Martínez, J. (Eds.). 2000. La biotecnología aplicada a la agricultura. Madrid, España: SEBIOT.
- Castillo, A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA 382:1-8.
- Cocking, E. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187:927-929.
- Dennis, E., Bretell, R. y Peacock, W. 1987. A tissue culture induced Adh 1 null mutant maize results from a single base change. *Molec. Gen. Genet.* 210:181-183.
- Dimantoglou, S. y Banilas, G. 1996. *Pinus pinea* L. (stone pine) and *Pinus halepensis* Mill. (Aleppo pine). En Y. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry 35. Trees IV* (págs. 389-406). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.
- Doemer, P. 2000. Cell division regulation. En B. Buchanan, W. Gruissem, y R. Jones (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants* (págs. 528-567). USA: American Society of Plant Physiologists.

Drew, R. A. y Smith, N. G. 1986. Growth of apical and lateral buds of pawpaw (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. *Journal of Horticultural Science* 61(4):535-543.

Duca, M. 2015. *Plant Physiology*. Switzerland: Springer International Publishing.

Eriksson, T. 1965. Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiologia Plantarum* 18(4):976-993.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50(1):151-158.

George, E. F., Hall, M. A. y De Klerk, G. J. 2008. *Plant propagation by tissue culture* (3ra ed., Vol. 1). Dordrecht, The Netherlands: Springer Science & Business Media.

Hammerschlag, F. 1992. Somaclonal variation. En F. Hammerschlag, y R. Litz (Eds.), *Biotechnology of perennial fruit crops* (págs. 35-55). CAB-International, Wallingford, U.K.

Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives *in vitro*. Ann. Sci. Natl. Biol. Veg. 14:1-223.

Iliev, I., Gajdosová, A., Libiaková, G. y Jain, S. 2010. Plant micropropagation. En R. H. Zimmeman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag, y R. H. Lawson (Eds.), *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops* (págs. 333-342). Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers.

Jain, S. y De Klerk, G. 1998. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4:63-75.

Jordan M. 2005a. Estadios del cultivo de tejidos. En H. Prieto, M. Jordan, L. Barrueto, M. Cordeiro, y D. Durzan (Eds.), *Bioteconología vegetal* (págs. 55-98). Colección Libros INIA N° 15, Santiago de Chile.

Jordan M. 2005b. Aplicaciones de la técnica de cultivo de tejidos. En H. Prieto, M. Jordan, L. Barrueto, M. Cordeiro, y D. Durzan (Eds.), *Bioteconología vegetal* (págs. 73-98). Colección Libros INIA N° 15, Santiago de Chile.

- Jordan, M. y Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. En F. A. Squeo, y L. Cardemil (Eds.), *Fisiología vegetal* (págs. 3-10). La Serena, Chile: Ediciones Universidad de La Serena.
- Larkin, P. y Scowcroft, W. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.
- Leifert, C., Morris, C. E. y Waites, W. M. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13(2):139-183.
- Ludwig-Müller, J. y Cohen, J. D. 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum* 115(2):320-329.
- Matthys, D., Gielis, J. y Debergh, P. 1995. Ethylene. En Aitken-Christie, J., Kozai, T. y Smith, M. (Eds.), *Automation and environmental control in plant tissue culture*. (págs. 473-491). Dordrecht: Kluwer.
- McCown, B. H. y Sellmer, J. C. 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture. En J. F.

Pérez (Ed.), *Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en la agricultura*. San Cristóbal de La Laguna, España: Arte Comunicación Visual S.L.

Morales, J. y Vaca, I. 2016. Propagación *in vitro* de tzímbalo (*Solanum caripense* Dunal). Revista Tecnológica ESPOL-RTE 29(2):89-104.

Mroginski, L. A., Sansberro, P. y Flaschland, E. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, y L. Mroginski (Eds.), *Bioteconología y mejoramiento vegetal II* (págs. 17-24). Argentina: ArgenBio.

Murashige, T. 1973. Sample preparations of media. En P. F. Kruse, y M. K. Patterson (Eds.), *Tissue culture methods and applications* (págs. 698-703). New York, USA: Academic Press.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.

Nagata, T. y Takebe, I. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99(1):12-20.

- Nitsch, J. P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19:389-404.
- Ohira, K., Makoto, I. y Ojima, K. 1976. Thiamine requirements of various plant cells in suspension culture. *Plant and Cell Physiology* 17(3):583-590.
- Pérez, J. F. 2006. Cultivo *in vitro* de plantas y sus aplicaciones en la agricultura. San Cristóbal de La Laguna, España: Arte Comunicación Visual S.L.
- Raghavan, V. y Srivastava, P. 1982. Embryo culture. En B. Johri (Ed.), *Experimental embryology of vascular plants* (págs. 195-230.). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.
- Roca, W. M. y Mroginski, L. A. 1992a. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT.
- Roca, W. M. y Mroginski, L. A. 1992b. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En W. M. Roca, y L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (págs. 9-11). Cali, Colombia: CIAT.

- Sathyanarayana, B. N. 2007. Plant tissue culture: Practices and new experimental protocols. I. K. International Pvt. Ltd.
- Saad, A. I. y Elshahed, A. M. 2012. Plant tissue culture media. En A. Leva, y L. Rinaldi (Eds.), *Recent advances in plant in vitro culture* (págs. 29-34). InTech.
- Seabrook, J. E. 1980. Laboratory culture. En E. J. Staba (Ed.), *Plant tissue culture as a source of biochemicals* (págs. 1-20). Florida, USA: C.R.C. Press.
- Seguí, J. M. 2010. Biología y biotecnología reproductiva de las plantas. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Smith, R. H. 2000. Plant tissue culture: Techniques and experiments. College Station, Texas, USA: Department of Soil and Crop Sciences, Texas A&M University.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal (Vol. 2). Los Ángeles, California, USA: Universitat Jaume I.

- Thorpe, T. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37(2):169-180.
- Torres, K. C. 2012. Tissue culture techniques for horticultural crops. New York, USA: Springer Science & Business Media.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. 2007. Introducción a la microbiología. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Wain, R. L. 1980. El control químico del crecimiento de las plantas. En N. R. Ondarza (Ed.), *Los reguladores de las plantas y los insectos* (págs. 13-27). México: CONACYT.
- White, P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells (2da ed.). New York, USA: The Ronald Press.

EXPRESIÓN GÉNICA Y TRANSCRIPTOS DE INTERÉS AGROINDUSTRIAL

La expresión génica posibilita la identificación de transcritos relevantes para el mejoramiento de cultivos trascendentales, refleja cambios en la transcripción ante una situación específica del tejido, tratamiento o estado de desarrollo; tales cambios son inducidos por una serie compleja de eventos de transducción de señales, muchos de los cuales no están esclarecidos (Zhu 2002). Los estudios de expresión génica usan diferentes estrategias para el análisis diferencial de respuesta frente a estrés biótico o abiótico, heterogeneidad ecológica, otros. La cuantificación de expresión génica puede ser absoluta o relativa (Rivas 2010), o determinarse por análisis comparativos de muestras coloreadas con bromuro de etidio en gel (Blas *et al.* 2010).

El término expresión génica abarca el proceso de activación del gen hasta que la enzima llega al sitio preciso y realiza su función, de modo que una proteína dada pasa a favorecer la expresión del fenotipo; el nivel de expresión de todo gen se analiza con gran efectividad mediante su

detección y cuantificación. El estudio de genética y biología molecular en plantas proporciona herramientas para la preservación, restauración de hábitats y minimización del riesgo de extinción, por la conservación de especies como entidades dinámicas capaces de evolucionar de cara a las condiciones cambiantes (Primack *et al.* 2001); la aplicación de estas herramientas a especies raras y comunes permite obtener una idea de su resiliencia, potencial evolutivo y capacidad de supervivencia; la toma de decisiones en conservación se fundamenta con un enfoque renovado en estudios de genética cuantitativa y expresión génica (Kramer *et al.* 2009).

En los últimos años surgió una nueva tecnología diseñada para la cuantificación eficaz de amplicones, en la cual se emplea moléculas fluorescentes, que mediante unión a ácidos nucleicos permiten valorar la cantidad presente de ADN en cada ciclo; la técnica de la transcripción inversa o retrotranscripción seguido de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) o en tiempo real, disminuye considerablemente el tiempo de los experimentos y aumenta notablemente la especificidad y sensibilidad de las reacciones (Bonilla *et al.* 2002). La evaluación de ARNm con métodos clásicos requiere gran cantidad de muestra, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha tenido un fuerte impacto desde su

creación, sin embargo la cuantificación de ARNm es problemática principalmente debido a la naturaleza exponencial de la reacción; pequeñas diferencias en la amplificación pueden alterar significativamente el rendimiento del amplicón.

La actividad génica empieza con la transcripción que consiste en la síntesis de una molécula de ARN utilizando una cadena molde de ADN, la cual se extiende desde una secuencia promotora hasta una secuencia terminadora; la reacción involucrada es catalizada por la enzima ARN polimerasa (Rodríguez 2006). Todos los genes se expresan en diferente forma, se encienden o apagan en distintos momentos del ciclo vital de un organismo; la regulación de genes varía según su función, los genes toman el nombre de la enzima que codifican.

El proceso de cuantificación mediante RT-qPCR se realiza en un termociclador, que resulta ser un espectrofluorómetro, lo cual disminuye el riesgo de contaminación en el laboratorio y aumenta el rendimiento del trabajo; RT-qPCR presenta muchas más ventajas que los métodos tradicionales aplicados al análisis de expresión génica, en los que se utiliza geles de agarosa en electroforesis para la obtención de un resultado cualitativo (Vinueza-Burgos 2009), o semicuantitativo. La cuantificación de ARNm es un proceso complicado,

mínimas diferencias en la amplificación afectan de manera importante el rendimiento del amplicón; la nueva tecnología permite la cuantificación efectiva de amplicones de ADN complementario (ADNc) (Wong *et al.* 2005).

La sensibilidad, rapidez, exactitud y especificidad de la RT-qPCR se utiliza para el análisis de expresión génica de modo más preciso que con técnicas convencionales, permitiendo la obtención de medidas cuantitativas de pequeñas cantidades muestrales que son valiosas en la detección de genes particularmente interesantes en diagnóstico de enfermedades genéticas, metabólicas, autoinmunes, y otras aplicaciones (Valasek *et al.* 2005).

Aplicación de técnicas moleculares

El análisis de expresión génica mediante la aplicación de técnicas moleculares desarrolladas y estandarizadas de manera óptima y con alta precisión, incluye diseño y síntesis de oligonucleótidos, extracción y cuantificación de ARN, síntesis de ADN complementario (ADNc) con transcriptasa inversa (RT, *reverse transcriptase*), transcripción inversa seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR), otras (Chiluisa-Utreras *et al.* 2017; Kumari 2012; López 2008; Lucca 2011; Rivas 2010; Tello 2016).

Generalidades acerca de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos también se conocen como detonadores, cebadores, primadores, amplímeros o *primers*, son moléculas de ADN de cadena individual y longitud corta, 10 a 30 nucleótidos; se hibridan complementariamente a una cadena sencilla de ADN patrón (molde o sustrato) mediante amplificación, utilizando la enzima catalizadora ADN polimerasa y obteniendo como resultado la síntesis de cadenas largas de polinucleótidos al incorporar monómeros de trifosfato de desoxinucleósido al grupo libre 3'-hidroxilo del detonador en dirección 5'→3' (Camarena *et al.* 2014).

Hibridación es la asociación específica y complementaria de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos que responde a un proceso físico de anillamiento, alineamiento, ensamblaje o anclaje de detonadores (dos cadenas individuales forman enlaces de hidrógeno entre sus bases complementarias) para la formación de una doble cadena helicoidal y complementaria a la secuencia patrón. La temperatura de fusión (T_m , 50% de los pares de bases son hibridados) de un detonador depende de su contenido de G + C, condiciones físico químicas y longitud de las secuencias implicadas. Una manera usual para el cálculo de T_m es (Pinzón 2007):

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Se menciona que originalmente calculada en una concentración salina 1.0 M para pruebas de hibridación de oligonucleótidos; sin embargo, es inexacto si los iniciadores tienen más de 20 nucleótidos (nt) y requiere de correcciones para la concentración salina (Camarena *et al.* 2014). Por su parte, la temperatura de anillamiento (T_a) depende de la longitud y composición de los detonadores; comúnmente se utiliza temperaturas de anillamiento 5 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) más baja del par de *primers* utilizados (Innis *et al.* (Eds.) 1990; Pinzón 2007).

Para el diseño y síntesis de oligonucleótidos se debe considerar algunos parámetros esenciales (Camarena *et al.* 2014): longitud corta de 10 a 30 nucleótidos, hibridación estable de un oligonucleótido con la región objetivo del ADN patrón, estabilidad interna del oligonucleótido, ausencia de complementariedad interna en el oligonucleótido, ausencia de complementariedad con otro oligonucleótido, contenido de G + C entre 40 y 60%, y no deben ser palindrómicos.

Extracción de ARN

El ARN se degrada fácilmente (muy lábil) a causa de ARNasas y alta temperatura; la adecuada extracción y purificación de ARN total o ARNm, mediante inhibidores de ARNasas, temperaturas inferiores a 4 °C, guantes para su manipulación, etc., es fundamental para continuar con la síntesis de ADNc (Maniatis *et al.* 1982). A menudo, las reducidas concentraciones de ARN se deben a pérdida de una parte apreciable tras el proceso de aislamiento (Díaz-Alonso 2013).

El análisis de expresión génica requiere ARN de alta calidad y estable (Rivas 2010); en general, el mecanismo de extracción para ARN total se basa en la tecnología de adsorción y desorción sobre membranas de sílice; se tritura y homogeniza cada muestra en presencia de una solución salina (tiocianato de guanidina) con gran cantidad de iones caotrópicos, la cual crea un entorno hidrofóbico que rodea al ARN y le permite unirse a una membrana de sílice tras el centrifugado con etanol, y que además posee actividad inhibidora de ARNasas (Chirgwin *et al.* 1979; Maniatis *et al.* 1982); a continuación, se remueve impurezas por medio de varios lavados (Vogelstein y Gillespie 1979), y se eluye el ARN en agua libre de ARNasas. Otros métodos incluyen la extracción de

ARN usando fenol-cloroformo, y otras sustancias como dodecil sulfato de sodio (SDS) (Araujo y Rao 2013).

Una vez extraído el ARN se encuentra disponible para una variedad de aplicaciones, ejemplos de estas últimas incluyen ensayos de protección contra nucleasas, análisis de expresión génica, librerías de ADNc, secuenciación de ARNm, otras. La eliminación de restos contaminantes en muestras de ARN se logra con aplicación de la enzima ADNasa I que evita la amplificación de ADN genómico (ADNg) coeluido (Stephenson 2012), y minimiza la sobreestimación de expresión génica (falsos positivos) a causa de fragmentos amplificados de origen distinto al ADNc del gen de interés (Rivas 2010; Lucca 2011).

Síntesis de ADN complementario con transcriptasa inversa

Las moléculas de ARNm se copian a ADNc por medio de una enzima transcriptasa inversa (RT) junto con un detonador; entre las enzimas más difundidas se menciona la del Virus de Leucemia Murina Moloney (MMLV) y la del Virus de la Mieloblastosis Aviar (AMV) (Kubista *et al.* 2006). En algunos casos, la adición de un oligo (dT) de unos 18 a 20 nucleótidos que contiene solo timinas, direcciona la hibridación del detonador con la cola poli-A de ARNm de la mayoría de organismos eucariontes,

facilitando la síntesis de ADNc y su posterior amplificación (Kubista *et al.* 2006; Malo *et al.* 2015). Las cantidades producidas de ADNc son un reflejo del ARNm inicial (Roche 2010).

