BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LAS PLANTAS

José María Seguí Simarro

José María Seguí Simarro

BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LAS PLANTAS

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Primera edición, 2010

© de la presente edición:
Editorial Universitat Politècnica de València

© José María Seguí Simarro

© de las imágenes: sus autores

Imprime: Fustabloc S.L.

Impreso en España

Certificado PEFC

Este producto procede de bosques gestionados de forma sostenible y fuentes controladas

PEFC™
PEFC/14-33-00009

www.pefc.org

IBERPAPEL

ÍNDICE

PRÓLOGO 1

BLOQUE 1: BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LAS PLANTAS

TEMA 1. Ciclos biológicos y alternancia de generaciones 9
1.1. Tipos de plantas superiores 9
1.2. La alternancia de generaciones 10
1.3. Resumen 15
1.4. Información adicional. 15

TEMA 2. Reproducción en plantas 17
2.1. Reproducción sexual 17
2.1.1. Alogamia 19
2.1.2. Autogamia 20
2.2. Reproducción asexual. 20
2.2.1. Multiplicación vegetativa 22
2.2.2. Apomixis 23
2.3. Resumen 25
2.4. Información adicional 25

TEMA 3. La flor 27
3.1. Diversidad floral 27
3.2. Posición de la flor en la planta 27
3.3. Anatomía floral 30
3.3.1. Anatomía del perianto 32
3.3.2. Anatomía de androceo y gineceo 33
3.4. Sexualidad y tipos florales 34
3.5. Control genético de la sexualidad 39
3.6. Control hormonal de la sexualidad 41
3.7. Inflorescencias 41
3.8. Tipos de inflorescencias 43
3.8.1. Inflorescencias simples 46
3.8.2. Inflorescencias compuestas 49
3.9. Resumen 52
3.10. Información adicional 53

TEMA 4. Inducción de la floración 55
4.1. Etapas del ciclo vital de las plantas 55
4.2. La transición hacia floración 56
4.3. Factores inductores de la floración 59
4.3.1. Estacionalidad 61

4.3.2. Temperatura 62
4.3.3. Luz 62
4.3.4. La base química del fotoperiodo 64
4.3.5. Disponibilidad de nutrientes 66
4.3.6. Vernalización 67
4.3.7. Reguladores de crecimiento 68
4.4. Resumen 69
4.5. Información adicional 70

TEMA 5. Control genético del desarrollo floral 73
5.1. Control genético del tiempo de floración 73
5.1.1. Ruta de promoción por fotoperiodo 74
5.1.2. Ruta autónoma 76
5.1.3. Ruta de vernalización 76
5.1.4. Ruta de las giberelinas 77
5.2. Genes de identidad del meristemo vegetativo 78
5.3. Genes de identidad del meristemo floral 79
5.3.1. Estudios con mutantes para los genes LFY y AP1 79
5.3.2. Estudios de expresión constitutiva de los genes LFY y AP1 79
5.3.3. Integración de las rutas de tiempo de floración con la respuesta floral de los genes LFY y AP1 80
5.4. Genes de identidad de órgano floral 80
5.4.1. Genes homeóticos y MADS-box 81
5.4.2. El modelo ABC de identidad de órgano floral 82
5.4.3. Mutantes florales afectados en los genes ABC 85
5.4.4. Revisiones del modelo ABC: genes D y E 86
5.5. Genes catastrales 87
5.6. Modelo de la inducción floral en Arabidopsis 88
5.7. Senescencia y abscisión 89
5.7.1. Senescencia 89
5.7.2. Control de la senescencia 91
5.7.3. Abscisión 91
5.7.4. Control de la abscisión 92
5.8. Resumen 92
5.9. Información adicional 93

TEMA 6. Células germinales, esporas y gametos 95
6.1. Células somáticas y germinales 95
6.2. Células madre de microspora y megaspora 96
6.3. Mitosis 97
6.4. Meiosis 100
6.5. Esporas y gametos 105
6.6. Resumen 107
6.7. Información adicional 107

TEMA 7. Androceo y formación del gameto masculino 109
7.1. Estambres 109
7.1.1. Evolución de los estambres 111
7.1.2. Histología de la antera 112
7.1.3. El tapetum 114
7.2. Microsporogénesis 115
7.3. Microgametogénesis 117
7.4. Expresión génica durante la microsporogénesis y la microgametogénesis 120
7.5. Dehiscencia de la antera 122
7.6. Palinología 124
7.6.1. Estructura y composición de la cubierta del grano de polen 125
7.6.2. Unidades polínicas 128
7.7. Resumen 128
7.8. Información adicional. 129

TEMA 8. Gineceo y formación del gameto femenino 131
8.1. El gineceo 131
8.1.1. Anatomía del pistilo 132
8.1.2. Evolución del gineceo 134
8.2. El estigma 135
8.3. El estilo 136
8.4. El ovario 137
8.5. El óvulo 142
8.6. Megasporogénesis y megagametogénesis 144
8.7. El saco embrionario 146
8.8. Megasporogénesis y megagametogénesis en gimnospermas 147
8.9. Resumen 147
8.10. Información adicional 148

