

PERSPECTIVAS DE LA FISIOTECNIA EN RELACION A LAS NUEVAS TECNICAS DE LA BIOTECNOLOGIA

Hilda Susana Azpiroz Rivero¹

INTRODUCCION

Después del redescubrimiento de las leyes de Mendel, se han venido presentando acontecimientos científicos y tecnológicos que han permitido mejorar continuamente las metodologías del fitomejoramiento genético para manipular las características de las plantas cultivadas (Cuadro 1).

La Genotecnica, mediante sus diferentes métodos de selección y empleando como premisa la variabilidad genética, particularmente la intraespecífica, ha dirigido sus esfuerzos a la obtención de nuevas variedades de plantas más rendidoras y mejor adaptadas a los medios bióticos y abióticos adversos.

Para medir la capacidad de adaptación de los individuos seleccionados conviene emplear parámetros fisiológicos y fisiotécnicos, por su gran utilidad para la discriminación de genotipos con base en características definidas para esa adaptación.

La Fisiotecnica, además de perfeccionar y modernizar el tipo de mediciones de las reacciones fisiológicas de las plantas sometidas a la presión de ambientes extremos, también ha logrado incorporar el estudio de los procesos bioquímicos que se presentan como consecuencia de esa pre-

sión de selección. Esto último con la finalidad de asociar los fenómenos fisiológicos a la presencia o actividad de los metabolitos implicados en los mecanismos de adaptación.

SELECCION IN VITRO

Los avances de la Biotecnología, en cuanto al cultivo *in vitro* de células y tejidos, ha dado a la Fisiotecnica una alternativa más para estudiar bajo condiciones controladas y en espacios relativamente pequeños, materiales con adaptaciones diversas. Entre los avances se pueden mencionar:

- El uso de tensioactivos en los medios de cultivo para producir una presión osmótica que simule la sequía (Muñoz, 1986).
- El uso de iones en los medios de cultivo como inductores de procesos metabólicos que permitan la selección de materiales con tolerancia a esos iones, como Na⁺ y Al⁺.
- La aplicación de temperaturas extremas o fotoperíodos diversos en tejidos, órganos y células vegetales, como inductores o inhibidores de funciones metabólicas.

Otros métodos relacionados con la Biotecnología que podrían ser de interés para la Fisiotecnica, son:

- Aislamiento de líneas celulares de tabaco (*Nicotiana tobaco* L.) en concentraciones de 598 y 769 mM de NaCl (Handa *et al.*, 1986).

¹ Investigadora del INIFAP-CIFAP México. Apdo. Postal 10. C.P. 56230. Chapingo, México.

Cuadro 1. Relación cronológica de algunos adelantos científicos o tecnológicos que están contribuyendo a la mejor comprensión de fenómenos fisiológicos y moleculares de las plantas.

1900	Redescubrimiento de las leyes de la herencia de Mendel.
1922	Morgan desarrolla las técnicas de mapeo de genes y prepara el mapa genético de los cromosomas de la mosca de la fruta.
1940	Primera transferencia interespecífica de genes en trigo.
1944	Avery, MacLeod y MacCarty demuestran que los genes están compuestos por ácido deoxyribonucleico.
1953	Watson y Crick descubren la estructura de doble hélice en el ADN.
1956	Descubrimiento de las sustancias reguladoras del crecimiento.
1960 a 1970	Se generan técnicas para el cultivo de protoplastos y anteras, la producción de embriones somáticos y la organogénesis proliferativa.
1973	Primera clonación de genes usando la tecnología del ADN recombinante.
1980	Se patenta la técnica de construcción de ADN recombinante.
1983	Primera transferencia exitosa en plantas de genes de especies diferentes.
1987 a 1989	Evaluación en campo de plantas transgénicas (E.U.A. y México) de tomate con resistencia a insectos y antígeno de poligalacturonasa.