Transcripción inversa seguido de PCR semicuantitativa (RT-PCR) y transcripción inversa seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR)

RT-qPCR (o en tiempo real) básicamente conserva el principio de RT-PCR (o convencional o de punto final), diferenciándose en que la amplificación puede monitorearse en cada ciclo mediante una sustancia afín (fluoróforo) a la molécula de ADN, un colorante que se añade e intercala en el surco menor de la doble cadena (Fernández 2011), y emite fluorescencia cada vez que procede una nueva síntesis (Primrose y Twyman 2006). RT-qPCR es una técnica de alta sensibilidad que utiliza muestras con poca cantidad de hebra patrón inicial (Deepak *et al.* 2007; Gachon *et al.* 2004). En general, las reacciones en tiempo real se ensamblan con reactivos (reversibles) que se unen a ADN de doble hebra, tales como *SYBR® Green*, *EvaGreen™*, *BrightGreen®*, cuyas longitudes de onda para absorbanza máxima y emisión máxima de fluorescencia son 497 nm y 525 nm, respectivamente, u otras sustancias químicas; el producto específico se verifica mediante la temperatura de fusión

(T_m) del amplicón, que depende de su composición nucleotídica y posibilita la identificación de señales del producto correcto a través del pico de fluorescencia, en la curva de disociación. También se utilizan sondas específicas (irreversibles) para la secuencia de interés. Taqman que contiene reporteros (fluoróforo) en el extremo 5' y apagadores en el extremo 3', para cada ensayo de qPCR; el reportero se libera por hidrólisis de la sonda y emite fluorescencia proporcional a la cantidad del producto amplificado; sondas Scorpions, otras (Bustin 2002).

El proceso de qPCR consiste de una fase inicial con fluorescencia mínima que no rebasa el ruido de fondo (*background*) del medio circundante en los primeros ciclos, en la cual se calcula la línea base; a continuación una fase exponencial temprana y emisión de fluorescencia que rebasa el umbral definido, el ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral se denomina C_T (ciclo umbral o *threshold cycle*) o C_p (punto de cruce o *crossing point*), aquí el producto dobla en cantidad cada ciclo, es representativo de la cantidad inicial de hebra molde y se usa en cálculos posteriores; luego una fase lineal de amplificación enlentecida junto a agotamiento de componentes y degradación de productos; y al final una fase estacionaria en la que reactivos y equipo llegan al límite de detección (Kubista *et al.* 2006; Wong y Medrano 2005) (Figura 4.1).

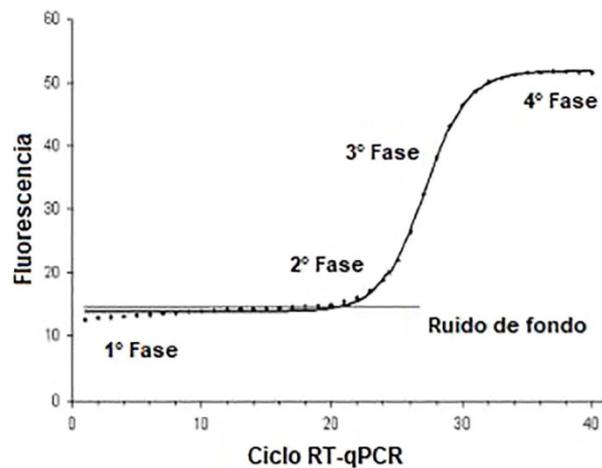


Figura 4.1. Fases de la transcripción inversa seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR).

Fuente: Fernández (2011)

La curva de fluorescencia real en función del número de ciclos presenta R_n^+ que es el valor de fluorescencia cruda normalizada (R_n , *normalized raw fluorescence*) de una reacción que contiene todos los componentes (muestra de interés, blanco, GOI, *gene of interest*), R_n^- que es el valor de una muestra sin reaccionar (valor base o valor detectado en NTC, *no template control*), y delta R_n (ΔR_n) que es la diferencia entre R_n^+ y R_n^- , un indicador de la magnitud de señal generada por la PCR (Dorak 2012) (Figura 4.2).

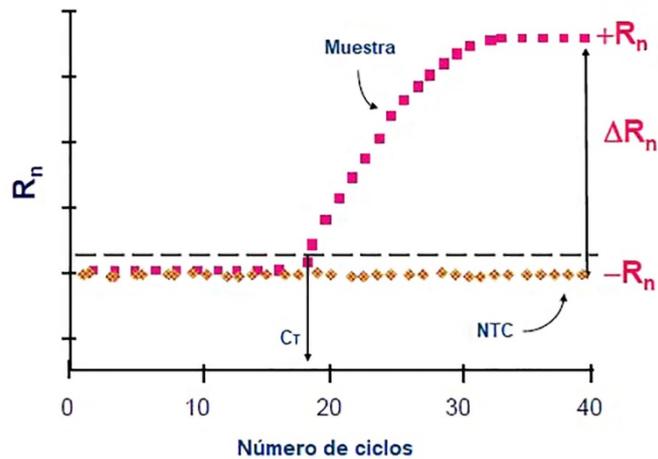


Figura 4.2. Curva de fluorescencia real para RT-qPCR.

Fuente: Fernández (2011)

Electroforesis

La electroforesis separa macromoléculas cargadas a causa de la diferente movilidad que éstas presentan al estar influenciadas por un campo eléctrico, se usa para verificación de la integridad de ácidos nucleicos (Figura 4.3); ADN y ARN son macromoléculas cargadas negativamente debido a grupos fosfato en su estructura (Camarena *et al.* 2014). La separación efectiva de los fragmentos de ADN o ARN (resolución) depende de su masa y carga (Técnicas Avanzadas en Biología Molecular 2001); y se lleva a cabo en geles de agarosa o poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida a concentraciones entre 3.5 y 20.0% (p/v) son efectivos para separar fragmentos pequeños (5 a 500 pb) debido a su alto

poder de resolución, bajo condiciones apropiadas fragmentos diferenciados en su longitud por un solo par de bases se resuelven fácilmente (Camarena *et al.* 2014); mientras que, los geles de agarosa a concentraciones típicas entre 0.5 y 2.0% (p/v) separan fragmentos más grandes (2 a 60 kb), y tienen menor poder de resolución. Adicionalmente, se emplea marcadores de peso molecular (tamaño estándar conocido) para estimar peso y número de pares de bases de fragmentos que migran (Sambrook y Ruseell 2001).

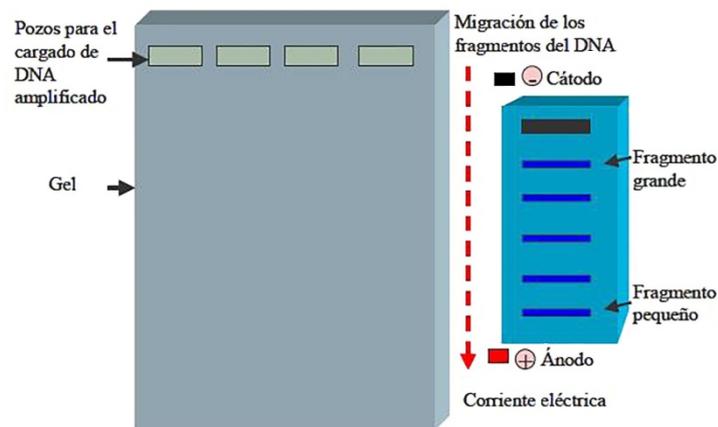


Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa

Fuente: Camarena *et al.* (2014)

La migración de una molécula de ADN tiene una tasa inversamente proporcional al \log_{10} del número de pares de bases y su velocidad es proporcional a la fuerza del campo eléctrico aplicado; se recomienda voltaje de 5 a 8 $V \cdot cm^{-1}$ para geles de agarosa. Los tampones de corrida

electroforética más empleados son TAE (Tris-Acetato-EDTA). TBE (Tris-Borato-EDTA) y TPE (Tris-Fosfato) (Sambrook y Ruseell 2001); la composición y cantidad del tampón también afecta la migración, un déficit en volumen retrasa la movilidad; mientras que, altas concentraciones de sales aumentan drásticamente la velocidad y temperatura fundiendo el gel y desnaturalizando el ADN.

El revelado del gel de agarosa requiere de la adición previa de bromuro de etidio, molécula que se intercala en los surcos de la doble hélice del ADN y en presencia de rayos UV se permite la visualización de bandas en distintas intensidades que dependen de la concentración del ácido nucleico (Sambrook y Ruseell 2001); se puede comprobar el tamaño de los productos amplificados y estimar la concentración en base a la intensidad de bandas (Pensabene 2009).

La electroforesis en gel de agarosa se emplea para evaluar integridad del ARN; así se sugiere en estudios sobre papa y olluco, en los cuales se utiliza agarosa en concentraciones de 0.7 y 1.2% (p/v), respectivamente (Romero y Estrada 2005; Araujo y Rao 2013). El tampón para electroforesis TAE (Tris-Acetato-EDTA) con pH 8.0 (alcalino) ioniza grupos fosfato y mantiene la carga negativa del ARN. El bromuro de etidio 1% (v/v) tiñe el ARN pues interacciona

favorablemente con la región hidrófoba de ácidos nucleicos y permite observar bajo luz UV, bandas correspondientes a ARN (López 2008). Se mencionan investigaciones en las cuales la integridad de ARN total, para tomate (Rivas 2010), chile (Gasca *et al.* 2008) y olluco (Romero y Estrada 2005), permite observar bandas correspondientes a ARNr 28S y ARNr 18S.

En organismos eucariontes la subunidad mayor de ARN ribosomal (60S, PM = 2800000) consta de ARNr 28S, ARNr 5S, ARNr 5.8S y la subunidad menor (40S, PM= 1400000) con ARNr 18S, presentan 4700, 120, 160 y 1900 nucleótidos, respectivamente (Watson *et al.* 2014). Se manifiesta que ARN parcialmente degradado tiene un aspecto manchado sin bandas fuertes, y ARN totalmente degradado aparece como una mancha de muy bajo peso molecular (Almansa 2013). La mayoría del contenido de ARN forma parte de los ribosomas, contrario al ADN, es muy inestable una vez obtenido de los tejidos debido a la presencia de ARNasas celulares; usualmente se congela los tejidos u homogeniza en solución desnaturante para prevenir la degradación (Macías *et al.* 2014).

Cuantificación absoluta

La cuantificación de expresión génica absoluta con estándares diluidos de ADN de concentración conocida,

para la construcción de una curva estándar, relaciona linealmente el ciclo umbral (C_T) y las cantidades iniciales de los genes, es decir, del ARN mensajero (ARNm) inicial, permitiendo la determinación de la concentración de muestras desconocidas en función de su valor C_T ; se asume que estándares y muestras tienen eficiencias de amplificaciones aproximadas, además las concentraciones de las diluciones deben abarcar niveles de expresión de las muestras desconocidas y permanecer dentro de un rango de cuantificación detectable para equipo y reactivos en cada ensayo (Wong y Medrano 2005).

El C_T obtenido en una muestra se compara con el de una curva estándar generada a partir de diluciones seriadas con cantidades conocidas de ADN para la cuantificación del objetivo o gen de interés (Kubista *et al.* 2006). El C_T es un valor X que determina el punto de detección para una cuantificación absoluta, donde los valores matemáticos son inversamente proporcionales a la cantidad de ADN identificado, a menor C_T mayor concentración génica (Figura 4.4).

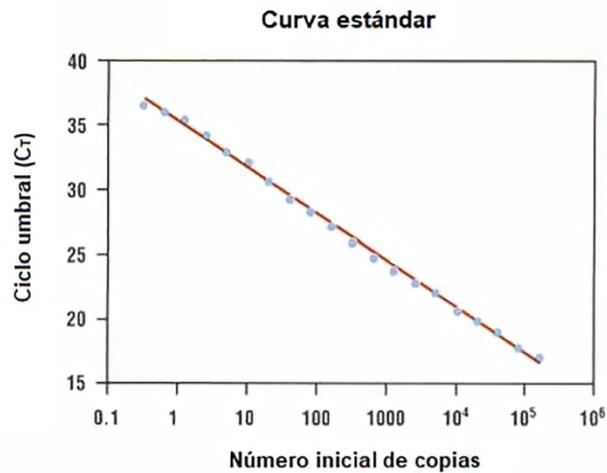


Figura 4.4. Curva estándar para cuantificación génica absoluta.
Fuente: Fernández (2011)

La eficiencia de la reacción puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$

La eficiencia de la PCR debería ser de 90 a 100%, significando el doblaje del amplicón en cada ciclo. Esto corresponde a una pendiente de 3.1 a 3.6 en la curva estándar C_T vs log-cantidad de templado. La obtención precisa y reproducible de resultados requiere de reacciones que tienen una eficiencia lo más cercana posible a 100%, y en cualquier caso, la eficiencia debe ser similar para el ADN objetivo y la referencia (normalizador, calibrador, control endógeno, control interno). Entre los diversos factores que afectan la eficiencia de la PCR se

encuentran el largo del amplicón, presencia de inhibidores, estructura secundaria y diseño de primers (Dorak 2012).

1.3.5.3 Cuantificación relativa

La cuantificación de expresión génica relativa o comparativa, calcula la expresión en función de una muestra de referencia interna o externa, y una muestra control (calibrador). Existen numerosos modelos matemáticos para el cálculo de la expresión génica normalizada en ensayos de cuantificación relativa, que utilizan diferentes metodologías para minimizar el error experimental (Wong y Medrano 2005).

Las posibilidades de comparar la expresión de ARNm del gen de interés son múltiples, implica que la expresión es relativa a un control endógeno como un gen de referencia expresado constantemente, u otro gen de interés (o relativa a un control exógeno universal y/o artificial de ARN o ADN, otros); en éste proceso de cuantificación se adiciona otro parámetro relativo; comparando el nivel de expresión del gen de interés relativo a un punto cero en el tiempo (o relativo a un control sin tratamiento, individuos saludables, otros) (Dorak 2006). La cuantificación comparativa mide el cambio relativo en los niveles de expresión; determina el cambio en el nivel de ARNm de un gen de interés en determinado estado a través de múltiples muestras; no requiere curva de calibración o estándares de

concentración conocida, y el gen de referencia puede provenir de cualquier transcripto de secuencia establecida (Bustin 2002). La unidad usada para expresar cantidades relativas es arbitraria, se puede comparar con otros experimentos RT-qPCR (Orlando 1998; Vandesompele *et al.* 2002); la cuantificación relativa es una herramienta adecuada para investigar pequeños cambios fisiológicos que producen efectos en los niveles de expresión génica. Se asume doblaje óptimo de ADN complementario (ADNc) de interés durante cada ciclo qPCR (Dorak 2006).

Algunos genes de referencia se expresan constantemente, coamplifican en el mismo tubo de reacción como control endógeno en ensayos *multiplex*, o en tubo separado como control exógeno (Livak 2001); el gen de referencia ideal para todas las condiciones experimentales no existe, por ende es necesario su selección apropiada para experimentos RT-qPCR en diferentes especies vegetales y distintas condiciones (Luo 2018); generalmente en plantas se usa el gen de referencia ARN ribosomal 5.8S (ARNr 5.8S) (Feng 2012), junto con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) (Zhang *et al.* 2014; Rivas 2010), actina (Act) (Ballou *et al.* 2007). ARN ribosomal 18S (ARNr 18S) (Nicot *et al.* 2005; Sapir *et al.* 2008), y otros como ARN nuclear pequeño U6 (U6 snRNA), tubulina (Tub) (Stommel *et al.* 2009), etc.; la utilización de ARNr requiere de iniciadores aleatorios, más no oligo

(dT), por ausencia de la cola poliadenilada (poli-A) de ARNm eucarionte.