TEMA 9. Tipos de polinización 149
9.1. Autogamia 150
9.1.1. Cleistogamia y casmogamia 151
9.2. Alogamia 152
9.2.1. Dicogamia 153
9.2.2. Hercogamia 153
9.2.2.1. Hercogamia de aproximación 154
9.2.2.2. Hercogamia revertida 154
9.2.2.3. Heterostilia 155
9.2.2.4. Hercogamia interfloral o monoecia 157
9.2.2.5. Dioecia 157
9.2.2.6. Enantiostilia 157
9.2.2.7. Dimorfismo estigmático altitudinal 158
9.2.3. Presentación secundaria del polen 159
9.2.4. Diclinia 160

9.2.5. Autoincompatibilidad 160
9.2.1.1. Genética de la autoincompatibilidad. 161
9.2.1.2. Autoincompatibilidad gametofítica 161
9.2.1.3. Autoincompatibilidad esporofítica 162
9.2.1.4. Pseudocompatibilidad e incompatibilidad parcial 164
9.3. Resumen 164
9.4. Información adicional 164

TEMA 10. Vectores de polinización 167
10.1. Vectores abióticos 168
10.1.1. Anemofilia 168
10.1.2. Hidrofilia 169
10.2. Vectores bióticos: zoofilia 171
10.2.1. Señales y recompensas 171
10.2.2. Requisitos de un vector biótico de polinización 173
10.2.3. Entomofilia 173
10.2.3.1. Coleópteros: cantarofilia 173
10.2.3.2. Dípteros: miofilia 174
10.2.3.3. Himenópteros: melitofilia 177
10.2.3.4. Lepidópteros: psicofilia, esfingofilia y falenofilia 181
10.2.4. Aves: ornitofilia 185
10.2.5. Quirópteros: quiropterofilia 186
10.2.6. Otros animales 187
10.3. Importancia ecológica de la polinización 188
10.4. Resumen 190
10.5. Información adicional 191

TEMA 11. Fecundación y embriogénesis 193
11.1. Germinación 193
11.2. Emisión del tubo polínico 194
11.3. La doble fecundación 196
11.4. Embriogénesis en dicotiledóneas 198
11.4.1. Control genético y hormonal 202
11.5. Formación del endospermo 203
11.5.1. Endospermo nuclear 203
11.5.2. Endospermo celular 204
11.5.3. Endospermo helobial 204
11.6. Embriogénesis en monocotiledóneas 204
11.7. Embriogénesis en gimnospermas 207
11.7.1. Proembriogénesis 207
11.7.2. Embriogénesis temprana 208
11.7.3. Embriogénesis tardía 208
11.8. Resumen 209
11.9. Información adicional 210

TEMA 12. La semilla 213
12.1. Morfología externa de la semilla 214
12.2. Estructura de la semilla de angiospermas 216
12.2.1. El embrión 216
12.2.2. La cubierta seminal 218
12.2.3. Tejidos de reserva 220
12.2.4. Composición de las reservas 221
12.3. Estructura de la semilla de gimnospermas 223
12.4. Maduración, reposo y latencia 224
12.4.1. Causas de la latencia 225
12.4.2. Longevidad 226
12.5. Dispersión de las semillas 227
12.5.1. Dispersión por viento 228
12.5.2. Dispersión por agua 230
12.5.3. Dispersión por animales 230
12.5.4. Otros mecanismos de dispersión 232
12.6. Germinación 232
12.7. Control hormonal del desarrollo del embrión y la semilla 234
12.8. Resumen 236
12.9. Información adicional 237

TEMA 13. El fruto 239
13.1. Morfología externa del fruto 240
13.2. Anatomía del fruto 242
13.3. Tipos de fruto 243
13.3.1. Frutos simples 244
13.3.1.1. Frutos carnosos 244
13.3.1.1.1. Baya 245
13.3.1.1.2. Drupa 247
13.3.1.1.3. Pomo 248
13.3.1.2. Frutos secos dehiscentes 248
13.3.1.2.1. Legumbre 248
13.3.1.2.2. Silicua 250
13.3.1.2.3. Cápsula 250
13.3.1.2.4. Folículo 251
13.3.1.3. Frutos secos indehiscentes 251
13.3.1.3.1. Aquenio 251
13.3.1.3.2. Antocarpo 252
13.3.1.3.3. Cariópside o grano 253
13.3.1.3.4. Esquizocarpo o fruto fragmentable. 254
13.3.1.3.5. Sámara 254
13.3.1.3.6. Utrículo 255
13.3.1.3.7. Nuez 256
13.3.2. Frutos agregados o colectivos 258
13.3.3. Frutos múltiples 259
13.4. Desarrollo del fruto 260

13.5. Partenocarpia 262
13.6. Maduración del fruto y climaterio 263
13.6.1. Etileno y maduración 264
13.7. Senescencia y abscisión del fruto 265
13.8. Dispersión de los frutos 266
13.9. Resumen 267
13.10. Información adicional 268