- Selección de células de alfalfa (*Medicago sativa* L.), tabaco y camote (*Ipomoea batatas* L.) en una concentración de 171 mM de NaCl (Salgado-Garciglia *et al.*, 1985).

- Selección de embriones inmaduros de una cruz interespecífica en girasol (*Helianthus annuus* L.) en concentraciones de 0 a 8% de manitol (Azpiroz *et al.*, 1988).

- Selección *in vitro* de diferentes especies de *Solanum* con resistencia controlada al frío (Stone *et al.*, 1991).

- Síntesis de proteína en callos de trigo (*Triticum aestivum* L.) expuestos a bajos potenciales osmóticos (Weeks *et al.*, 1991).

- Efecto de compuestos orgánicos e inorgánicos sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de inflorescencias femeninas de maíz (*Zea mays* L.) (López *et al.*, 1990).

- Selección de alfalfa en medios con diferentes niveles de aluminio (Kamp *et al.*, 1991).

Algunas ventajas de la selección o evaluación *in vitro*, que pueden ser aprovechadas y complementadas por la Fisiotecnia y la Genotecnia, son:

- 1) El alto número de genotipos y explantes que se puede tener en desarrollo al mismo tiempo.
- 2) El espacio relativamente pequeño que se requiere en estos estudios.
- 3) El menor tiempo que se requiere en comparación al empleado tradicionalmente.
- 4) El estricto control de los factores nutricionales y físicos.
- 5) La fácil administración de los agentes de selección.
- 6) La diversidad en los tipos de explante que pueden ser empleados en la selección (células, protoplastos, polen, anteras, ovarios, embriones o meristemos).

LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS Y LOS MARCADORES MOLECULARES EN LA ADAPTACIÓN DE LOS CULTIVOS A MEDIOS ADVERSOS

La salinidad, el déficit hídrico, las temperaturas extremas, la intensa o deficiente radiación y el fotoperíodo, entre otros factores, causan en las plantas efectos de inducción o inhibición de la actividad metabólica, lo que altera la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y, consecuentemente, el crecimiento y la producción.

La capacidad de las plantas para adaptarse al medio está ligada a factores genéticos, los

que a su vez regulan una actividad endógena de tipo bioquímico (Giovannozzi *et al.*, 1985). Así, por ejemplo, se tiene que las plantas expuestas a tensión hídrica o salinidad, sufren un abatimiento del potencial hídrico celular que hace que las membranas plasmáticas disparen la síntesis de ácido abscísico y, como consecuencia, ocurran los procesos fisiológicos ligados a este compuesto (Reid y Wample, 1985), como son: aumento en la resistencia estomática, reducción de los niveles del ácido giberélico, cambios en la permeabilidad de la membrana celular y alteraciones en la tasa de absorción de agua (Carter y Brenner, 1985).

Otro ejemplo lo constituye la presencia de prolina libre, que se manifiesta en diversas especies sometidas tanto a temperaturas extremas como a altas presiones osmóticas. Se ha sugerido que este compuesto puede actuar como conservador de energía para usarse durante el metabolismo post-tensional o como un tensioactivo citoplásmico que contrarresta la sal acumulada en las vacuolas (Tal y Watts, 1979).

Autores como Lawlor (1987) consideran que la acumulación de varios metabolitos (prolina, glicina, betaina, fitohormonas, etc.), junto con los cambios de asimilación de carbono provocados por el decremento de la síntesis de ATP, pueden ser usados para identificar y seleccionar plantas con respuestas interesantes para la adaptación a los medios adversos. Por otro lado, los estudios de Tal (1984) y Singh *et al.* (1973) demuestran que estos metabolitos no tienen relación con la tolerancia o adaptación a medios adversos.