El modelo de cuantificación relativa con el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ se deriva de la característica exponencial de la PCR (Livak y Schmittgen 2001) (Ecuación 1):

$$X_n = X_0 \times (1 + E_X)^n, \quad 1)$$

donde X_n es el número de copias del gen X en el ciclo n ; X_0 es el número inicial de moléculas del gen X ; E_X es la eficiencia de amplificación del gen X y n es el número de ciclos de la PCR. El C_T es el ciclo fraccionario en el cual la fluorescencia del gen alcanza el umbral fijado; la ecuación queda de la siguiente forma (Ecuación 2):

$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X, \quad 2)$$

donde X_T es el número de copias del gen X en el ciclo C_T ; $C_{T,X}$ es el ciclo C_T del gen X y K_X es una constante; así mismo, se repite para el gen de referencia R (Ecuación 3):

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R, \quad 3)$$

donde R_T es el número de copias del gen R . R_0 es el número inicial de moléculas del gen R ; E_R es la eficiencia de amplificación del gen R ; $C_{T,R}$ es el ciclo C_T del gen R y K_R es

una constante. Dividiendo la ecuación 1 para la ecuación 2, se genera la expresión (Ecuación 4):

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1+E_X)^{C_{T.X}}}{R_0 \times (1+E_R)^{C_{T.R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K, \quad 4)$$

Asumiendo que la eficiencia del gen R es igual a la eficiencia del gen X (Ecuación 5 y 6):

$$E_X = E_R = E,$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1+E)^{C_{T.X} - C_{T.R}} = K, \quad 5)$$

$$X_N \times (1+E)^{\Delta C_T} = K, \quad 6)$$

donde X_N es la cantidad normalizada del gen X (X_0/R_0) y el ΔC_T es la diferencia de C_T entre gen objetivo y gen de referencia. Ordenando la ecuación queda de la forma (Ecuación 7):

$$X_N = K \times (1+E)^{-\Delta C_T}, \quad 7)$$

El paso final es dividir X_N de cualquier muestra q , definido como el tratamiento a ser evaluado, para X_N de la muestra calibrador (cb) (Ecuación 8):

$$\frac{X_{N.q}}{X_{N.cb}} = \frac{K \times (1+E)^{-\Delta C_{T.q}}}{K \times (1+E)^{-\Delta C_{T.cb}}} = (1+E)^{-\Delta \Delta C_T}, \quad 8)$$

$$-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{T.q} - \Delta C_{T.cb}),$$

La eficiencia de amplificación es cercana a 1, entonces la cantidad del gen objetivo se normaliza con una muestra de referencia y es relativa a una muestra calibrador; de la forma siguiente (Ecuación 9):

$$\text{cantidad objetivo} = 2^{-\Delta\Delta C_T}, \quad 9)$$

El proceso de cuantificación relativa permite el cálculo de expresión génica asumiendo que las eficiencias de los genes de referencia y de interés son aproximadamente iguales; si difieren mucho entre sí, es necesario el análisis de eficiencias mediante una curva estándar, o nuevo diseño de oligonucleótidos, y optimizar las condiciones de reacción para equipararlas (Livak y Schmittgen 2001).

La amplificación de control sin templado (NTC) es más común debido a error humano, se sugiere dejar pocillos libres alrededor, o por contaminación de reactivos con productos PCR; la amplificación tardía en NTC es tolerable si el valor C_T más bajo para el templado se encuentra alejado más de cinco valores C_T (regla de cinco C_T de diferencia). Los amplicones del ADNc de interés deben ser cortos, aproximadamente 200 pb, no menores a 75 pb para diferenciarlos de la formación de dímeros entre iniciadores (Dorak 2012). Fluctuaciones en la variación del valor C_T

entre corridas usualmente aún se subestiman, algunos programas no procesan datos crudos provenientes de una o múltiples corridas, otros sí (Hellemans *et al.* 2006); incluso repeticiones técnicas pueden resultar en curvas de fluorescencia significativamente diferentes debido a la variación muestra a muestra (Dorak 2006).

No obstante, las réplicas técnicas mejoran la precisión del experimento, principalmente se incluyen para detección de reacciones aberrantes que resultan en valores C_T atípicos e incorrecta estimación de los niveles de expresión relativa; con tres o más réplicas, se detecta valores atípicos y se excluyen de cálculos posteriores; además permiten la evaluación de calidad total de las mediciones e identificación de malas réplicas, las diferentes vías para tratar malos duplicados son la exclusión de mediciones, conservación de mediciones afectando a los resultados (largas barras de error), o remoción de réplicas si información adicional precisa la mala réplica (error de pipeteo, curva de disociación anormal o valor C_T anormalmente alto para ese ensayo) (Dorak 2006).

Análisis comparativos

El proceso de cuantificación génica (Figura 4.5) puede establecerse mediante varios análisis (Morales *et al.* 2020); adicionalmente, muestras coloreadas con bromuro de etidio

en gel, forman un complejo con el ADN que al ser expuesto a luz ultravioleta emite fluorescencia. Se toma 1 μL de muestra extraída con 9 μL de tampón de carga SALB 1X, se carga en gel y paralelamente se carga el marcador de referencia de peso molecular, con el fin de estimar la concentración de las muestras, comparando la intensidad de bandas usando como referencia la concentración para la banda de mayor peso molecular. La corrida electroforética se realiza con tampón TBE 1X, se captura la imagen mediante una caja que emite luz ultravioleta con una cámara digital y un filtro de color marrón para el lente, para la posterior cuantificación (Blas *et al.* 2010).

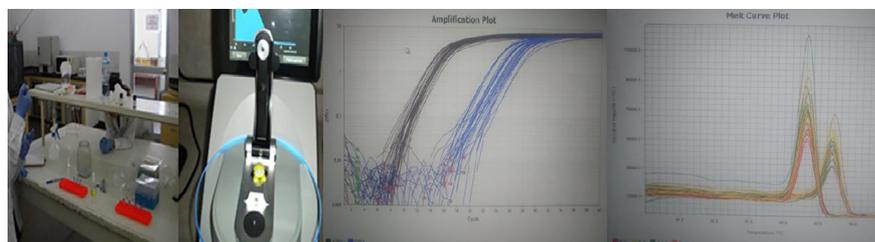


Figura 4.5. Áreas de electroforesis y extracción de ácidos nucleicos; espectrofotometría; termociclado en tiempo real.

Referencias bibliográficas

Almansa, R. 2013. Análisis del perfil de expresión génica en células de sangre periférica. Epidemiología molecular de enfermedades infecciosas. En línea: <https://epidemiologiamolecular.com/analisis-perfil-expresion-genica-celulas-sangre-periferica>

- Araujo, T. y Rao, R. 2013. Expresión del gen prosistemina de tomate en papa (*Solanum tuberosum*). *Agrociencias Amazonía* 1(1):11-25.
- Ballou, S., Yun, K., Cheng, C. y de los Reyes, B. 2007. Cold sensitivity gradient in tuber-bearing *Solanum* based on physiological and transcript profiles. *Crop Science* 47:2027-2035.
- Blas, R. Gutiérrez, L., Flores, J. y Berrocal, A. 2010. Curso: Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de plantas. Lima. Perú. UNALM-IBT. 13 p.
- Bonilla, E., Párraga. M., López. L., Escolar. F. y del Mazo, J. 2002. Cuantificación de la expresión génica a partir de un número limitado de células mediante RT-PCR en tiempo real. *Bioquímica* 27(1):3-7.
- Bustin, S. 2002. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR: Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29(1):23-39.
- Camarena, F., Chura, J. y Blas, R. 2014. Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas. UNALM/AGROBANCO. 278 p.

- Chiluisa-Utreras, V., Vaca, I., Chicaiza, O. y Peñaherrera, S. 2017. Analysis of the expression of β -actin. RuANS and RuMYB10 genes involved in the biosynthesis of anthocyanin using RT-qPCR in *Rubus niveus* in the Rumiñahui Canton. Journal of Berry Research 7(3):195-201.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. y Rutter, W. Z. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. Biochem. 18: 5294-5299.
- Deepak, S., Kottapalli, K., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K., Iwahashi, H., Masuo, Y. y Agrawal, G. 2007. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. Current Genomics 8:234-251.
- Díaz-Alonso, C. 2013. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia 29(3):298-303.
- Dorak, M. (Ed.). 2006. Real-time PCR. Advanced methods. School of Clinical Medical Sciences (Child Health). Newcastle University. UK. Taylor & Francis Group. 333 p.

- Dorak, M. 2012. Real-time PCR troubleshooting. Florida International University. Florida. USA.
- Feng, H., Huang, X., Zhang, Q., Wei, G., Wang, X. y Kang, Z. 2012. Selection of suitable inner reference genes for relative quantification expression of microRNA in wheat. *Plant physiology and biochemistry: PPB/Societe francaise de physiologie vegetale* 51:116–122.
- Fernández, P. 2011. Cuantificación mediante la técnica de PCR en tiempo real. Usos y aplicaciones. Instituto de Biotecnología. CICVyA. INTA-Castelar.
- Gachon, C., Mingam, A. y Charrier, B. 2004. Review Article: Real-time PCR: what relevance to plant studies?. *Journal of Experimental Botany* 55:1445-1454.
- Gasca, M., Rivera, Y., Torres, I., González, M., Guevara, L., Muñoz, C. y Guevara, R. 2008. Estudio del transcriptoma en *Capsicum chinense* jacq. resistente al virus huasteco vena amarilla del chile. *Agrociencia* 42:107-117.
- Hellemans, J., Mortier, G., Coucke, P., De Paepe, A., Speleman, F. y Vandesompele, J. 2006. qBase: open

source relative quantification software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data (submitted to Biotechniques).

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J. (Eds.). 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York. N.Y: Academic Press. Inc. pp. 315–322.

Kramer, A. y Havens, K. 2009. Plant conservation genetics in a changing world. Trends in Plant Science 14(11):599–607.

Kubista, M., Andrade, J., Bengsston, M., Foorotan, M., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L. Sthåhlberg, A. y Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine 27:95-125.

Kumari, V. 2012. Molecular studies on soluble acid invertases in the potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. Tesis doctoral. India. Thapar University. 149 p.

Livak, K. 2001. ABI Prism 7700 Sequence Detection System. User Bulletin #2. PE Applied Biosystems.

- Livak, K. y Schmittgen, T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25:402-408.
- López, J. 2008. Efecto de distintos niveles de luminosidad sobre la composición fenólica y la expresión génica de enzimas de la ruta fenilpropanoide de bayas de var. Carménere (Tesis de grado). Santiago. Chile. Universidad de Chile. 53 p.
- Lucca, A. 2011. Búsqueda de genes candidatos que controlen QTLs involucrados en la resistencia al estrés hídrico mediante el análisis de perfiles transcripcionales en especies silvestres de *Solanum* (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires. 183 p.
- Luo, M., Gao, Z., Li, H., Li, Q., Zhang, C., Xu, W., Song, S., Ma, C. y Wang, S. 2018. Selection of reference genes for miRNA qRT-PCR under abiotic stress in grapevine. *Scientific Reports* 8:4444.
- Macías, K., Sánchez, F. y Aza, C. 2014. Laboratorio de biotecnología molecular. Reporte de prácticas: Extracción y purificación de ARN de plantas; Cuantificación de ARN por espectrofotometría y visualización en gel de agarosa. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato.

- Malo, I., Bernacchia, G. y Arévalo, P. 2015. Activación de genes de defensa en plantas de tomate de mesa *Lycopersicon esculentum* L. a través de aplicación de sustancias químicas y naturales. La Granja. Revista de Ciencias de la Vida 21(1):61-68.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbor. New York.
- Morales, J., Blas, R., Chiluisa-Utreras, V., Flores, J. y Ortega, G. 2020. Gene expression of flavanone 3-hydroxylase (F3H), anthocyanidin synthase (ANS), and p-coumaroyl ester 3-hydroxylase (C3H) in tziimbalo fruit. IJASEIT 11(2):805-813.
- Nicot, N., Hausman, J., Hoffmann, L. y Evers, D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. J. Exp. Bot. 56(421):2907–2914.
- Orlando, C., Pinzani, P. y Pazzagli, M. 1998. Developments in quantitative PCR. Clin. Chem. Lab. Med. 36(5):255-269.

Pensabene, G. 2009. Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española. Instituto Valenciano de Ciencias Agrarias. Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.

Pinzón, A. 2007. Introducción al diseño “*in silico*” de primers. Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología en la Universidad Nacional de Colombia y del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia.

Primack, R., Rozzi, R. y Feinsinger, P. 2001. Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas Latinoamericanas.

Primrose, S. B. y Twyman, R. M. 2006. Principles of gene manipulation and genomics. Seventh edition. Blackwell Publishing. 644 p.

Rivas, F. 2010. Análisis de la expresión del gen PR-1, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*. Tesis Ing. Biotecnología. Ecuador. ESPE. 101 p.

- Roche, 2010. Transcriptor universal cDNA master faster cDNA synthesis—On any real time-PCR instrument. Roche Diagnostics GmbH. Germany.
- Rodríguez, D. S. 2006. Análisis de datos de expresión genética mediante técnicas de biclustering. En línea <http://www.lsi.us.es/docs/doctorado/memorias/Memoria-v2.pdf>
- Romero, M. y Estrada, R. 2005. Selección de fragmentos diferenciales de ADNc relacionados con estrés hídrico en *Ullucus tuberosus* Loz. (Bassellaceae) «olluco». Revista peruana de biología 12(1):135-140.
- Sambrook, J. y Ruseell, D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. New Cork: CSHL Press.
- Sapir, M., Oren-Shamir, M., Ovadi, R., Reuveni, M., Evenor, D., Tadmor, Y., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Meir, A. y Levin, I. 2008. Molecular aspects of anthocyanin fruit tomato in relation to high pigment-1. J. Hered. 99:292–303.
- Stephenson, F. H. 2012. Cálculo en biología molecular y biotecnología: guía de matemáticas para el laboratorio. Segunda edición. Elsevier, Barcelona.

Stommel, J., Lightbourn, G., Winkel, B. y Griesbach, R. 2009. Transcription factor families regulate the anthocyanin biosynthetic pathway in *Capsicum annuum*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 134(2):244-251.

Técnicas Avanzadas en Biología Molecular. 2001. Ácidos nucleicos, extracción de ADN y ARN. En línea <http://www.upo.es/depa/webdex/biocel/Tecnicas/documentos/TAB-8.p>

Tello, V. 2016. Despliegue diferencial de genes candidatos del proceso de embriogénesis somática en tomate de árbol (*Solanum betaceum* L.). Tesis Ing. Agr. Ecuador. UCE. 35 p.

Valasek, M. y Repa, J. 2005. "The power of real-time PCR". Adv Physiol Educ 29(3):151-159.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. y Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 3(7):0034.1–0034.11.

Vinueza-Burgos, C. 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. Revista Electrónica de Veterinaria 102:1-13.

- Vogelstein, B. y Gillespie, D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:615-619.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. 2014. Molecular biology of the gene. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Seventh Edition. 872 p.
- Wong, M. y Medrano, J. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques 39(1):1-11.
- Zhang, Y., Hu, Z., Chu, G., Huang, C, Tian, S, Zhao, Z. y Chen, G. 2014. Anthocyanin accumulation and molecular analysis of anthocyanin biosynthesis-associated genes in eggplant (*Solanum melongena* L.). J. Agric. Food Chem. 62:2906–2912.
- Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 53:247–273.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA Y DESARROLLO DE CULTIVARES MODERNOS

La transformación genética consiste en la introducción de nuevo material genético al genoma de una especie con mecanismos no sexuales (Dixon y González 1994; Mendoza de Gyves 2001). Generalmente, la ejecución de la transferencia de genes requiere de protocolos efectivos para el cultivo de tejidos y regeneración de plantas.