BLOQUE 2: BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

TEMA 14. Los fundamentos de la biotecnología vegetal 271
14.1. El cultivo in vitro de tejidos 272
14.2. La regeneración de plantas a partir de células individuales 276
14.3. La enfermedad de la agalla en corona 277
14.4. Otros métodos de transformación genética 279
14.5. Panorama actual de la transformación genética de explantes y regeneración de plantas transgénicas 281
14.6. Resumen 283
14.7. Información adicional 283

TEMA 15. Biotecnología de la reproducción asexual. El cultivo in vitro 287
15.1. Técnicas de reproducción asexual en plantas 288
15.2. Concepto de cultivo in vitro 289
15.3. Panorámica general del cultivo in vitro 290
15.4. Aplicaciones del cultivo in vitro de células y tejidos vegetales 291
15.4.1. Estudios básicos 292
15.4.2. Plantas libres de patógenos 293
15.4.3. Conservación de germoplasma 294
15.4.4. Propagación clonal 295
15.4.4.1. Cultivo de yemas axilares 295
15.4.4.2. Inducción de organogénesis 297
15.4.4.3. Embriogénesis somática 297
15.4.5. Obtención de metabolitos de interés 298
15.4.6. Fitorremediación 300
15.4.7. Mejora vegetal 300
15.5. Presente y futuro del cultivo in vitro 302
15.6. Resumen 302
15.7. Información adicional 303

TEMA 16: Biotecnología del desarrollo floral 305
16.1. Aplicaciones biotecnológicas del control de la inducción a floración 305
16.2. Aplicaciones biotecnológicas del desarrollo floral 307
16.2.1. Desarrollo de los pétalos 307

16.2.2. Forma de flores y plantas ornamentales 310
16.2.3. Senescencia floral 310
16.3. Otras aplicaciones biotecnológicas de interés ornamental 311
16.4. Resumen..... 311
16.5. Información adicional 312

TEMA 17. Biotecnología del polen (I) 315
17.1. Androesterilidad 315
17.1.1. Androesterilidad génica 317
17.1.2. Androesterilidad ambiental 319
17.1.3. Androesterilidad funcional 320
17.1.4. Androesterilidad citoplásmica 321
17.1.5. Androesterilidad génico-citoplásmica 321
17.2. Transporte de polen y flujo génico..... 324
17.3. Aplicaciones de la palinología 325
17.3.1. Paleontología 326
17.3.2. Exploraciones petrolíferas..... 326
17.3.3. Melisopalinología..... 327
17.3.4. Criminología y medicina forense 328
17.3.5. Alergias y aeropalinología 329
17.4. Biotecnología de los determinantes alergénicos del polen 329
17.5. El polen como producto comercial..... 331
17.5.1. El polen como suplemento dietético 332
17.5.2. Propiedades terapéuticas del polen 332
17.5.3. La industria de los suplementos de polen..... 333
17.6. Resumen..... 334
17.7. Información adicional 335

TEMA 18. Biotecnología del polen (II): Conservación y calidad..... 337
18.1. Conservación del polen 337
18.1.1. Almacenamiento a baja temperatura y humedad 338
18.1.2. Conservación por congelación y secado 339
18.1.3. Criopreservación 340
18.1.4. Almacenamiento en disolventes orgánicos 340
18.2. Pruebas de viabilidad del polen 341
18.2.1. Producción de frutos y semillas..... 342
18.2.2. Germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en el pistilo 342
18.2.3. Tinciones no vitales 343
18.2.4. Otras pruebas de uso limitado 344
18.2.5. Tinción de tetrazolio 344
18.2.6. Germinación in vitro 346
18.2.7. Diacetato de fluoresceína 346
18.3. Pruebas de vigor del polen 348
18.3.1. Germinación in vitro 348
18.3.2. Técnica semi-in vivo 349

18.3.3. Germinación del polen in vivo y crecimiento del tubo polínico 349
18.4. Resumen 350
18.5. Información adicional 350

TEMA 19. Haploides y doble haploides (I). Androgénesis 353
19.1. Haploides y doble haploides 353
19.2. Utilidad de los doble haploides 356
19.3. Obtención de haploides y doble haploides 357
19.4. Las distintas rutas androgénicas 358
19.5. El concepto original de androgénesis 359
19.6. Embriogénesis de microsporas 360
19.6.1. Técnicas de cultivo in vitro para la inducción de embriogénesis de microsporas 361
19.6.2. Factores que influyen en la inducción de embriogénesis 363
19.6.2.1. Condiciones de la planta donante 363
19.6.2.2. Condiciones de aislamiento e inducción de la microspora . 364
19.6.2.3. Condiciones de cultivo 365
19.6.3. Cambios en la microspora embriogénica 366
19.6.4. Cambios en la expresión génica 366
19.6.4.1. Respuesta celular al estrés 368
19.6.4.2. Supresión del programa gametofítico 368
19.6.4.3. Expresión del programa embriogénico 368
19.6.5. Panorama actual de la embriogénesis de microsporas 370
19.7. Callogénesis derivada de meiocitos 371
19.8. La duplicación del genoma haploide 373
19.9. Técnicas de análisis de los callos y regenerantes androgénicos 376
19.9.1. Técnicas de análisis de la ploidía 376
19.9.2. Análisis mediante marcadores moleculares 379
19.10. Resumen 380
19.11. Información adicional 381