Sin embargo, existen evidencias de que la disminución en la velocidad de asimilación del CO₂ está asociada con la incidencia de presiones ambientales extremas y con la disminución de la actividad de la enzima de

carboxilación Ribulosa 1-5 Biofosfato Carboxilasa/oxigenasa (Rajmane y Karadge, 1986). Ahora bien, todos estos productos bioquímicos están regulados por genes específicos así como por la combinación e interacción de ellos.

En general, la variabilidad en los mecanismos básicos de adaptación al ambiente, entre y dentro especies, se encuentra en proceso de estudio. Se espera que el análisis de las respuestas a nivel molecular y fisiológico de los materiales adaptados a los diversos ambientes, pueda despejar el entendimiento de la compleja arquitectura genética. Al respecto, autores como Ottaviano *et al.* (1991) proponen como estrategia el uso de marcadores genéticos moleculares que permitan la localización por cromosoma de factores genéticos mayores (i.e., loci de caracteres cuantitativos, QTL), los cuales controlan el carácter en estudio.

Estos marcadores genéticos moleculares propuestos son: el polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y el polimorfismo del ADN amplificado en forma aleatoria (RAPD).

Los RFLP's comprenden la clonación de secuencias únicas de ADN en el genoma nuclear. Estos clones son usados en pruebas para detectar secuencias homólogas en el ADN de plantas. Para ello es necesario cortar el ADN genómico con varias enzimas de restricción y separar los fragmentos en un gel de agarosa, para ser transferidos a una membrana de nylon, donde el ADN quedará fijado, para posteriormente realizar las diferentes pruebas de hibridación, con sondas marcadas por radioactividad (^{32}P) o por quimioluminiscencia, con lo que se permitirá la visualización del fragmento de ADN en estudio. Una de las características

de los RFLP's es que son codominantes y no son afectados por el ambiente.

Estos marcadores se están usando en estudios taxonómicos, así como para detectar diversidad genética y caracteres deseables (Shattuck-Eidens *et al.*, 1990; Fischer *et al.*, 1991; Melchinger *et al.*, 1991).

Los RAPD's se basan en el uso de pequeñas secuencias de oligonucleótidos como "iniciadores" de amplificación de segmentos del genoma en forma aleatoria. Para esta amplificación es necesario, por un lado, una mezcla de un iniciador, nucleótidos y Taq DNA polimerasa, más un sustrato con magnesio, y por el otro, un baño María que controle ciclos de temperatura de 94, 36 y 72°C, en tiempos de 1, 1 y 2 minutos, respectivamente (Williams *et al.*, 1990).

La Figura 1 ilustra el proceso de amplificación del ADN; en el esquema 1 se observa la doble cadena del ADN; en el 2 la cadena sencilla del ADN que se ha desdoblado por las altas temperaturas. En el 3 se observa el anillamiento del promotor o iniciador sobre la cadena sencilla provocado por una temperatura ideal (37°C) y, finalmente, en el esquema 4 se nota el proceso de amplificación mediante la intervención de la Taq polimerasa y los nucleótidos libres en el sustrato.

Estas técnicas se están comenzando a usar para estudiar respuestas fisiológicas a los ambientes extremos. Se tiene, por ejemplo, el uso de los RFLP's asociados a la estabilidad de la membrana celular, con la finalidad de detectar el segmento de cromosoma que contiene los genes que controlan la inducción a la termo-tolerancia (Ottaviano *et al.*, 1991). Este estudio se