El reto de la transformación genética es conseguir la integración permanente de ADN foráneo en la planta y la expresión exitosa del transgen sin interrumpir ninguna región funcional. La transformación genética estable o integrativa permite mantener líneas transgénicas indefinidamente; no obstante, sólo entre 1 y 9% del ADN transferido y expresado en las células vegetales se integra finalmente al genoma de la planta (Benítez 2005). El camino hacia el mejoramiento biotecnológico de plantas, pasa por la utilización de recursos y técnicas modernas tales como cultivo *in vitro* de organismos vegetales, análisis de expresión génica, transformación genética, entre otros, que ayudan a superar limitaciones de producción, comercialización y exportación (Arias 2007; Mantilla 2008).

La transformación genética vía bacterias *Agrobacterium* consigue la integración permanente de ADN foráneo en el genoma de la planta y logra la expresión exitosa del transgen, lo que permite mantener líneas transgénicas indefinidamente, capaces de transmitir el gen exógeno a las siguientes generaciones (Benítez 2005). *A. tumefaciens* es la bacteria más empleada en los mecanismos de transferencia génica debido a su capacidad infectiva de amplio espectro, pues puede trasladar material genético a diferentes explantos vegetales, tales como hojas, tallos, cotiledones, yemas, peciolos, embriones, otros; la utilización de *A. tumefaciens* es una herramienta económica, reproducible y más eficiente que otros métodos empleados para el mismo propósito (Benítez 2005; Stanton 2000).

Generalidades acerca de la transformación genética

En cultivos modificados mediante ingeniería genética con propósitos agrícolas se transfiere uno o varios genes codificantes para características deseadas, los cuales provienen no solo de la misma planta o especie, sino también de organismos no relacionados (Qaim 2009). La ingeniería genética permite la manipulación directa de genes pertenecientes a cualquier ser vivo, rompiendo las barreras de incompatibilidad sexual y posibilitando la

transferencia de genes al genoma de una planta. Actualmente es uno de los mecanismos más utilizados con fines de mejoramiento vegetal.

Es importante cumplir con los siguientes requisitos para una transformación genética eficiente (Benítez 2005):

- Propagación y regeneración del tejido que se pretende transformar.
- Un método eficiente de transferencia de ADN al tejido vegetal.
- Un marcador que permita seleccionar tejidos y plantas transformados.
- Regeneración de plantas fértiles.
- El proceso debe ser simple y reproducible.

La transformación genética se percibe como un proceso artificial debido a que se lleva a cabo con intervención humana y en condiciones de laboratorio. No obstante, se ha documentado evidencia de que este fenómeno también ocurre en la naturaleza; científicos demostraron mediante técnicas moleculares la presencia de secuencias de ADN de transferencia (ADN-T) de *Agrobacterium* en 291 muestras

de cultivos de camote (*Ipomoea batatas*) provenientes de Suramérica, Centroamérica, África, Asia y Oceanía, evidenciando una transferencia horizontal de genes entre *Agrobacterium* y un ancestro del camote hace al menos ocho mil años (Kyndt *et al.* 2015). Tal descubrimiento puede suscitar una clara percepción acerca de la ciencia aplicada a plantas y organismos modificados genéticamente.

A. tumefaciens es una bacteria del suelo que causa la enfermedad de la agalla de la corona (o del cuello) (Hooykaas y Schilperoort 1992); el estudio de interacción planta-*Agrobacterium* a nivel molecular, permitió determinar que entre los numerosos eventos que ocurren en esta interacción; un paso muy importante es la transferencia de ADN desde la bacteria hacia el núcleo de células vegetales infectadas. *A. tumefaciens* posee un plásmido muy superior en tamaño, si se compara con el de bacterias utilizadas en la tecnología del ADN recombinante (*E. coli*), denominado plásmido inductor de tumores (*Ti*, *tumor inducing*) (Valderrama *et al.* 2005), que contiene todos los genes responsables de la enfermedad de la agalla de la corona, de su fenotipo y del proceso de transferencia de un trozo de ADN a la planta; sólo una pequeña porción de ADN del plásmido *Ti* se transfiere a la planta, el ADN de transferencia o simplemente ADN-T (Camarena *et al.* 2014).

Mecanismos de transformación genética

Los mecanismos de transformación genética consiguen la introducción e integración de genes exógenos al genoma de la planta mediante bacterias, microláser, microinyección, o inserción directa de ADN; siendo el mecanismo de preferencia para la mayoría de estudios con especies vegetales, aquel que utiliza *A. tumefaciens*; mientras que, las otras estrategias se aplican a especies reticentes que no pueden transformarse con bacterias (Siemens y Schieder 1996).

Mecanismos biológicos

El mecanismo de transformación genética más accesible consiste en la utilización de bacterias. *A. tumefaciens* se emplea con mayor frecuencia pues es capaz de transferir material genético a varios explantos vegetales, además posee capacidad infectiva de amplio espectro, lo cual permite la transferencia génica hacia buen número de plantas dicotiledóneas y, recientemente monocotiledóneas; es un mecanismo económico y reproducible que genera alta eficiencia en la transferencia comparado con otros procesos para el mismo fin (Benítez 2005; Stanton 2000). Debido al plásmido Ti, la bacteria puede sintetizar compuestos aminoacídicos derivados de arginina, llamados genéricamente opinas, que le permiten una mejor interacción con la planta, y se clasifican en: nopalina,

octopina y agropina. Cada plásmido Ti contiene genes de síntesis para una clase de opina, por lo tanto existen plásmidos Ti con genes para la síntesis de nopalinas, otros para octopinas y otros para agropinas. *Agrobacterium* en su proceso de infección natural de plantas, sintetiza opinas útiles para su desarrollo y esto ocurre en convivencia plena con la planta infectada; deduciéndose que los genes de síntesis de opinas están ubicados en el ADN-T y son naturalmente transferidos a la planta, así se asegura la convivencia de esta interacción planta-patógeno (Camarena *et al.* 2014).

La enfermedad de la corona de agalla, que genera pelos radicales, es causada por *A. rhizogenes*, una bacteria que posee plásmido Ri (*root inducing*) cuyos genes también producen opinas (Valderrama *et al.* 2005), preferentemente del tipo agropinas, y posee un sistema de transferencia de ADN a la célula huésped o hospedera (o infectada) que genera pelillos en la mayoría de infecciones resultantes, causando también agallas del cuello (Camarena *et al.* 2014).

Mecanismos físicos

El ADN foráneo ingresa a las células a través del uso de aparatos especializados, sustancias químicas, etc. El mecanismo más exitoso es la biobalística, que consiste en la entrada de ADN desnudo al interior de la célula por medio

de microproyectiles de oro o tungsteno; el término biobalística proviene de la unión de biología y balística, se basa en el disparo a altas velocidades de microproyectiles recubiertos de ADN hacia los tejidos vegetales, los cuales atraviesan pared y membrana celular, y llevan al interior celular los genes de interés para su posterior integración al genoma vegetal (Sanford 2000; Martínez *et al.* 2004; Vasil 2007).

Otro mecanismo empleado es la microinyección de ADN en cigotos o en células diferenciadas; se basa en la introducción de ADN foráneo a una única célula sin necesidad de grandes cantidades de tejido, además es más sencillo monitorear el proceso (Siemens y Schieder 1996).

Plantas y bacterias como organismos modelo

Según Magioli y Mansur (2005), los sistemas de cultivo *in vitro* a más de proveer herramientas para la selección de características de valor agronómico, se usan para el análisis de marcadores moleculares en la fisiología y desarrollo vegetal; así como para la micropropagación de especies silvestres que representan una fuente deseable de variabilidad genética, y obtención de plantas libres de plagas y enfermedades, destinadas al mejoramiento de cultivos comerciales económicamente importantes (Andrade Díaz *et al.* 2013). El establecimiento de un

eficiente protocolo de regeneración *in vitro* representa un paso fundamental en el proceso de transformación genética, seguido de análisis de expresión génica, los cuales a su vez permiten la selección para introducción de características genéticas novedosas. La disponibilidad de un mecanismo eficiente para la transferencia de genes exógenos al genoma de plantas ofrece un excelente sistema modelo para la investigación de su fisiología *in vitro* y otros aspectos relacionados con la biología molecular de las especies. Se menciona que conceptualmente el clonamiento de un fragmento de ADN extraño, ADN pasajero o ADN blanco (inserto) en un vector, requiere efectuar las siguientes operaciones (Camarena *et al.* 2014):

- El ADN vector debe ser purificado y cortado.
- El ADN blanco debe ser insertado en el ADN vector para crear la recombinación artificial.
- Se debe supervisar el progreso de las reacciones de corte y la ligación.
- Finalmente, las moléculas de ADN recombinante deben ser introducidas por transformación en *E. coli* o en otra célula hospedera.

Genes marcadores de selección

Los genes marcadores de selección (GMS) son útiles para seleccionar tejidos y plantas transformados; generalmente, en las plantas se introduce un gen marcador de resistencia junto con el gen de interés. En un medio de cultivo que incluye antibiótico sobreviven y regeneran las plantas cuyas células se han transformado (Hernández 2013).

Los primeros GMS utilizados a principios de 1990 son mutaciones puntuales que confieren resistencia a determinados antibióticos; es decir, son genes recesivos y 100 veces menos eficientes que el gen *aadA* de *E. coli* por ejemplo. Así se tiene la mutación *rrn16* (16S ARNr) que confiere resistencia a espectinomicina y estreptinomicina; mutación *rps12* (ribosoma) que confiere resistencia a estreptinomicina (López 2011). Por su parte, el gen *aadA* (*E. coli*) es más eficiente que las mutaciones puntuales, pues codifica para la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa y confiere resistencia a espectinomicina y estreptinomicina (Goldschmidt-Clermont *et al.* 1991). Entre otros.

Genes reporteros son aquellos de detección colorimétrica con la utilización de un sustrato específico, por ejemplo genes de la β -glucoronidasa y la β -galactosidasa provenientes de bacterias; así como genes fluorométricos

como el gen GFP (*green fluorescent protein*) proveniente de medusas (Stanton 2000; Benítez 2005). Entre otros.

Clonamiento de ADN

La habilidad para construir moléculas de ADN recombinante y mantenerlas en células se denomina clonamiento de ADN; típicamente implica a un vector que provee información necesaria para la propagación del ADN clonado en la célula replicadora del huésped; enzimas de restricción que cortan ADN en secuencias específicas y otras que juntan ADNs cortados uno con el otro son clave para crear moléculas de ADN recombinante.

Al crear moléculas propagables de ADN recombinante en un organismo huésped, un fragmento particular de ADN puede ser purificado desde otros ADNs y amplificado para su producción en grandes cantidades. Las grandes colecciones de tales moléculas híbridas pueden ser creadas y se llaman librerías, en una librería un vector común lleva varios insertos alternativos. Una vez el ADN es escindido en fragmentos, se necesita insertarlo en un vector para la propagación. Esto es, el fragmento de ADN debe ser insertado en una segunda molécula de ADN (el vector) para ser replicado en un organismo huésped. El huésped más común es la bacteria *E. coli*. Los vectores de ADNs tienen tres características (Watson *et al.* 2014):

- Contienen un origen de replicación que les permite replicarse independientemente del cromosoma del huésped. (Algunos vectores de levadura también requieren un centrómero).
- Contienen un marcador de selección que permite a las células que contienen el vector (y cualquier ADN adjunto) ser identificadas de inmediato.
- Tienen sitios únicos para una o más enzimas de restricción. Esto permite a fragmentos de ADN ser insertados en un punto definido dentro del vector tal que la inserción no interfiere con las dos primeras funciones.

Algunos vectores comunes son pequeñas (~3 kb) moléculas de ADN circular denominadas plásmidos, originalmente derivadas de moléculas ADN circular extracromosomal que se encuentran naturalmente en algunas bacterias y eucariontes unicelulares. En algunos casos (aunque no en levaduras), estos ADNs llevan genes codificantes de resistencia a antibióticos. Así, plásmidos que ocurren naturalmente ya tienen dos de las características deseables de un vector: se puede propagar independientemente en el huésped, y llevan un marcador de selección. Estos plásmidos a veces se presentan en múltiples copias por célula, lo cual incrementa la cantidad

de ADN que puede ser aislado de una población de células. Los plásmidos que se dan naturalmente típicamente están restringidos en la cantidad de ADN que puede ser llevada (normalmente limitado a 1-10 kb). Para clonación y propagación de fragmentos grandes, típicamente usados en análisis genómicos y para secuenciación de ADN, varios vectores artificiales han sido creados, por ejemplo, cromosomas artificiales bacterianos y de levadura (BACs y YACs) que pueden admitir de 120 a > 500 kb de ADN (Watson *et al.* 2014).

La inserción de un fragmento de ADN en un vector es en general un proceso relativamente simple. Suponiendo que un vector plásmido tiene un único sitio de reconocimiento para EcoRI. El vector es preparado digiriendo éste con EcoRI, la cual linealiza el plásmido. Debido a que EcoRI genera extremos 5' cohesivos que son complementarios a otros, los extremos adhesivos son capaces de realinearse para reformar un círculo con dos mellas. El tratamiento del círculo con la enzima ADN ligasa y ATP podría sellar las mellas para reformar un círculo cerrado covalentemente. El ADN objetivo es preparado por escisión con una enzima de restricción, en este caso EcoRI, para generar potenciales insertos de ADN. El vector ADN es mezclado con un exceso de ADNs insertos escindidos por EcoRI bajo condiciones que permite a los terminales adhesivos hibridizar. Se usa entonces ADN ligasa para

enlazar los terminales compatibles de los dos ADN. Añadiendo un exceso del inserto ADN relativo al plásmido ADN se asegura que la mayoría de vectores resellarán con el inserto ADN incorporado (Watson *et al.* 2014).

Algunos vectores también manejan la expresión de genes dentro del inserto de ADN, son llamados vectores de expresión y tienen promotores transcripcionales, derivados de la célula huésped, inmediatamente adyacente al sitio de inserción. Si la región codificante de un gen (sin su promotor) es puesta en el sitio de inserción en la orientación apropiada, luego el gen insertado será transcrito a ARNm y traducido a proteína por la célula huésped (Watson *et al.* 2014).

Transformación genética vegetal

La presencia de un pequeño fragmento de ADN de *A. tumefaciens* al aislar tumores axénicos de la agalla de la corona en tabaco, constituye una demostración de los experimentos que consolidaron la capacidad de esta bacteria para transferir ADN entre reinos diferentes (Chilton *et al.* 1977). La obtención de nuevas variedades transgénicas requiere la utilización del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, o el plásmido Ri de *A. rhizogenes*, con genes que reemplazan a los genes inductores tumorales y los de síntesis de fitohormonas (citoquininas y auxinas) por la característica seleccionada que se desea transferir al

organismo vegetal. *A. tumefaciens* es un patógeno que causa enfermedad en plantas susceptibles mediante la transferencia de parte de su propio ADN, cuyos genes son conducidos en el plásmido. El ADN bacteriano se inserta en el ADN vegetal, los genes inductores tumorales Ti ó Ri son removidos en vectores denominados desarmados, o reemplazados por genes deseables en vectores binarios (Valderrama *et al.* 2005).

El plásmido Ti es inmanejable en el laboratorio, difícil de utilizarse al clonar directamente genes en él, debido a su gran tamaño se utilizan plásmidos desarmados tipo Ti, originándose en general un sistema de dos plásmidos con funciones complementarias, aportando uno con el operón (conjunto de genes) *vir* y otro con el *cassette* de expresión del gen de interés y sus elementos reguladores. Así, ambos plásmidos en conjunto, más pequeños en tamaño funcionan como un plásmido Ti normal, siendo denominados plásmidos binarios. Esta estrategia ha permitido diseñar cepas comerciales de *A. tumefaciens* con funciones de virulencia (*vir*), por ejemplo la cepa LBA4404 y plásmido pAL4404 (plásmido Ti residente) con todos los genes *vir* necesarios para activar la incorporación eventual de ADN de transferencia (ADN-T) a la planta (Camarena *et al.* 2014), cepa LBA004 y plásmido pBI121 (contiene el gen GUS (β -glucoronidasa) y NTPII (neomycin fosfotransferasa)) (Arias 2006; Mantilla

2008), otros. El ADN-T es entonces aportado por otro plásmido con elementos para funcionar como plásmido lanzadera en *A. tumefaciens* y *E. coli*.