TEMA 20. Haploides y doble haploides (II). Alternativas a la androgénesis 385
20.1. Ginogénesis 385
20.2. Ginogénesis inducida por polinización 388
20.2.1. Estrategias de polinización in vitro para ginogénesis 389
20.2.1.1. Polinización estigmática in vitro 389
20.2.1.2. Polinización placentaria in vitro 389
20.2.2. Estrategias de inactivación del polen para ginogénesis 390
20.2.2.1. Polen irradiado 390
20.2.2.2. Polen de triploides 391
20.3. Hibridación interespecífica 392
20.3.1. El método bulbosum 392
20.3.2. El uso de polen de maíz como polinizador lejano 393
20.4. Resumen 394
20.5. Información adicional. 395

TEMA 21. Superación de barreras reproductivas 397
21.1. Concepto de especie y especiación 398
21.1.1. Especiación gradual o cladogénesis 398
21.1.2. Especiación instantánea 399
21.1.3. Hibridación 401
21.2. Barreras a la hibridación interespecífica 402
21.2.1. Barreras prezigóticas 402
21.2.1.1. Aislamiento ecológico o de hábitat 402
21.2.1.2. Aislamiento temporal 402
21.2.1.3. Aislamiento por especificidad de polinizadores 403
21.2.1.4. Aislamiento gamético 403
21.2.2. Barreras postzigóticas 403
21.3. Barreras a la hibridación intraespecífica 404
21.4. Superación de barreras reproductivas 405
21.4.1. Superación de barreras físicas y temporales 405
21.4.2. Superación de otras barreras prezigóticas 406
21.4.2.1. Aplicación de reguladores de crecimiento y otros agentes químicos 406
21.4.2.2. Uso de polen mentor 407
21.4.2.3. Polinización de la yema 408
21.4.2.4. Polinización de estilos incompletos 408
21.4.2.5. Injerto estilar 409
21.4.2.6. Cruces puente 410
21.4.2.7. Polinización estigmática in vitro 411
21.4.2.8. Polinización intraovárica 411
21.4.2.9. Polinización ovular in vitro 411
21.4.2.10. Polinización placentaria in vitro 413
21.4.2.11. Fecundación in vitro 413
21.4.3. Superación de barreras postzigóticas 415
21.4.3.1. Rescate de embriones 415
21.4.3.2. Cultivo in vitro de óvulos fecundados 417
21.4.4. Obtención y fusión de protoplastos 418
21.5. Resumen 419
21.6. Información adicional 420

TEMA 22. Biotecnología de la semilla y el fruto 423
22.1. Obtención de frutos y semillas con cualidades organolépticas o nutracéuticas mejoradas 423
22.1.1. Los tomates Flavr Savr 425
22.1.2. Otras líneas de investigación en tomate 425
22.1.3. El arroz dorado 427
22.1.4. Otros ejemplos 428
22.1.5. Panorama de la modificación genética de semillas y frutos 430
22.2. Obtención de frutos sin semillas 430
22.2.1. Partenocarpia 431
22.2.2. Estenospermocarpia 431

22.2.3. Obtención de individuos triploides 432
22.3. Obtención de harinas 433
22.4. Obtención de aceites y biocombustibles 434
22.5. Obtención de bioplásticos 436
22.6. Obtención de materiales textiles 436
22.7. Resumen 437
22.8. Información adicional 438

INDICE DE TÉRMINOS 441

PRÓLOGO

Este libro nace motivado por la necesidad de encontrar una referencia bibliográfica que englobe todos los contenidos que conforman el temario de la asignatura Biología Reproductiva de las Plantas, del Máster de Mejora Genética Vegetal que se imparte en el COMAV, Universidad Politécnica de Valencia. Sin embargo, conforme se iban completando los temas se consideró interesante incluir determinados conceptos que si bien no tienen una gran relevancia en el contexto de la mejora genética vegetal, sí son relevantes desde el punto de vista de la reproducción. Por tanto, si bien no se pretende que este libro sea el compendio más exhaustivo sobre los distintos aspectos de la reproducción vegetal y su utilización biotecnológica (de hecho no lo es), sí es intención del autor dar una imagen global de las distintas vertientes de la reproducción, desde sus aspectos más genéticos y moleculares, hasta sus implicaciones ecológicas y evolutivas, y de cómo se pueden aprovechar en beneficio de la sociedad. De este modo, se pretende que el lector disponga de una panorámica de los distintos procesos que de forma secuencial se encadenan para hacer posible que una planta tenga descendencia y de cómo pueden usarse estos procesos, en su totalidad o en parte, para obtener productos, servicios o tecnologías de interés para la sociedad. Por esta razón este libro se ha estructurado dos grandes bloques diferenciados. La primera parte del libro se centrará exclusivamente en los aspectos biológicos de la reproducción de las plantas. En la segunda parte, en los aspectos biotecnológicos.