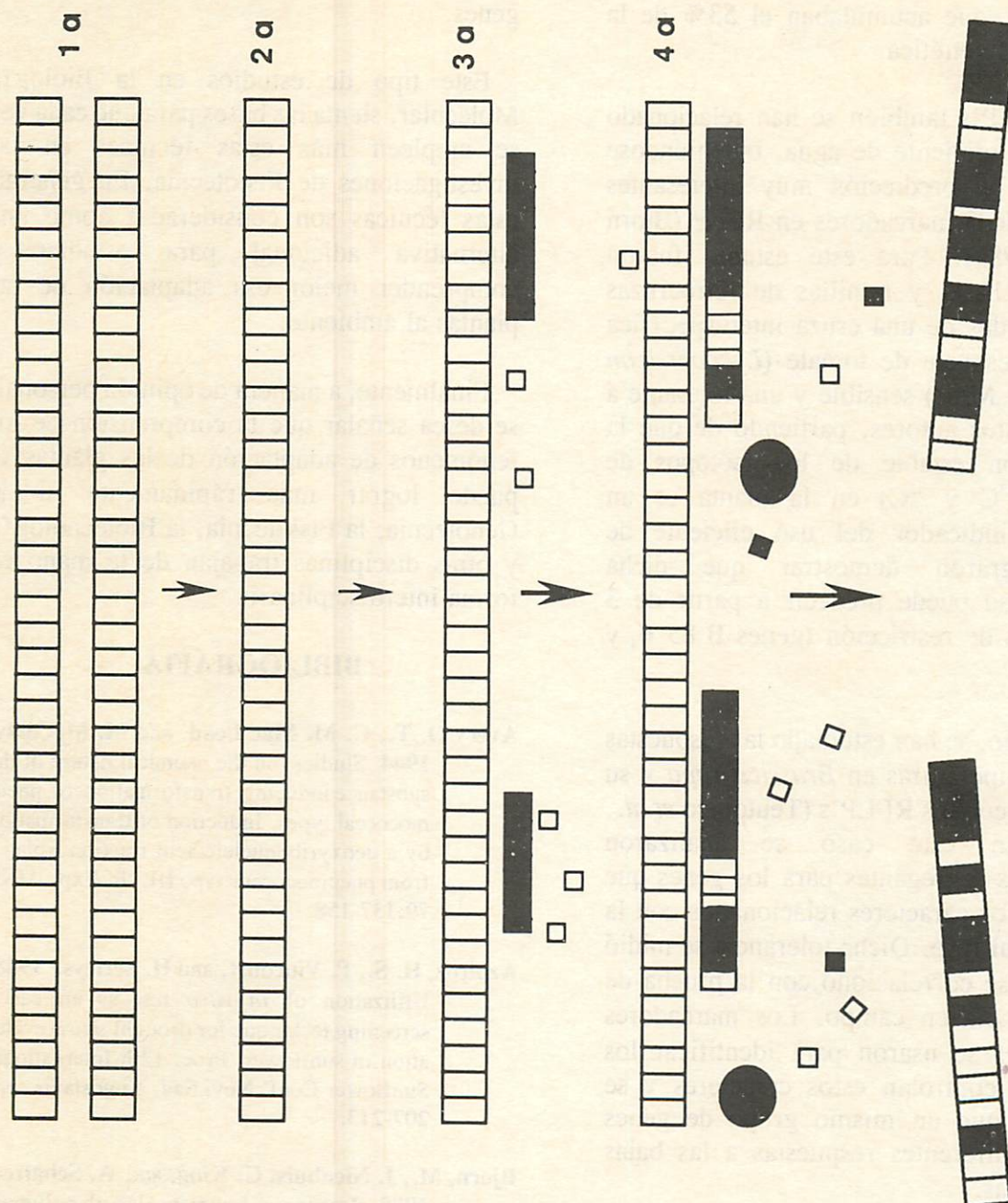


Figura 1. Representación gráfica del proceso utilizado por la técnica de RAPD

realizó en un grupo de líneas en recombinación, derivadas de una cruce entre dos líneas de maíz (T32 x CM37), y la caracterización se hizo en 200 loci de RFLP. El análisis de regresión de la estabilidad de la membrana con los RFLP's permitió detectar un mínimo de 6 QTL, que acumulaban el 53% de la variabilidad genética.