Un vector binario es un plásmido que lleva el ADN-T durante la transformación genética mediante *A. tumefaciens*. Se compone de dos regiones, ADN-T y el resto del plásmido, el esqueleto. El ADN-T está delimitado por unas secuencias conocidas como bordes (Ream 2008), dentro se encuentran elementos que se desea transferir a la planta, los cuales son un gen de interés y un gen marcador de selección. Un vector binario comercial, no contiene gen de interés alguno, sino más bien posee varios sitios de restricción o sitios de clonación múltiple (SCM) donde el investigador inserta el gen de interés (Tovar 2011).

En el esqueleto se encuentran los elementos funcionales que requieren las bacterias *E. coli* (donde se construye el vector binario) y *A. tumefaciens* (que lleva el vector binario ya construido y transfiere el ADN-T a la planta) para su replicación y selección. Estos elementos funcionales incluyen orígenes de replicación y marcadores de selección para reconocer a las células bacterianas que llevan el plásmido luego de ser transformadas (Figura 5.1) (Tovar 2011).

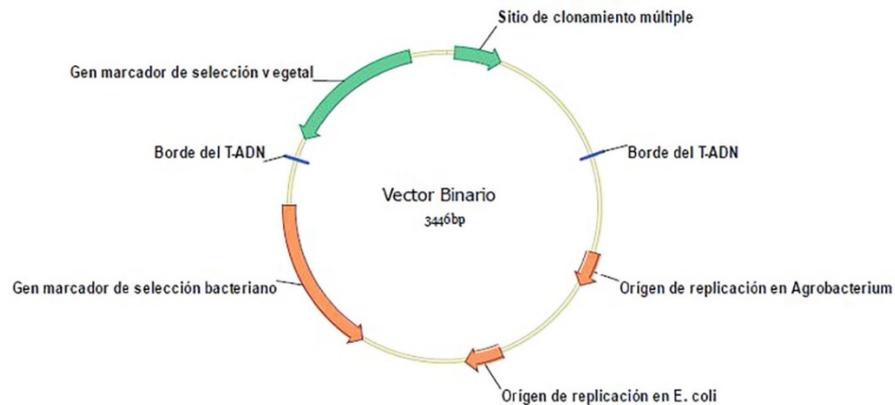


Figura 5.1. Esquema de un vector binario mostrando sus principales elementos funcionales.

Fuente: Tovar (2011)

Un ejemplo de plásmido para estudios de transformación genética lo constituye el plásmido Ti (Figura 5.2), que posee un segmento llamado ADN-T, el cual normalmente contiene múltiples copias de genes que codifican para opinas y fitohormonas; existen dos segmentos, uno a la derecha y otro a la izquierda del plásmido Ti, ADN-TR (extremo 5') y ADN-TL (extremo 3'), respectivamente. ADN-TL es oncogénico (Stanton 2000); el segmento del plásmido Ti que contiene los genes *onc* de hormonas se denomina *tms* y en éste también se encuentran los genes *aux* y *cyt*, denominados así por similitud a los genes que producen auxinas y citoquininas. Del otro lado, en el ADN-T existen genes que codifican para la opino-sintetasa, enzima necesaria para la producción de opinas. Transcritos los oncogenes por la célula vegetal, posteriormente se codifican varias proteínas involucradas

en la síntesis de auxinas y citoquininas, fitohormonas que participan en la proliferación celular, generándose el tumor de la corona; y el gen involucrado en las síntesis de opinas genera fuente de alimento para las bacterias, las cuales incrementan en número y causan mayor infección a las plantas (Benitez 2005; Hooykaas y Schilperoort 1992).

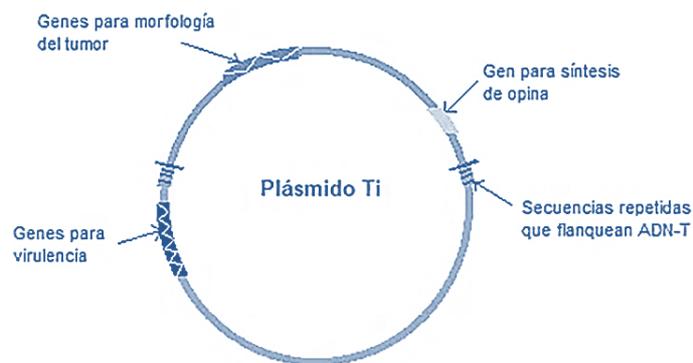


Figura 5.2. Esquema que ilustra un plásmido Ti de *A. tumefaciens*.

Los genes *vir* externos al ADN-T producen virulencia, constituyen un operón (*virA-virH*) cuyos genes principales son regulados por una secuencia promotora que contiene 12 pares de bases conservadas a la que se une específicamente la proteína *virG* fosforilada; la fosforilación de *virG* es requerida para la activación de los genes *vir* (Jin *et al.* 1990a; 1990b). Los genes *vir* son parte del sistema de virulencia, y activados cuando la bacteria contacta con heridas ocasionadas por laceraciones en los tejidos, las mismas que generan la secreción de ciertos exudados vegetales, compuestos fenólicos secretados como

lignina, precursores de flavonoides y acetosiringona (Stachel *et al.* 1985). La bacteria detecta señales de activación en su entorno y transmite esta información hacia su interior por transducción de señales, generalmente utilizando dos componentes, proteínas sensoras, *virA* en la superficie de la bacteria y *virG* que traduce la respuesta al interior (Winans *et al.* 1994). La acetosiringona en solanáceas es el compuesto fenólico más efectivo para activar los genes *vir* (Hooykaas y Schilperoort 1992).

La acetosiringona induce fosforilación de *virG* mediante el receptor *virA*, se transfiere un grupo fosfato a la proteína *virG* que es un factor de transcripción y promueve la activación transcripcional de un gen al unirse a una zona promotora; los promotores del operón *vir* son activados entonces, generando la transcripción del resto de genes *vir*. Al sintetizarse (transcribirse y traducirse) las proteínas *virD2* y *virD1* (productos de la familia de genes *virD*), más *virC1* (producto de la familia *virC*), cortan una sola hebra del ADN-T y comienzan a separarla de su hebra complementaria, uniéndose covalentemente a sus extremos. Al mismo tiempo que se produce la separación y desplazamiento de la hebra simple de ADN-T, se replica y reemplaza una nueva hebra en el plásmido Ti, quedando éste intacto hacia el final del proceso de formación del ADN-T de hebra simple.

El ADN-T de hebra simple que se va generando, es rápidamente cubierto y protegido por múltiples unidades de la proteína *virE2*, a manera de evitar su degradación ocasional. Esta hebra de ADN-T recubierta con *virE2*, se conoce como “complejo T”. Durante todo el proceso, *virD2* permanece unida covalentemente al extremo 5' del ADN-T, sirviendo de máquina de conducción, ayudada además por *virE1*, para el paso del complejo a través de un canal intercelular conformado principalmente por proteínas de la familia *virB* (*virB4* y *virB11*) y *virD4*, que une a *Agrobacterium* con la célula vegetal que va a ser transformada.

Mientras que los genes involucrados en la transferencia del ADN-T se encuentran fuera de este segmento. Los genes *chvA* y *chvB* son responsables de la adhesión de *Agrobacterium* a la pared celular vegetal, se expresan constitutivamente y se encuentran en la región de virulencia, en la membrana de la bacteria; al activarse *chvA* y *chvB* la bacteria empieza a producir sustancias que facilitan la adhesión de las paredes celulares vegetal y bacteriana, abriendo el camino a la transferencia del ADN-T (Hooykaas y Schilperoort 1992; Stanton 2000). La presencia de dos regiones conservadas a los extremos del ADN-T de 24 a 25 pb cada una, constituyen señales de reconocimiento para la transferencia del material genético bacteriano al genoma

celular de la planta; cuando el fragmento del plásmido bacteriano ingresa a la célula vegetal (Figura 5.3), su integración al genoma vegetal se consigue por un proceso de recombinación. La infección bacteriana es exitosa al expresarse los genes productores de fitohormonas y opinas en las células vegetales, gracias a la presencia de señales reguladoras de expresión eucariotas en el ADN-T, como la caja de iniciación de transcripción, TATA, y la secuencia terminadora de transcripción AATAAA (Hooykaas y Schilperoort 1992).

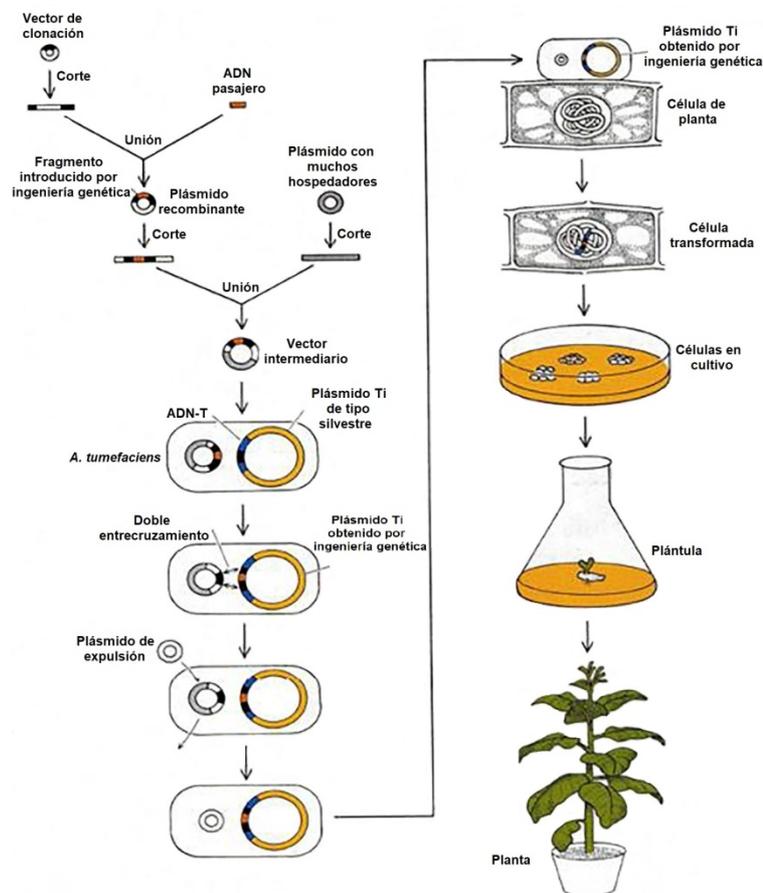


Figura 5.3. Esquema que ilustra el proceso de transformación de células vegetales por medio del plásmido Ti de *A. tumefaciens* y regeneración de plantas transformadas.

Fuente: Díaz, Y. (UNSA)

Transgénesis

Transgénesis es la modificación genética de una planta receptora con uno o más genes provenientes de algún organismo no vegetal, o de una planta donadora que es sexualmente incompatible con la planta receptora; incluye secuencias de genes de cualquier origen en orientación

antisentido, alguna combinación artificial de secuencias codificadoras y reguladoras, como un promotor de otro gen, o un gen sintético (Schouten *et al.* 2006).

En el caso de transgénesis, el gen transferido usualmente deriva de una especie foránea que no es la especie receptora ni una relativa cercana, sexualmente compatible; en otras palabras, la transgénesis puede extender el acervo génico de la especie receptora. Tal novedoso gen puede proveer a la planta objetivo una nueva característica que no ocurre en la especie receptora en la naturaleza ni puede ser introducida mediante mejoramiento tradicional. Esta novedosa característica puede afectar la adecuación de la especie receptora en varias vías; un cambio en adecuación puede entonces dispersarse mediante flujo génico entre un organismo genéticamente modificado y sus parientes silvestres (Den Nijs *et al.* 2004), potencialmente creando cambios en la vegetación natural. Consecuentemente, legisladores y autoridades regulatorias han puesto mucha atención a la seguridad de lanzamientos deliberados de cultivos transgénicos al medio ambiente y han puesto en su lugar marcos de bioseguridad para controlar el riesgo (Schouten *et al.* 2006).

5.4.1 Desarrollo de plantas transgénicas sin gen marcador de selección

La transformación genética de plantas requiere de un método de selección de aquellas que han sido transformadas. Es común la utilización de genes marcadores de selección (GMS) en vectores de transformación, los cuales confieren resistencia a herbicidas, antibióticos, u otras condiciones de toxicidad o estrés (Gelvin 2003).

A pesar de su importancia, generalmente los GSM no son necesarios luego del proceso de selección. Como ejemplos de GSM, se tiene el gen codificante para la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia a antibióticos aminoglucósidos como kanamicina, neomicina, paromomicina, entre otros (Bevan *et al.* 1983; Fraley *et al.* 1983; Herrera-Estrella *et al.* 1983); así como, el gen de la higromicina fosfotransferasa (*hpt*) que confiere resistencia a higromicina B, un aminoglucósido tóxico inhibidor de la síntesis proteica (Blochlinger y Diggelmann 1984).

Uno de los asuntos más preocupantes sobre los riesgos de obtención y comercialización de plantas transgénicas, es la posible transferencia de genes de resistencia a antibióticos, hacia microorganismos presentes en suelo y plantas aledañas, mediante transferencia génica horizontal. Otra de las consecuencias son los efectos pleiotrópicos, por lo cual la actividad enzimática de genes introducidos puede

influir sobre la actividad de otras enzimas (Miki *et al.* 2009). Además, las secuencias regulatorias de genes marcadores de selección pueden tener influencia sobre transgenes o genes endógenos ubicados cerca de los sitios de inserción (Yoo *et al.* 2005; Zheng *et al.* 2007).

También el escape de genes de resistencia a herbicidas hacia plantas cercanas es una preocupación; los cultivos transgénicos son compatibles sexualmente con plantas silvestres, de modo que podría existir flujo genético (Ellstrand 2003). No obstante, se presentan varias barreras, pues tienen que crecer en estrecha proximidad, coincidir con la etapa de floración y la progenie debe ser suficientemente fuerte para propagarse (Mallory-Smith y Zapiola 2008).

Transformación plastidial

En la actualidad, el genoma plastidial es de gran interés en programas de fitomejoramiento debido a las distintas ventajas que presenta, tales como alta expresión de transgenes y herencia materna. El plastidio es un orgánulo celular, posee su propio genoma y maquinaria de transcripción-traducción, su genoma (plastoma) está formado por una molécula de ADN circular, altamente poliploide, de 120 a 160 kb y codifica aproximadamente 130 genes. Su tamaño es muy pequeño comparado con el genoma nuclear, sin embargo, constituye de 10 a 20% del

ADN total (Bock 2001). La primera transformación plastidial se realizó en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton *et al.* 1988); y luego en la planta *Nicotiana tabacum* L. (Svab *et al.* 1990a, 1990b). Se hace necesario superar barreras físicas, como la pared celular, el citoplasma y la doble membrana plastidial del cloroplasto.

Después de haber introducido ADN foráneo, éste se integra en el plastoma y estabiliza mediante recombinación homóloga (Kavanagh *et al.* 1999), dando lugar a la heteroplasma: coexistencia de un bajo número de plastidios transformados junto con plastidios no transformados en la misma célula. El número de plastidios transformados se puede aumentar mediante un medio selectivo, con antibióticos; la homoplasma (todos los plastomas y todos los plastidios de la célula transformados) se alcanza tras aproximadamente 20 divisiones celulares (Maliga 2004).