En la primera parte se irán exponiendo los distintos procesos implicados en la reproducción conforme van sucediéndose durante el desarrollo natural de la flor y el fruto. Dedicaremos el tema 1 a una exposición, a modo de introducción, de los ciclos biológicos y la alternancia de generaciones que caracterizan la biología vegetal. No se puede entender la complejidad del desarrollo reproductivo vegetal si no se entiende antes el peso que en ciclo vital de las plantas tiene la fase gametofítica.

En el tema 2 se tratará otro aspecto claramente diferente de la reproducción vegetal frente a la animal. Se trata de la reproducción asexual, que en las plantas tiene relevancia como mecanismo alternativo a la sexual en determinadas circunstancias, y que sobre todo permite un enorme abanico de aplicaciones biotecnológicas basadas precisamente en esta capacidad de las plantas para multiplicarse sin necesidad de sexualidad.

A partir del tema 3 y hasta el final de la primera parte del libro los temas se centrarán en la reproducción sexual. El tema 3 describe la flor como elemento central de este tipo de reproducción. Es en ella donde se desarrollan los gametos y tienen lugar todos los procesos sexuales. Es también la flor la que acaba transformándose en fruto. Este tema también tratará las inflorescencias en que se agrupan las flores de ciertas especies.

Los temas 4 y 5 se refieren a aspectos sobre todo genéticos de la inducción de la floración y el desarrollo floral. En el tema 4 se verán los distintos factores

endógenos y exógenos que influyen en que una planta, o mejor dicho un meristemo tome la decisión de abandonar su desarrollo vegetativo y pase a transformarse en una flor o inflorescencia. El tema 5 ofrece una panorámica del control genético que regula el desarrollo de la flor, entendiendo como tal las rutas génicas que controlan la transformación de distintas señales endógenas y exógenas en la activación de los grupos de genes que permiten el desarrollo de los órganos florales.

Los temas 6, 7 y 8 se refieren a la formación de los gametos. El tema 6 define el concepto de gametos, de células somáticas y germinales, y de los procesos que median las divisiones celulares somáticas y el paso de una célula somática a gamética. Nos referimos a la mitosis y a la meiosis, respectivamente. El tema 7 versará sobre el desarrollo de los gametos masculinos, los gametófitos en los que son transportados (el polen), y sus precursores (las microsporas). Todo ello dentro del contexto del órgano floral en el que son generados (la antera). El tema 8 versará sobre el desarrollo de los gametos femeninos, los gametófitos en los que son albergados (el saco embrionario), y sus precursores (las megasporas). Todo ello dentro del contexto del órgano floral en el que son generados (el pistilo).

Los temas 9 y 10 se dedicarán al fenómeno de la polinización. El transporte del polen desde la antera al estigma receptor tiene una serie de implicaciones desde genéticas hasta ecológicas, que veremos en el tema 9, junto con los mecanismos que desarrollan las plantas para favorecer la polinización entre individuos diferentes (alogamia) como base para generación de variabilidad genética y por tanto el éxito evolutivo de la especie. El tema 10 expondrá los diferentes métodos que adoptan las plantas para conseguir el transporte efectivo del polen de una a otra flor. Se describirán métodos que implican transporte por parte de vectores abióticos (agentes físicos) y bióticos (animales de distinto tipo).

En los últimos tres temas se tratarán los temas dedicados a la fecundación, formación y desarrollo del embrión (tema 11), a la semilla donde crece y se desarrolla el embrión (tema 12), y al fruto donde crece, se desarrolla y se dispersa la semilla y por tanto el embrión (tema 13). Al acabar estos 13 temas habremos completado el ciclo reproductivo de un vegetal, que comienza cuando un meristemoi vegetativo se transforma en floral, y termina cuando el embrión contenido en la semilla proveniente de dicha flor, germina y da lugar a una nueva planta en fase de crecimiento vegetativo.

En la segunda parte del libro vamos a tratar diferentes aspectos de la biotecnología vegetal relacionados con la reproducción de las plantas. Esta parte no pretende ser un compendio exhaustivo ni detallado de todo lo que se puede hacer con una flor, una semilla o un fruto para obtener productos de utilidad para la sociedad. Esto sería una tarea ingente que daría lugar a varias obras, y de un nivel muy superior al que se pretende para un libro de texto como este. Además, desde el momento de su publicación quedaría automáticamente desfasado, pues es bien conocido que los avances biotecnológicos se están produciendo a una velocidad vertiginosa. Al ritmo que avanzan las mejoras tecnológicas,

muy probablemente este libro omitirá algún aspecto biotecnológico concreto tan pronto como llegue a las manos del lector. Esta parte pretende únicamente ser un compendio que ilustre las principales facetas de la reproducción vegetal útiles para solucionar problemas dentro de diversos ámbitos científicos, industriales o agrícolas, y de las principales técnicas que gracias a estas características se han desarrollado. Como en cualquier otra disciplina científica, es evidente que para un conocimiento profundo, detallado o completamente actualizado es necesario acudir a publicaciones científicas periódicas (revistas o portales web).