Los RFLP's también se han relacionado con el uso eficiente de agua, obteniéndose resultados de predicción muy interesantes con tan sólo 3 marcadores en RFLP (Bjorn *et al.*, 1989). Para este estudio fueron analizadas la F₃ y familias de retrocruzas RC₁ obtenidas de una cruce interespecífica entre una especie de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sensible y una tolerante a sequía. Estos autores, partiendo de que la composición estable de los isótopos de carbono (¹³C y ¹²C) en la planta es un excelente indicador del uso eficiente de agua, lograron demostrar que dicha eficiencia se puede predecir a partir de 3 fragmentos de restricción (genes B 85 F₄ y Q₉₀).

Asimismo, se han estudiado las respuestas a bajas temperaturas en *Brassica rapa* y su asociación con los RFLP's (Teutonico *et al.*, 1991). En este caso se analizaron poblaciones segregantes para los genes que controlan los caracteres relacionados con la tolerancia al frío. Dicha tolerancia se midió *in vitro* y se correlacionó con la prueba de sobrevivencia en campo. Los marcadores moleculares se usaron para identificar los genes que controlan estos caracteres y se determinó que un mismo grupo de genes controlan diferentes respuestas a las bajas temperaturas.

Estos son algunos de los trabajos publicados que tienen una estrecha relación con la Fisiotecnia. Sin embargo, en el Tercer

Congreso Internacional de Biología Molecular en Plantas, realizado en Octubre de 1991, se presentaron 132 trabajos sobre la respuesta al ambiente de diferentes especies. Los temas de dichos trabajos versaron sobre aislamiento, regulación y expresión de genes.

Este tipo de estudios en la Biología Molecular, sienta las bases para que cada vez se empleen más estas técnicas en las investigaciones de Fisiotecnia. En general, estas técnicas son consideradas como una alternativa adicional para estudiar y comprender mejor esa adaptación de las plantas al ambiente.

Finalmente, a manera de opinión personal, se desea señalar que la comprensión de los fenómenos de adaptación de las plantas se puede lograr más rápidamente si la Genotecnia, la Fisiotecnia, la Biotecnología y otras disciplinas trabajan de la mano en forma interdisciplinaria.

BIBLIOGRAFIA

- Avery O. T., C. M. MacLeod, and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79:137-158.
- Azpiroz, H. S., P. Vincourt, and H. Serieys. 1988. Utilization of *in vitro* test as an early screening technique for drought stress evaluation in sunflower. *Proc. 12th International Sunflower Conf. Novi Sad, Yugoslavia.* pp. 207-213.
- Bjorn, M., J. Nienhuis, G. King, and A. Schaffer. 1989. Restriction fragments length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. *Science* 243: 1725-1728.