Eliminación de genes marcadores de selección

En el caso de plantas transplastómicas, antes de eliminar el GMS se tiene que alcanzar el estado de homoplasma. Existen distintos sistemas de eliminación de GMS, el más estudiado y empleado es el sistema de recombinación Cre/*lox* que introduce la recombinasa Cre en la planta, para que ésta reconozca las regiones *lox* del genoma plastidial y elimine el fragmento de ADN flanqueado. Las

regiones *lox* son secuencias de recombinación constituidas por 34 nucleótidos, se introducen en el vector de transformación flanqueando al GMS. La recombinasa Cre (*cyclization recombination*) derivada del bacteriófago P1 reconoce secuencias de forma única y específica.

Algunos de los sistemas de recombinación más empleados son el Cre/*lox* del bacteriófago P1, FLP/*frt* de *Saccharomyces cerevisiae* y R/*RS* de *Zygosaccharomyces rouxi*; derivados de la familia de las tirosín-recombinasas, poseen un residuo catalítico de tirosina para actuar sobre el ADN blanco durante la recombinación (Gidoni *et al.* 2008; Wang *et al.* 2011). Culminada la reacción, un sitio permanece en el genoma y puede ser empleado para recombinación integrativa de otros segmentos de ADN.

Sistema Cre/*lox*

La recombinasa Cre reconoce secuencias denominadas como regiones *loxP*, y elimina el fragmento de ADN que se encuentra flanqueado por éstas dos regiones.

Las regiones *lox* son los llamados loci de recombinación, están constituidos por 34 pares de bases divididos en 13 pb de forma palindrómica, y separadas por un conector asimétrico de 8 pares de bases. La secuencia de nucleótidos que forman esta región es la siguiente:

ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT
TATTGAAGCATAT TACATACG ATATGCTTCAATA

Éstas secuencias son reconocidas por la recombinasa Cre; en el sistema Cre/*loxP* favorecen el intercambio de moléculas de ADN que participan en la recombinación intra o inter específica (Sauer 1987). Dependiendo de la localización y orientación de los sitios, la recombinasa invierte, inserta, suprime o intercambia fragmentos de ADN en organismos tanto procariontes como eucariontes (Figura 5.4) (Kilby *et al.* 1993; Ow 2002).

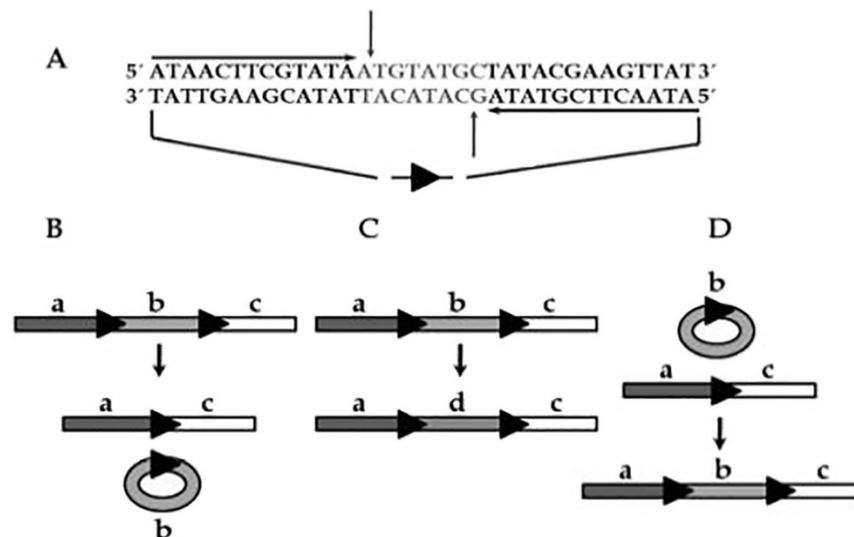


Figura 5.4. Recombinación mediada por la enzima Cre (A): representación esquemática del sitio de recombinación *lox*. Las repeticiones invertidas de 13 bp están marcadas por flechas horizontales. Los puntos de la región espaciadora en los cuales Cre corta los sitios *lox* están denotados por pequeñas flechas verticales. La recombinasa Cre media la recombinación

intra e intermolecular conduciendo a eventos de eliminación (B), inversión (C) o integración (D).

Fuente: Kopertekh y Schiemann (2012)

Transformación genética intra (intragénesis) e inter (cisgénesis) especies

La atención de dudas e inquietudes acerca de los cultivos transgénicos también forman parte del propósito del investigador, así como el aseguramiento de la producción eficiente de nuevas variedades; por lo cual se han desarrollado técnicas alternativas de transformación genética vegetal, siendo éstas la transformación genética inter especies (cisgénesis) e intra especies (intragénesis). Los términos se basan en el uso exclusivo de material genético proveniente de especies sexualmente compatibles con la planta receptora; el acervo o *pool* genético disponible es el mismo que para el mejoramiento convencional (Holme *et al.* 2013).

La transformación genética intra especies es un término desarrollado para encargarse de la preocupación pública acerca de la combinación de materiales genéticos provenientes de especies no compatibles sexualmente, basándose en el respeto de las barreras de compatibilidad genética natural; es decir, ingeniería genética utilizando solo el propio material genético de una especie o uno

proveniente de plantas cercanamente relacionadas con las cuales se puede cruzar (Holme *et al.* 2013).

La definición de transformación genética intra especies fue introducida por Rommens (2004), permitiendo el diseño de elementos genéticos específicos combinados a partir de plantas que comparten un mismo acervo genético y son sexualmente compatibles con la especie blanco. Las regiones codificantes de un gen pueden combinarse con secuencias promotoras y terminadoras de un gen distinto; incluso se menciona la manufactura de paquetes de silenciamiento mediante la combinación de diferentes elementos genéticos de compatibilidad sexual (Holme *et al.* 2013). En intragénesis es necesario utilizar alternativas como genes de resistencia a herbicidas obtenidos por mutación del genoma de la misma planta (Thilmony *et al.* 2010) o genes de pigmentación (Kim *et al.* 2010).

Intragenes son genes híbridos, los cuales pueden tener elementos genéticos de distintos genes y loci (Rommens *et al.* 2007). Como resultado, la expresión de un gen en particular puede ser modificada con el uso de regiones promotoras y terminadoras diferentes. La intragénesis permite la construcción de nuevas combinaciones genéticas, introduciendo variabilidad para la expresión génica, la creación de patrones novedosos de expresión y

consecuentemente el lanzamiento de nuevos organismos genéticamente modificados con propiedades innovadoras.

Los ADNs derivados de planta (ADNs-P) receptora, para diferenciarlo de los ADNs-T ensamblados con secuencias provenientes de diversos orígenes, son secuencias que pertenecen al grupo de compatibilidad sexual de una especie; en intragénesis se transfiere al organismo hospedero únicamente secuencias de ADN-P, y se permite la construcción de nuevas combinaciones genéticas (Rommens *et al.* 2007); es necesario desarrollar vectores de ADN-P específicos para el cultivo a mejorar (Tovar 2011).

Existen vectores binarios específicos para transformación genética intra especies; vectores para papa (Rommens *et al.* 2006), tomate, canola (Rommens 2007), manzana (Viswanath y Strauss 2010), arroz (Thilmony *et al.* 2010), alfalfa (Weeks *et al.* 2008), *Arabidopsis thaliana* (Conner *et al.* 2007), otros.

En contraste, mediante cisgénesis se obtiene una copia idéntica de un gen proveniente de un acervo genético sexualmente compatible a la especie receptora, incluyendo promotor, intrones y terminador (Figura 5.5) (Holme *et al.* 2013; Schouten *et al.* 2006a). El término planta cisgénica se introdujo hace poco y se refiere a plantas cultivadas que

han sido modificadas genéticamente con uno o más genes (conteniendo intrones y regiones flanqueantes tales como promotor nativo y región terminadora en una orientación con sentido) aislados de una planta donadora con la que se puede cruzar (Schouten *et al.* 2006b); esto implica que un cultivo cisgénico modificado genéticamente contiene genes que mantienen su composición genética natural. Distinto al mejoramiento tradicional, los cultivos cisgénicos contienen exclusivamente el gen o genes de interés y no elementos genéticos indeseados (Espinoza *et al.* 2013).

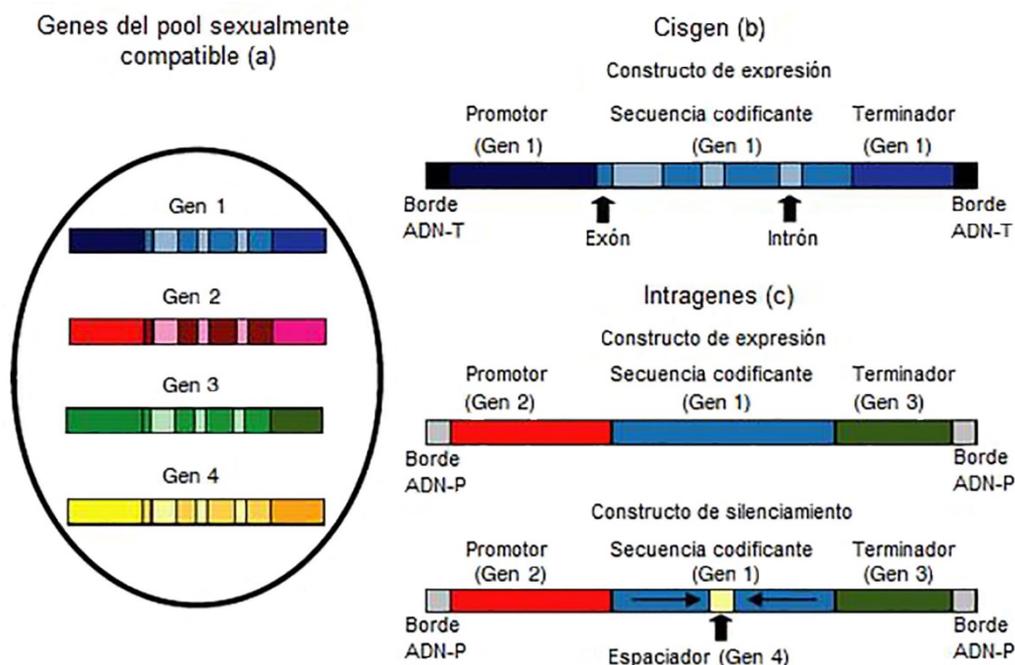


Figura 5.5. Ilustración de constructos de cisgenes e intragenes según lo definido por Schouten *et al.* (2006a) y Rommens (2004), respectivamente.

Fuente: Holme *et al.* (2013)

Consideraciones acerca de la transformación genética

La transformación genética permite la introducción de características novedosas, así como el estudio de la regulación de expresión génica en plantas. La disponibilidad de una metodología eficiente para la transferencia de genes exógenos intra especies al genoma de plantas ofrece un excelente sistema modelo para la investigación de su fisiología *in vitro* y otros aspectos relacionados a la biología.

Cabe mencionar estudios relacionados en los cuales se utiliza *Solanum melongena* como planta modelo para la incorporación y expresión de genes reporteros (Hanyu *et al.* 1999), *Solanum quitoense* para el análisis de genes de selección (Mantilla 2008) y *Solanum lycopersicum* para la evaluación de la disponibilidad de recursos genéticos y el desarrollo de eficientes mecanismos para llevar a cabo la transformación genética (Gupta y Van Eck 2016), y otros.

Referencias bibliográficas

Andrade Díaz, D., Córdoba, M., Escobar, H. y Lagos, T. 2013. Evaluación de medios de cultivo para

propagación *in vitro* de semillas y explantes de especies silvestres de *Solanum*. Acta Agronómica 62(1):27-36.

Arias, A. 2007. Transformación genética de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Tesis de grado). Quito, Ecuador, USFQ. 61 p.

Benítez Burraco, A. 2005. Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Barcelona: Editorial Reverté.

Bevan, M.W., Flavell, R.B. y Chilton, M.D. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304:184-187.

Blochlinger, K. y Diggelmann, H. 1984. Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. Mol. Cell. Biol. 4:2929-2931.

Bock, R. 2001. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. Journal of Molecular Biology 312:425-438.

- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B., Robertson, D., Klein, T., Shark, K. y Sanford, J. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240(4858):1534-1538.
- Camarena, F., Chura, J. y Blas, R. 2014. Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas. UNALM/AGROBANCO. 278 p.
- Conner, A. J., Barrell, P. J., Baldwin, S. J., Lokerse, A. S., Cooper, P. A., Erasmuson, A. K., Nap, J. P. y Jacobs, J. M. E. 2007. Intragenic vectors for gene transfer without foreign DNA. *Euphytica* 154:341-353.
- Den Nijs, H.C.M., Bartsch, D. y Sweet, J. 2004. Introgression from genetically modified plants into wild relatives. Wallingford, UK: CABI. 432 p.
- Díaz, Y. Transformación mediada por *Agrobacterium* de plantas de tomate para que expresen el gen de la defensina. Unidad de Postgrado de la Fac. Cs. Biológicas y Agropecuarias – UNSA.
- Dixon, R. y González, R. 1994. Plant cell culture: A practical approach. Rickwood & Hames (Ed.). Oklahoma: Oxford University Press.

Ellstrand, N.C. 2003. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358:1163-1170.

Espinoza, C., Schlechter, R., Herrera, D., Torres, E., Serrano, A., Medina, C. y Arce-Johnson, P. 2013. Cisgenesis and intragenesis: New tools for improving crops. *Biol Res* 46:323-331.

Fraley, R., Rogers, S., Horsch, R., Sanders, P, Flick, J., Adams, S., Bittner, M., Brand, L., Fink, C., Fry, J., Galluppi, G., Goldberg, S., Hoffmann, N. y Woo, S. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(15):4803–4807.

Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium* and plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:16–37.

Gidoni, D., Srivastava, V. y Carmi, N. 2008. Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* DOI 10.1007/s11627-008-9140-3

- Goldschmidt-Clermont, M. 1991. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of chlamydomonas. *Nucleic Acids Res.* 19(15):4083–4089.
- Gupta, S. y Van Eck, J. 2016. Modification of plant regeneration medium decreases the time for recovery of *Solanum lycopersicum* cultivar M82 stable transgenic lines. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. En línea <http://biorxiv.org/content/biorxiv/early/2016/04/02/046839.full.pdf>
- Hanyu, H., Murata, A., Park, E. Y., Okabe, M., Billings, S., Jelenkovic, G., Pedersen, H. y Chin, C-K. 1999. Stability of luciferase gene expression in a long term period in transgenic eggplant, *Solanum melongena*. *Plant Biotechnology* 16(5):403-407.
- Hernández, E. 2013. Metodología para la escisión de genes marcadores de selección en plantas de *Digitalis purpurea* L. mediante el sistema Cre/lox. Universidad Central Marta Abreu de las Villas.
- Herrera-Estrella L., De Block, M., Messens, M., Hernalsteens, J. P., Van Montagu, M. y Schell. J.

1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2:987-995.

Holme, I., Wendt, T. y Holm, P. 2013. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal* 11:395-407.

Hooykaas, P. y Schilperoort, R. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* 19:15-38.

Jin, S. G., Prusti, R., Roitsch, T., Ankenbauer, R. y Nester, E. 1990a. Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *Journal of Bacteriology* 172:4945-4950.

Jin, S. G., Prusti, R., Roitsch, T., Ankenbauer, R. y Nester, E. 1990b. The regulatory VirG protein specifically binds to a cis-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *Journal of Bacteriology* 172:531-522.

Kavanagh, A., Nguyen, D., Lao, N. T., Noreen, M., Peter, S. O., Horvath, E. M., Dix, P. J. y Medgyesy, P. 1999. Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics* 152:1111-1122.