A la hora de plantear una clasificación de las aplicaciones biotecnológicas del desarrollo reproductivo vegetal, hay que tener en cuenta dos posibles alternativas. Podemos por una parte agrupar las aplicaciones en base a qué propiedad, proceso o estructura reproductiva se aprovecha para sacar partido de ella. En este contexto podríamos hablar por ejemplo de biotecnología floral, o de biotecnología de la fructificación, de aplicaciones biotecnológicas del desarrollo gametofítico, etc... Por otra parte, podríamos basarnos en la utilidad o el ámbito de aplicación de las diferentes herramientas biotecnológicas. En este caso hablaríamos por ejemplo de aplicaciones biotecnológicas a la mejora genética, o de técnicas biotecnológicas de multiplicación vegetativa, o de obtención de líneas puras mediante doble haploides androgénicos. Es decir, podemos distinguir entre qué utilizamos y para qué lo utilizamos. Cualquiera de las dos vías es válida para mostrar una panorámica de las posibilidades biotecnológicas que nos ofrece la biología reproductiva vegetal. En cualquiera de los dos casos, al descender al detalle se llegaría a la misma aplicación técnica concreta. En este libro vamos a utilizar la primera de ellas, con el objetivo de tratar de establecer una relación con el orden que hemos seguido en la primera parte del libro para exponer los procesos reproductivos.

Sin embargo, en el primero de los temas de este bloque dedicado a la manipulación biotecnológica de los procesos reproductivos, haremos una pequeña excepción. Muchas de las aplicaciones biotecnológicas de la reproducción se basan, al igual que la gran mayoría de las aplicaciones biotecnológicas de las plantas, en dos grandes pilares: la transgénesis y el cultivo in vitro. Dicho de otro modo, se basan en la capacidad de las plantas para ser transformadas mediante la tecnología del ADN recombinante, y en la totipotencia de las células vegetales, que permite regenerar in vitro plantas completas a partir de tan solo un fragmento original o incluso de una única célula. Por ello, dedicaremos el tema 14 a dar una visión general de las técnicas de transformación genética de células vegetales y el cultivo in vitro, y cómo se han conseguido utilizar para manipular la biología vegetal hasta unos niveles jamás antes imaginados.

A continuación, y ya centrándonos en la biotecnología de la reproducción, haremos una distinción entre aplicaciones de la reproducción asexual y de la sexual. No hay que olvidar que las plantas poseen la capacidad de reproducirse asexualmente (ver tema 2). Y no solo eso, sino que es precisamente esta capacidad la base de una serie de técnicas agrícolas que han servido para propagar

asexualmente plantas a lo largo de la historia de la agricultura. Las veremos al comienzo del tema 15. Pero además, la capacidad de reproducción asexual es también la base de una de las herramientas biotecnológicas más poderosas, el cultivo in vitro. En el tema 15 también veremos con más detalle este conjunto de metodologías basadas en el cultivo in vitro, de claro interés aplicado a distintos ámbitos biotecnológicos. Sin embargo, solo trataremos del cultivo in vitro de explantes somáticos, no relacionados con la reproducción. La razón es que las aplicaciones biotecnológicas de las distintas células, tejidos y órganos reproductivos los veremos en temas dedicados expresamente a cada uno de ellos.

Dentro de la reproducción sexual, existen distintas estructuras y procesos susceptibles de ser utilizados con fines biotecnológicos. En el tema 16 veremos algunos aspectos biotecnológicos del desarrollo floral, pero centrándonos fundamentalmente en los pétalos y la senescencia, los más interesantes dentro de la biotecnología floral y ornamental.

Los órganos fértiles (androceo y gineceo), y principalmente el desarrollo de los gametos y los gametófitos allí formados tienen muchas más posibilidades biotecnológicas, sobre todo en el contexto de la mejora vegetal, pero no solo en ese ámbito. Concretando aún más, el desarrollo del gametófito masculino es la base de muchas de las principales aplicaciones de la biotecnología reproductiva. Veremos algunas de ellas en el tema 17, dedicado a diversos aspectos del aprovechamiento biotecnológico del gametófito masculino (el grano de polen). Sin duda, el desarrollo de este gametófito es el proceso de la reproducción que más posibilidades biotecnológicas tiene. Siguiendo con la biotecnología del polen, en el tema 18 veremos las posibilidades que ofrece el polen para su conservación en lugares especializados, los bancos de polen. Esto tiene importantes ventajas en el campo de la conservación de recursos fitogenéticos y la mejora genética, para la superación de barreras espaciales y temporales a la hibridación. Estrechamente ligada a la conservación del polen está la evaluación experimental de su calidad, entendiendo como tal su viabilidad y su vigor germinativo. Veremos también estos aspectos en el tema 18. Además de los que veremos en el tema 17, hay un proceso que por sus gran potencial merece mención aparte. Nos referimos al desvío de las microsporas y granos de polen de su desarrollo gametofítico, y su reprogramación hacia la *androgénesis*. Por su relevancia, dedicaremos a estas rutas experimentales el tema 19.

El tema 20 englobará otra serie de aplicaciones del desarrollo gametofítico para la obtención de plantas haploides y doble haploides, pero en este caso centrándonos principalmente en el gametófito femenino. Se verán en este tema aspectos como la obtención de doble haploides por vías ginogénicas y mediante hibridaciones interespecíficas, o mediante el uso de polen mentor. Se tratará también la obtención de individuos triploides y sus ventajas.