- Carter, J. V. and M. L. Breener. 1985. Plant growth regulators and low temperature stress. In: Hormonal Regulation of Development III. Pharis, R. P. and D. M. Reid (eds.). Enc. Plant Physiol. New Series V. II. Springer-Verlag, New York. pp. 418-443.
- Fischer, M., H. S. Azpiroz, and D. Hoisington. 1991. Comparison of RFLP and RAPD technologies for analyzing genetic diversity in open pollinated maize varieties. Abstracts International Soc. of Plant Molecular Biology Congress. Tucson, Ar. p. 1663.
- Giovannozzi S. G., M. Bodiani, M. Luna, M. Felici, and F. Artemi. 1985. Biochemical indications of plants for better adaptability to drought conditions. Indicazioni Biochimiche per la migliore adattabilità delle piante alla siccità. Revista di Agricoltura Subtropica e tropica 79:175-181.
- Handa, S., A. K. Handa, P. M. Hasegawa, and R. A. Bressan. 1986. Proline accumulation in the adaptation of culture plant cells to water stress. Plant Physiol. 80: 938-946.
- Kamp M., D. E. Gloss P., G.B. Reddy, V.C. Baligar, and R. J. Wright. 1991. A comparison of cell culture media simulating aluminium toxic soils. Agron. Abstr. Annual Meetings. Amer. Soc. Agron. Denver, Col. p. 196.
- Lawlor, D. W. 1987. Stress metabolism: its implication in breeding programs. In: Drought Tolerance in Winter Cereals. J. P. Srivastava, E. Porceddu, E. Acevedo and S. Varma (eds.). pp. 227-240.
- López P., M. C., D. Ramírez L. y V. González H. 1990. Efecto de compuestos orgánicos e inorgánicos sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de inflorescencias femeninas de maíz. Resúmenes XIII Congreso Nacional de Fitogenética, Cd. Juárez, Chih. p. 31.
- Melchinger, A. E., M. M. Messmer, M. Lee, W. L. Woodman, and K. R. Lamkey. 1991. Diversity and relationships among U. S. maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. Crop Sci. 31: 669-678.
- Morgan L.V. 1922. Non Criss-Cross inheritance in *Drosophila melanogaster*. Biol. Bull. 42: 267-274.
- Muñoz O., A. 1986. Apuntes mimeografiados del Curso Genotecnia Vegetal para Resistencia a Sequía y Heladas (GEN 627). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Ottaviano, E., M. Sary Gorla, E. Pé, and C. Frova. 1991. Molecular markers (RFLPs and HSPs) for the genetic dissection of thermotolerance in maize. Theor. Appl. Genet. 81:713-719.
- Rajmane, N. A. and B. A. Karadge. 1986. Photosynthesis and photorespiration in Winged bean (*Sophocarpus tetragonolus* L) grown under saline conditions. Photosynthetica 20:139-145.
- Reid, D. M. and P. L. Wample. 1985. Water relations and plant hormones. In: Hormonal Regulation of Development. III. R. P. Pharis and D. M. Reid (eds.). Enc. Plant Physiol. New Series V. II. Springer-Verlag, New York. pp. 513-518.
- Salgado-Garciglia, R., F. López-Gutierrez, and N. Ochoa-Alejo. 1985. NaCl resistant variant cells isolated from sweet potato cell suspension. Plant Cell Tissue Organ Culture 5: 3-12.
- Shattluck-Eidens, D. M., R. N. Bell, S. L. Neuhausen, and T. Helentjaris. 1990. DNA sequence variation within maize and melon: observations from polymerase chain reaction amplification and direct sequencing. Genetics 126:207-217.
- Singh, T. N., L. G. Paleg, and D. Aspinall. 1973. Stress metabolism. III. Variations in response to water deficit in the barley plant. Aus. J. Biol. Sci. 26:65-76.
- Stone, J. M., J. P. Palta, J. B. Bamberg, and L. S. Neiss. 1991. Freezing tolerance and capacity to acclimate conferred by different genes in *Solanum* species. Agron. Abstr. Annual Meetings. Amer. Soc. Agron. Denver, Col. p. 200.

- Tall, M. 1984. Physiological genetics of salt resistance in higher plants: studies on the level of the whole plant isolated organs, tissues and cells. In: Salinity Tolerance in Plants. R. C. Staples, G. H. Toenhiesen (eds.). John Wiley and Sons. New York.
- _____, and J.W. Watts. 1979. Plant growth conditions and yield of viable protoplast isolated from leaves of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* Z. Pflanzenphysiol. 92: 207-214.
- Teutonico, R. A., P. Moreau, J. P. Palta, and T. C. Osborn. 1991. The study of low temperature responses in *Brassica rapa* using molecular markers. Agron. Abstr. Annual Meetings. Amer. Soc. Agron. Denver, Col. p. 201.
- Watson J.D. and F.H.C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171:737-738.
- Weeks, J. T., A. C. Guenzi, and D. R. Porter. 1991. Protein synthesis in wheat callus tissue exposed to low water potentials. Agron. Abstr. Annual Meetings. Amer. Soc. Agron. Denver, Col. p. 202.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Ratalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18:6531-6535.