Kilby, N. J., Davies, G. J., Snaith, M. R. y Murray, J. A. H. 1995. FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. *Plant J.* 8(5):637–652.

Kim, C, Park, S., Kikuchi, S., Kwon, S., Park, S., Yoon, U., Park, D., Seol, Y., Hahn, J., Park, S. y Kim, D. 2010. Genetic analysis of gene expression for pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa*). *BioChip J.* 4:123–128.

Kopertekh, L. y Schiemann, J. 2012. Elimination of transgenic sequences in plants by Cre gene expression. En Y. Çiftçi (Ed.), *Transgenic plants - Advances and limitations* (págs. 449-468). InTech. DOI: 10.5772/32943. En línea <http://www.intechopen.com/books/transgenic-plants-advances-and-limitations/elimination-of-transgenic-sequences-in-plants-by-cre-gene-expression>

- Kyndt, T., Quispe, D., Zhai, H., Jarret, R., Ghislain, M., Liu, Q., Godelieve, G. y Kreuze, J. 2015. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* t-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. PNAS Early Edition. DOI10.1073/pnas.1419685112
- López, N. 2011. Eliminación del gen marcador de selección en plantas transplastómicas mediante la expresión transitoria de la recombinasa Cre. Universidad Pública de Navarra.
- Magioli, C. y Mansur, E. 2005. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. Acta bot. bras. 19(1):139-148.
- Maliga, P. 2004. Plastid transformation in higher plants. Annual Review of Plant Biology 55:289–313.
- Mallory-Smith, C. y Zapiola, M. 2008. Gene flow from glyphosate-resistant crops. Pest Manag. Sci. 64:428–440.
- Mantilla, M. B. 2008. Transformación genética de la naranjilla, *Solanum quitoense*, mediante

Agrobacterium tumefaciens (Tesis de grado). Quito. Ecaudor. USFQ. 69 p.

Martínez, M., Cabrera, J. y Herrera, L. 2004. Las plantas transgénicas: una visión integral. e-Gnosis Revista digital. Ciencia y Tecnología (Méjico). 2: Art 2. En línea <http://www.e-gnosis.udg.mx/index.php/e-gnosis>

Mendoza de Gyves. 2001. Abrobiotecnología. México D.F. Grupo Editorial Iberoamérica.

Miki, B., Abdeen, A., Manabe, Y. y MacDonald, P. 2009. Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. *Plant Biotechnol. J.* 7:211-218.

Ow, D. W. 2002. Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant Mol Biol.* 48(1-2):183-200. DOI: 10.1023/A:1013718106742

Qaim, M. 2009. The economics of genetically modified crops. *Annual Review of Resource Economics* 1(1):665–693.

Ream, W. 2008. Production of a mobile T-DNA by *Agrobacterium tumefaciens*. En T. Tzfira, y V.

Citovsky (Eds.), *Agrobacterium from biology to biotechnology*. Springer Science + Business Media. LLC. Nueva York. Estados Unidos.

Rommens, C. M. 2004. All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends Plant Sci.* 9(9):457-64.

Rommens, C. M., Ye, J., Richael, C. y Swords, K. 2006. Improving potato storage and processing characteristics through all-native DNA transformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:98829887.

Rommens, C. M., Haring, M. A., Swords, K., Davies, H. D. y Belknap, W. R. 2007. The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends in Plant Science* 12:387-403.

Sanford, J. 2000. The development of the biolistic process. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 36:303-308.

Sauer, B. 1998. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *A Companion to Methods in Enzymology* 14:381-392.

- Schouten, H., Krens, F. y Jacobsen, E. 2006a. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO reports* 7(8):750-753.
- Schouten, H., Krens, F. y Jacobsen, E. 2006b. Do cisgenic plants warrant less stringent oversight?. *Nat. Biotechnol.* 24(7):753.
- Siemnes, J. y Schieder, O. 1996. Transgenic plants: transformation-recent developments and the state art. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 2.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M. y Zambryski, P. 1985. Identification of signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318:624-629.
- Stanton, G. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* No 51:223-256.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. y Maliga, P. 1990a. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:8526-8530.

Svab, Z., Harper, E. C., Jones, J. D. y Maliga, P. 1990b. Aminoglycoside-3 adenytransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* 14:197–205.

Thilmony, R., Mara, G. y Cook, M. 2010. New molecular tools for improved crop biotechnology. Presentación oral del congreso de la International Association of Plant Biotechnology. St. Louis. Missouri. Estados Unidos. 6-11 junio. 2010.

Tovar, J. 2011. Desarrollo y pruebas funcionales de un vector binario para la intragénesis de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lamarek. 1793) (Tesis de posgrado). Lima. Perú. UNALM. 31 p.

Valderrama, A. M., Arango, R. y Afanador, L. 2005. Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Ingeniería genética natural aplicada. *Revista Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia* 58(1):2569-2585.

Vasil, I. 2007. A short history of plant biotechnology. *Phytochem. Rev. (Holanda)* 7:387-394.

- Viswanath, V. y Strauss, S. H. 2010. Modifying plant growth the cisgenic way. ISB News Report September 2010:1-4.
- Wang, Y., Yau, Y., Perkins-Balding, D. y Thomson, J. 2011. Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant Cell Rep.* 30:267–285. DOI 10.1007/s00299-010-0938-1
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. 2014. *Molecular biology of the gene*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Seventh Edition. 872 p.
- Weeks, J. T., Ye, J. y Rommens, C. M. 2008. Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research* 17:587-597.
- Winans, S. C., Mantis, N., Chen, C., Chang, C. y Han, D. 1994. Host recognition by the VirA VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Research Microbiology* 145:461-473.
- Yoo, S. Y., Bomblies, K., Yoo, S. K., Yang, J. W., Choi, M. S., Lee, J. S., Weigel, D. y Ahn, J. H. 2005. The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta* 221:523-530.

Zheng, X. L., Deng, W., Luo, K. M., Duan, H., Chen, Y. Q., McAvoy, R., Song, S. Q., Pei, Y. y Li. Y. 2007. The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. *Plant Cell Rep.* 26:1195-1203.

BIOINFORMÁTICA EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS

La bioinformática consiste en la aplicación de técnicas computacionales que permiten investigar sistemáticamente procesos moleculares complejos (Durbin *et al.* 1998); se utiliza en la agricultura, pues las bases de datos genómicos de plantas y el análisis de expresión génica representan una disciplina en transición y un papel muy importante para el desarrollo de nuevos cultivares, más productivos y más resistentes a enfermedades, debido a que las nuevas tecnologías de secuenciación tienen el potencial para descubrir genes novedosos y sus funciones (Bryan y Hein 2008; Meneses *et al.* 2011). Es un conjunto de herramientas que aprovecha el desarrollo de la computación y las matemáticas, y permite la administración, análisis y comprensión de datos para resolver preguntas biológicas (Zárate 2008).

Generalidades acerca de la bioinformática

La bioinformática surge como asignatura auxiliar de la genómica y otras x-ómicas, que necesitan del procesamiento de enormes cantidades de datos generados con los avances en biología molecular y equipamiento disponible, tales como secuenciación sistemática, proteómica, matrices de

expresión, prospección de genes, metabolómica, otros. Así, la informática se integra con la biología para el manejo, estudio y proceso de datos en crecimiento exponencial, que permiten un alto nivel de organización (Attwood y Parry-Smith 2002). Las secuencias nucleotídicas son componentes mayoritarios de la información almacenada en repositorios bioinformáticos; incluye aspectos de gran complejidad biológica como la simulación de sistemas celulares y redes de interacción molecular.

Bioinformática, biología computacional y biocomputación

Es necesario distinguir tres acepciones que involucran a la biología y la informática (Meneses *et al.* 2011):

Bioinformática o biología molecular computacional

Abarca la investigación y desarrollo de infraestructura y sistemas de información y comunicaciones que requiere la biología molecular y la genética (redes y bases de datos genómicos, microarreglos, otros).

Biología computacional

Ciencia de la computación aplicada al entendimiento de cuestiones biológicas básicas, no necesariamente a nivel molecular, mediante modelización y simulación (ecosistemas, modelos fisiológicos, redes de neuronas artificiales, algoritmos genéticos, otros).

Biocomputación

Contempla el desarrollo y utilización de sistemas computacionales basados en modelos y materiales biológicos (biochips, biosensores, computación basada en ADN, otros).

Aplicación de técnicas computacionales

La evolución computacional y la capacidad de almacenamiento son importantes, posibilitan el entendimiento de una cantidad de información determinada. Existen algoritmos que comparan secuencias, basados en la teoría de probabilidades; tales comparaciones se usan para la determinación de funciones génicas, desarrollo de relaciones filogenéticas y simulación de modelos proteicos (Attwood y Parry-Smith 2002).

El desarrollo tecnológico de *software* y telecomunicaciones permite un avance significativo en cuanto a técnicas para procesamiento y análisis de datos se refiere, y benefician al estudio científico, permitiendo conocer acertadamente las estructuras de los organismos vivos (Meneses *et al.* 2011). A continuación, se revisa algunos aspectos técnico-computacionales para el análisis de secuencias de ADN.

Conceptos GO

El proyecto GO (*gene ontology*) abarca una de las caracterizaciones más potente de genes; usa vocabulario estructurado en ontologías para describir productos génicos en términos de procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares (Consortio 2000). Los términos GO están organizados como redes jerárquicas, donde cada nivel corresponde a una definición (o término) de distinta especificidad; a mayor nivel de término, la información es más general que la del término de nivel inferior; permiten automatizar la búsqueda de funciones génicas en bases de datos (QuickGo).

Formato FASTA

Es el texto para representar secuencias de nucleótidos y péptidos, representados por una sola letra; posee símbolos para indicar un hueco (*gap*) o parada en la traducción o que no se sabe el nucleótido o aminoácido; existe una línea que tiene en la primera posición el símbolo > al que sigue una descripción de la secuencia y en la siguiente línea empieza la secuencia de bases o aminoácidos. Se recomienda no tener más de 80 columnas, no obstante, se puede tener todas las filas requeridas (Ayala 2017).

Secuencias de ADN

El análisis de secuencias de ADN busca similitudes funcionales y estructurales y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas, comparando secuencias nuevas (desconocidas) con secuencias anotadas (conocidas). El análisis incluye alineación de secuencias, búsqueda en bases de datos, descubrimiento de patrones, reconstrucción de relaciones evolutivas, y formación y comparación de genomas. La comparación se realiza mediante comportamientos bioquímicos o de acuerdo a estructuras proteicas; si dos secuencias de diferentes organismos son similares, se dice que son secuencias homólogas. El fundamento de este tipo de comparación es la alineación de secuencias, se comparan mediante la

búsqueda de patrones de caracteres comunes y el establecimiento de residuos de correspondencia entre secuencias relacionadas. El alineamiento de pares de secuencias es primordial en la búsqueda de similitudes dentro de bases de datos y el alineamiento de secuencias múltiples (Xion 2005).

Bases de datos o repositorios

Los repositorios de mayor uso bioinformático son el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, National Center of Biotechnology Information) en los Estados Unidos, Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL, European Molecular Biology Laboratory) en Europa, Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) en Japón (Ayala 2017), Red Europea de Biología Molecular (EMBnet) en Colombia, otros. A continuación se mencionan algunas bases de datos disponibles en internet, con funcionalidades interesantes para ser aplicadas en estudios biomoleculares computacionales.

NCBI

Establecido en 1988, es un repositorio de información sobre biología molecular; crea bases de datos públicas, conduce investigación en biología computacional, y desarrolla herramientas software para análisis de datos genómicos (Figura 6.1) (UACH).

NCBI Resources How To

Gene TIV1 solanum
Create RSS Save search Advanced

Full Report Send to: ▾

[See also 1 discontinued or replaced items.](#)

AI beta-fructosidase [*Solanum lycopersicum* (tomato)]
Gene ID: 543992, updated on 21-Nov-2019

Summary

Gene symbol AI
Gene description beta-fructosidase
Gene type protein coding
RefSeq status VALIDATED
Organism [Solanum lycopersicum](#)
Lineage Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae; Solanoideae; Solaneae; Solanum; Lycopersicon
Also known as TAI; TIV1; Aiv-1

Genomic context

Location: chromosome: 3 See AI in [Genome Data Viewer](#)

Exon count: 7

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
103	current	SL3.0 (GCF_000188115.4)	3	NC_015440.3 (55279198..55283385, complement)
102	previous assembly	SL2.50 (GCF_000188115.3)	3	NC_015440.2 (53851118..53855304, complement)
100	previous assembly	SL2.40 (GCF_000188115.1)	3	NC_015440.1 (47397618..47401823, complement)

Figura 6.1. Plataforma web de la base de datos NCBI. Búsqueda del gen TIV1 en *Solanum*.

Nota: NCBI, 2019

UniProt/SWISS-PROT

UniProt es un repositorio central de datos cuya misión es aportar a la comunidad científica con un recurso

comprensible, de alta calidad y de libre acceso de secuencias e información funcional de proteínas. SWISS-PROT es una base de datos de secuencias anotadas de proteínas, creada en 1987 en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Ginebra en colaboración con el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL). Se distingue debido a tres criterios: anotaciones, mínima redundancia e integración con otras bases de datos (Figura 6.2). Pueden distinguirse dos clases de datos, los datos *core* y las anotaciones. Para cada entrada, los datos *core* consisten en los datos de secuencia, la información citada y los datos taxonómicos; mientras que la anotación consiste en la descripción de la funcionalidad de las proteínas, modificaciones postranscripcionales, dominancia y sitios de dominancia, estructuras secundarias, similitud con otras proteínas, etc. (Bairoch y Apweiler 2000). Algunas bases de datos contienen para una proteína dada, entradas separadas que corresponden a diferentes reportes, mientras que SWISS-PROT trata en lo posible de fusionar todos esos datos con un mínimo de redundancia. También proporciona a los usuarios un grado de integración y enlace a colecciones de datos especializadas mediante referencias en forma de puntos de información con enlaces a Data Bank Reference, EMBL, otros.

The screenshot displays the UniProtKB search results for the protein TIV1. The search query is 'tiv1 solanum'. The results table shows one entry: P29000, INVA_SOLLC, Acid beta-fructofuranosidase, TIV1 INV-1, Solanum lycopersicum (Tomato) (Lycopersicon esculentum), with a length of 636. The detailed view for this entry shows it is a protein, gene, and organism. The function is 'Acid beta-fructofuranosidase' and the catalytic activity is 'Hydrolysis of terminal non-reducing beta-D-fructofuranoside residues in beta-D-fructofuranosides'. The pathway is 'sucrose metabolism'.

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
P29000	INVA_SOLLC	Acid beta-fructofuranosidase	TIV1 INV-1	Solanum lycopersicum (Tomato) (Lycopersicon esculentum)	636

Function¹
Catalytic activity¹
 • Hydrolysis of terminal non-reducing beta-D-fructofuranoside residues in beta-D-fructofuranosides. PROSITE-ProRule annotation EC:3.2.1.26
 Pathway²: sucrose metabolism

Figura 6.2. Plataforma web de la base de datos UniProt/SWISS-PROT. Búsqueda del gen TIV1 en *Solanum*.

Nota: UniProt/SWISS-PROT, 2020

KEGG

Fue iniciada en mayo de 1995 bajo el Programa Genoma Humano del Ministerio de Educación, Ciencia, Deporte y Cultura en Japón. Todos los datos y herramientas de software asociados se encuentran disponibles como parte del servicio Japanese GenomeNet. Consiste en tres formas de datos: PATHWAY para representar alto orden en términos de funcionalidad de las interacciones moleculares; GENES para la colección de catálogos génicos para genomas completos y parciales (Figura 6.3); y LIGAND para la colección de compuestos químicos en la célula, moléculas y reacciones enzimáticas (Kanehisa y Susumu 2000).