En el tema 21 se tratará la hibridación, la piedra angular de la mejora genética. Fundamentalmente se desarrollaran todas aquellas técnicas no vistas hasta ahora y que tengan una clara aplicación para la superación de barreras

reproductivas. A la hora de generar nuevos genotipos, la hibridación interespecífica o intergenérica tiene un gran potencial. En otros casos, lo que interesa es conseguir semillas de autofecundación, pero esto no es posible debido a la autoincompatibilidad. En ambos casos, la naturaleza de la reproducción sexual impone una serie de barreras a la hibridación que sería deseable evitar, y mediante técnicas biotecnológicas es posible. De hecho hay un amplio abanico de ellas disponibles para ello. Algunas se habrán visto ya en temas anteriores, aunque aplicadas a otros aspectos de la biotecnología, y otras se verán en el tema 21.

En el caso de las aplicaciones tratadas en los temas 18, 19, 20 y 21 es conveniente remarcar la dificultad que a veces existe a la hora de clasificar algunas de estas aplicaciones. Así, desde el punto de vista técnico muchas de estas aplicaciones se basan en técnicas de cultivo in vitro muy similares a las que se verán en el tema 15. Es por ello que podrían perfectamente haber sido englobadas dentro de este tema, que de este modo ocuparía una gran parte del libro. Pero por otro lado, se utiliza como material de partida para el cultivo in vitro gametófitos masculinos o femeninos, o sus precursores, o estructuras del gineceo, o del androceo, o embriones. Y esta es la razón por la cual se ha optado por su inclusión dentro del dedicado a la biotecnología de las correspondientes estructuras implicadas en la reproducción sexual, tratando de seguir la pauta expresada al principio de este tema.

Finalmente, la biotecnología del fruto y la semilla será tratada en el tema 22. En este tema se verá principalmente cómo se ha utilizado la tecnología de transformación genética para la obtención de plantas con frutos o semillas con cualidades mejoradas, o directamente nuevas. Hay otras aplicaciones biotecnológicas de la semilla y el fruto que no implican manipulación genética, pero son minoritarias en comparación con las primeras. No obstante, también las veremos.

Después de estos 22 temas, se espera que el lector tenga una visión global que le permita conocer y entender las distintas formas y mecanismos que utilizan las plantas para reproducirse, y cómo el ser humano puede aprovecharse de estas para generar productos y procesos de interés para la sociedad mediante técnicas biotecnológicas.

Bloque 1

BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

TEMA 1. Ciclos biológicos y alternancia de generaciones

1.1. Tipos de plantas superiores

Las plantas superiores (*Spermatophyta*, plantas vasculares con semilla) se dividen en **gimnospermas** y **angiospermas**. Las gimnospermas son aquellas que presentan semillas desnudas. De hecho, la palabra gimnosperma quiere decir "semilla desnuda, a la vista", pues proviene de la combinación de los términos griegos "γυμνός" (*gymnos*, que significa desnudez), y "σπέρμα", (*sperma*, semilla). Así, las semillas de estas plantas no se forman en un ovario cerrado (esto es, un pistilo con uno o más carpelos fusionados que evolucionan a un fruto, como ocurre en las angiospermas), sino que están desnudas en las escamas de los conos. El ejemplo más típico de este grupo de plantas son las coníferas (pinos, etc...), aunque hay también otros ejemplos conocidos como el ginkgo (*Ginkgo biloba*), o las cicadas, de entre las que destaca por su valor ornamental la cica (*Cycas revoluta*, Figura 1.1), una especie de "palmera" pequeña muy común en los jardines y terrazas mediterráneos. Pese a su notable parecido externo, no hay que confundir las cicas (gimnospermas) con las verdaderas palmeras (arecáceas), pues son genéticamente bastante distantes, hasta el punto de que estas últimas ni tan siquiera pertenecen a las gimnospermas, sino que son angiospermas, el grupo que veremos a continuación.

Angiosperma, por el contrario, quiere decir "semilla cubierta, envasada", y proviene de la combinación de las palabras griegas "αγγειον" (*angíon*, vaso, ánfora, recipiente) y "σπέρμα" (*sperma*, semilla). Así, este término hace referencia a que sus óvulos (y las semillas que de ellos se deriven) están encerrados por la hoja fértil (carpelo) portadora de los óvulos. De esta forma, para que el grano de polen fecunde al óvulo, primero debe ser depositado sobre una

Figura 1.1: Cica (*Cycas revoluta*), gimnosperma.
Imagen de Seguí Simarro.

Figura 1.2: Flores de membrillo (*Cydonia oblonga*), angiosperma.
Imagen de Seguí Simarro.

superficie del carpelo especialmente preparada para ello (el estigma), en lugar de contactar directamente sobre el óvulo, que es lo que sucede en gimnospermas. Ejemplos de este grupo son la gran mayoría de vegetales que utiliza el ser humano como alimento (cereales, solanáceas, cucurbitáceas, leguminosas, etc.), muchas leñosas fuente de materias primas y productos naturales, y en general todas aquellas plantas que presentan flores estructuradas en verticilos (verticiladas). Este grupo comprende un gran número de especies, la gran mayoría de las que tienen interés agronómico, como las hortalizas, cereales, ornamentales, leguminosas o frutales (Figura 1.2).