KEGG Solanum lycopersicum (tomato): 543992 [Help](#)

Entry	543992 CDS T02665
Gene name	AI
Definition	(RefSeq) acid beta-fructofuranosidase precursor
KO	K01193 beta-fructofuranosidase [EC:3.2.1.26]
Organism	sly Solanum lycopersicum (tomato)
Pathway	sly00052 Galactose metabolism sly00500 Starch and sucrose metabolism sly01100 Metabolic pathways sly01110 Biosynthesis of secondary metabolites
AA seq	636 aa AA seq DB search MATQCYDPENSASRYTL LLDQPDSDGHRKSLKIIISGIFLSVFL LLSVAFFPILNNQSPDLQ IDRSRSPAPSRGVSQGVSDKTF RDVAGASHVSYAWSNAML SWQRTAYHFQPKNNMNDPN GPLYHKGWYHLFYQYNPDSA IINGNITWGHAVSKDL IHWLYLPFAMVPDQWYDINGVMTGS ATILPDGQIMMLYTGDTDDYVQVQNLAYPANLSDPLL LDWVKFKGNPVLVPPPGIGVKDF RDPTTAWTPGQNGWLLTIGSKI GKTGVALVYETSNF SFKLLDGLV LHAVPGTMWECVD FYPVTKKTNGLDTSYNGPGVKHVLKASLDDNKQDHYAIGTYDLGKNKWTPDNPELDCGI GLRLDYGKYYSKTFYDPK KERRVLWGWIGETDSESADLQKGWASVQSIPTVLYDKKTI THLLQWPVEEIESLRVGDPTVKQVDLQPGSIELLRVDSAAELDIEASFVQKVALQGIIE ADHVGFSCSTSGGAASRGLGPFVIVIA DQTLSELPVYFYISKGADGRAE THFCADQT RSSEAPGVGKQVYGS SVPVLDGKHSMLLVDHSIVESFAQGGRTVITSRIYPTKAVNGA ARLFVFNATGASVTASVKIWSLESANIQS FPLQLD
NT seq	1911 nt NT seq atggccactcagtgttatgacccccgaaaactccgctctcgttacacattactccggat caaccgattccggccaccggaagtcccttaaaatcatctccggcattttcctcctcggt ttccttttctcttctgtagccttcttcgacatcctcaacaacagtcaccggagcttgcaa atcgactccggttcgcccggcgcgcccgtcaagagggtgttctcaggaggagctccgataaa acttttcgagatgtagccgggtgtagtcaagttcttattcgtggtccaatgctatgctt agctggcaagaacggcttaccattttcaacctcaaaaaaattggatgaacgactcaaat ggaccattgtatcacaaggatgggtaccacctttttatcaatacaaatccagattcagct atttggggaaatatacatggggccatgctgtatccaaggacttgatccactggctctc ttgctctttgcatgggtcctgatacaatggatgatattaacgggtctccgacagggtcc gtaccatctacggatggtagatgatgatgctttatacgggtgacactgatgatgat gtcaagtgcaaaatcttgcgtaccggcacaacttatctgatcctcctctagactgg gtcaagttcaaggcaaccgggtctcgttctccaccggcattgggtgcaaggacttt agagaccgactactgcttggaccggaccacaaaatgggcaatggctgttaacaatcggg tcaagattggtaaaacgggtgtgctactgtttatgaaacttcaacttcaacaagcttt aagctattggatggagtgctgcatgctggttccgggtacgggtatgtgggagtggtggac ttttaccggatatactaaaaaaacaaacgggttggacacatcataaacggggcgggt gtaaagcatgtttaaagcaagtttagatgacaataagcaagatcattatgctattgggt agctatgacttgggaaagaacaaatggacaccgataaacggaaatggatgtggaaat gggttgagactagactatgggaaatattatgcatcaagactttttatgaccgaaagaaa gaacgaagagtagtggggatggattgggaaactgacagtgatctgctgacctgcaag aaggatgggcatctgtacagagtattccaaggacagtgctttacgacaagaagacagg acacatctactcagtgccagtggaagaattgaaagcttaagagtgggtgatcctact gttaagcaagtcgacttcaaccaggctcaattgagctactcctgttgactcagctgca gagttggatataagaagctcatttgaagtggaacaaagtcgctcaggsgaataattgaa gcagatcatgtagggttcagttgctctactagtgagggtgctgtagcagaggcattttg ggaccatttgggtcatagtaattgctgatcaaacgctatctgagctaacgcaatttac ttttacatttcaaggagctgatggtcgtgacagactcactctgtgctgatcaaac agatccttgaggctccggagttggtaacaagtttatggtagttcagtaacctgtgtg gacggtgaaaaacattcaatgagattattggtggatcactcaatttggagagctttgct caagggaagaacagtcataacatcgcgaatttaccacaagggcagtaaatggagca gcacgactcttgtttcaacaatgccaggggctagcgttactgctccctcgtcaagatt tggctcacttgagtcagtaataattcaatccttcccttggcaagactgttaa

Figura 6.3. Plataforma web de la base de datos KEGG. Búsqueda del gen TIV1. Se muestra las secuencias en aminoácidos y nucleótidos correspondientes al gen.

Nota: KEGG, 2019

Homología de secuencias en internet

La búsqueda de genes o secuencias homólogas en bases de datos forma parte de la actividad de investigación y asistencial en laboratorios de genética molecular (Oliva 2004).

Supuesto de partida

Investigación para caracterizar genes de la región x del cromosoma 3 de tomate, asociada a la acumulación de sacarosa en frutos de diversas plantas; la secuencia codificante (CDS, *coding sequence*) para el gen TIV1 se muestra a continuación en formato FASTA:

```
>sp|P29000|INVA_SOLLC Acid beta-fructofuranosidase
OS=Solanum lycopersicum OX=4081 GN=TIV1 PE=2 SV=1
MATQCYDPENSASRYTLLPDQPDSGHRKSLKIISGIFLSVFLL
LSVAFFPILNNQSPDLQ
IDSRSPAPPSRGVVSQGVSDKTFRDVAGASHVSYAWSNAMLS
WQRTAYHFQPQKNWMNDPN
GPLYHKGWYHLFYQYNPDSAIWGNITWGHAVSKDLIHWLY
LPFAMVPDQWYDINGVWTGS
ATILPDGQIMMLYTGDTDDYVQVQNLAYPANLSDPLLLDW
VKFKGNPVLVPPPGIGVKDF
RDPTTAWTGPQNGQWLLTIGSKIGKTGVALVYETSNFTSFK
LLDGVLHAVPGTGMWECVD
FYPVSTKKTNGLDTSYNGPGVKHVLKASLDDNKQDHYAIGT
YDLGKNKWTPDNPELDCGI
GLRLDYGKYYASKTFYDPKKERRVLWGWIGETDSESADLQK
GWASVQSIPRTVLYDKKTG
THLLQWPVEEIESLRVGDPTVKQVDLQPGSIELLRVDSAAEL
DIEASFEVDKVALQGIIE
ADHVGFCSTSGGAASRGILGPFVIVVIADQTLSELTPVYFYIS
KGADGRAETHFCADQT
RSSEAPGVGKQVYGSSVPVLDGEKHSMLLDVHSIVESFAQ
GGRTVITSRIYPTKAVNGA
ARLFVFNATGASVTASVKIWSLESANIQSFPLQLD
```

Determinación

Para determinar si la secuencia codificante de interés se parece a alguna secuencia transcrita se compara con una base de datos mediante el programa BLAST. Con la secuencia codificante en pantalla se selecciona con el cursor y se copia. Después es preciso poner el cursor en la ventana BLAST, pegar y computar. Se abrirá una nueva pantalla con los alineamientos, un listado de códigos y nombres de clones; a la derecha aparece el valor-E, que es la probabilidad de detección al azar (Figura 6.4).

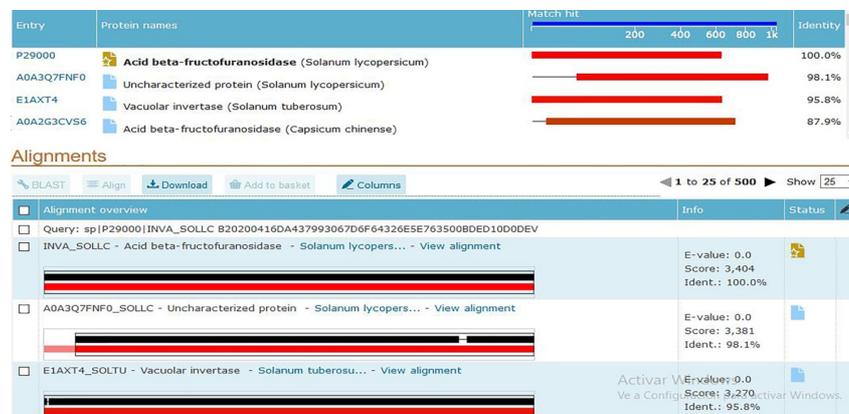


Figura 6.4. Alineamiento para el gen TIV1, listado de códigos, nombres de clones y valor-E.

Nota: UniProt/SWISS-PROT, 2020

Búsqueda de homología

El valor-E equivale a la probabilidad de que la homología obtenida entre la secuencia de interés y la del banco de datos sea debida al azar. Mientras más cercano sea el valor-E = 0 menos probabilidad hay de que la homología sea debida al azar (Oliva 2004) (Figura 6.5).

E1AXT4		E1AXT4_SOLU - Vacuolar invertase <i>Solanum tuberosum</i> (Potato)	
E-value: 0.0			
Score: 3270			
Ident: 95.8%			
Positives : 97.2%			
Query Length: 636			
Match Length: 639			
P29000	INVA_SOLLC	1	MATQ---CYDPENSASRYTLFPDQPSGHRKSLKIIISGIFLSVFLLLSVAFFPILNNQSP 57
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	1	MATQ YD ENSAS YT LPDQPSGHRKSLKIIISGIFLSVFLLLSVAFFPILNNQSP 60
P29000	INVA_SOLLC	58	DLQIDRSFAPPSRGVSGQVSDKIFRDVAGASHVSYAWSNMLSWQRTAYHFQPKRWGN 117
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	61	DLQ +SRSPAPPSRGVSGQVSDKIFRDV ASHVSYAWSNMLSWQRTAYHFQPKRWGN 120
P29000	INVA_SOLLC	118	DPNGPLYHKGWHLFYQYNPDSAINGNITWGHAVSKDLIHNLVLPFAMVPDQNYDINGVN 177
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	121	DPNGPLYHKGWHLFYQYNPDSAINGNITWGHAVSKDLIHNLVLPFAMVPDQNYDINGVN 180
P29000	INVA_SOLLC	178	TGSATILFDGQIMMLYTGDTDDYVQVQNLAYPANLSDELLLDWVKGNFVLPVPPGIGV 237
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	181	TGSATILFDGQIMMLYTGDTDDYVQVQNLAYP NLSDFLLLDWVK+KGNFVLPVPPGIGV 240
P29000	INVA_SOLLC	238	KDFRDPTTANTGPNQGNLLIIGSKIIGKIGVALVYETSNTFSFKLLDGLVHAVPGTGMWE 297
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	241	KDFRDPTTANTGPNQGNLLIIGSKIIGKIGVALVYETSNTFSFKLLDGLVHAVPGTGMWE 300
P29000	INVA_SOLLC	298	CVDFYFVSTKKTINGLDTSYNGPGVHVLAASLDDNKQDHYAIGTYDLGNKWIIPDNFELD 357
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	301	CVDFYFVST+KTINGLDTSYNGPGVHVLAASLDDNKQDHYAIGTYDL GNKWIIPDNFELD 360
P29000	INVA_SOLLC	358	CGIGLRLDYGKYASKTFYDEPKERRVWNGWIGETDSEADLQKGNASVQSIPIRIVLYDK 417
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	361	CGIGL+LDYGKYASKTFYDEPK+RRVWNGWIGETDSEADLQKGNASVQSIPIRIVLYDK 420
P29000	INVA_SOLLC	418	KTGTHLLQWPVEEIESLRVGDPIVQVLDLQPGSIELLRVDSAAELDIEASFEVDKVALQG 477
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	421	KTGTHLLQWPVEEIESLR GDP VKQV+LQPGSIELL VDSAAELDIEASFEVDKVALQG 480
P29000	INVA_SOLLC	478	IIEADHVGFSCSTSGGAASRGILGPFVVIADQTLSELPVYFYISKAGDGRAETHFCA 537
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	481	IIEADHVGFSCSTSGGAASRGILGPFVVIADQTLSELPVYFYISKAGDGRAETHFCA 540
P29000	INVA_SOLLC	538	DQTRSSEAPGVGKQVYGVSSVFLDGEKHSMLLVDSHIVESFAQGGRTVITSRIYPTKAV 597
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	541	DQTRSSEAPGV KQVYGVSSVFLDGEKHSMLLVDSHIVESFAQGGRTVITSRIYPTKAV 600
P29000	INVA_SOLLC	598	NGAARLFVFNATGASVIVASVKINSLESANIQSFPQLDL 636
E1AXT4	E1AXT4_SOLU	601	NGAARLFVFNATG+SVIVASVKINSLESANIQSFPQLDL 639

Figura 6.5. Homología en las secuencias codificantes del gen TIV1 de tomate y papa.

Nota: UniProt/SWISS-PROT, 2020

Consideraciones acerca de la bioinformática

La bioinformática atrae la conjugación de disciplinas como informática, matemáticas, estadística, química y ciencias biológicas no tradicionales; la aplicación de estas disciplinas con técnicas computacionales, es un beneficio para la creación de proyectos dedicados al descubrimiento y desarrollo de fármacos, análisis de genomas, control biológico, entre otros. Esto implica el uso de tecnologías informáticas y métodos estadísticos para manejar y analizar un gran volumen de datos biológicos respecto a ADN, ARN, secuencias, estructuras e interacciones proteicas.

Referencias bibliográficas

- Attwood, T. K. y Parry-Smith, D. J. 2002. Introducción a la bioinformática. Prentice Hall.
- Ayala, G. 2017. Bioinformática estadística: Análisis estadístico de datos ómicos con R/Bioconductor. Universidad de Valencia.
- Bairoch, A. y Apweiler, R. 2000. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research* 28(1).

- Bryan, G. J. y Hein, I. 2008. Genomic resources and tools for gene function analysis in potato. *International journal of plant genomics* 2008:1-9.
- Consortio. 2000. The gene ontology consortium. *Nature Genet.* 25:25-29.
- Durbin, R., Eddy, S., Krogh, A. y Mitchinson, G. 1998. *Biological sequence analysis. Probabilistic models of proteins and nucleic acids.* Cambridge: Cambridge University Press. 356 p.
- EMBnet Colombia. 2005. Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología (CBIB) de la Universidad Nacional de Colombia.
- Kanehisa. M. y Susumu. G. 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28(1):27-30.
- Meneses, C., Rozo, L. y Franco, J. 2011. Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica* Año XVI, No 49. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701.
- Oliva. R. 2004. *Genética médica.* Edicions Universitat Barcelona. 346 pp.

UACH. Sistema de Bibliotecas. Universidad Austral de Chile. En línea http://www.biblioteca.uach.cl/biblioteca_virtual/bdt_excom_ncbi.htm

Xion, Jin. 2006. Essential bioinformatics. Estados Unidos de América: Cambridge University Press. 331p. ISBN 978-0-511-16815-4

Zárate, S. 2008. Búsqueda de los genes de resistencia Mi-1 Y Mi-3 al nematodo formador de nudo *Meloidogyne* spp. En varias especies silvestres de la familia Solanaceae del Ecuador (Tesis de grado). ESPE. Sangolquí.

ISBN: 978-9942-33-536-4



compAs
Grupo de capacitación e investigación pedagógica



@grupocompas.ec
compasacademico@icloud.com