Las angiospermas se caracterizan por poseer una enorme diversidad de hábitos, y por ocupar prácticamente todos los nichos ecológicos posibles. Por ejemplo, podemos encontrar especies angiospermas marinas, costeras, acuáticas, terrestres, tropicales, de alta montaña, pantanosas o desérticas.

Además de sus diferencias en el recubrimiento de la semilla, tan fundamentales como para dar nombre a estos dos grupos, existen otra serie de diferencias también importantes entre ellas que nos permiten distinguirlas visualmente. Por ejemplo, las gimnospermas suelen tener frutos sin cubierta carnosa y hojas en forma de aguja o espina (como las de los pinos), mientras que la angiospermas suelen producir frutos con una cubierta carnosa rodeando la semilla y hojas planas, con venaciones, y a veces coloreadas.

1.2. La alternancia de generaciones

La reproducción sexual en los organismos eucariotas se caracteriza por una alternancia de dos fases (Figura 1.3). En cada fase, los núcleos de las células que componen el organismo tienen distinta carga cromosómica, y el paso de una a otra fase está mediado por un evento concreto. Así, cuando una célula diploide sufre una meiosis, da lugar a células haploides. Al dividirse, estas darán lugar a más células haploides, incluso a un organismo completo haploide. Esta sería la fase haploide. Al final de esta fase, algunas de las células haploides se convierten en gametos, y la fusión de dos de ellos daría lugar a un zigoto diploide. Sucesivas divisiones mitóticas permitirían el desarrollo de un organismo diploide, con lo que se completaría la fase diploide, cerrándose así el ciclo de la alternancia de generaciones.

Por tanto, la alternancia de generaciones consistiría en *la aparición de dos fases o generaciones en el ciclo vital de un organismo* de reproducción sexual. Una de estas generaciones sería la diploide o *esporofítica,* en la que el individuo diploide (esporófito) crece y se desarrolla de forma vegetativa, multiplicando sus células por mitosis, hasta que alcanza un estadio de madurez reproductiva en la que se desarrollan unas estructuras denominadas *esporangios*. En los esporangios, algunas de esas células diploides, esporofíticas, en lugar de dividirse mediante la habitual mitosis, se dividen a través de meiosis, un proceso por el cual se generan células haploides. Éste es el comienzo de la generación haploide, o *gametofítica*.

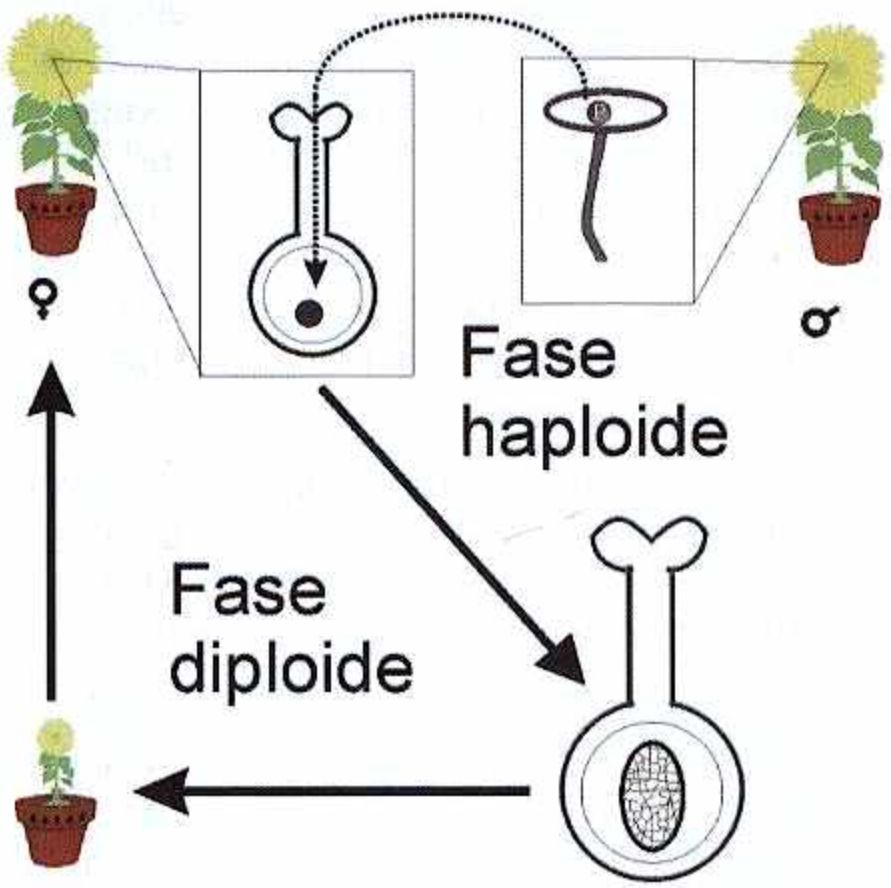


Figura 1.3: Alternancia de generaciones haploide y diploide durante el ciclo vital de un organismo.
Imagen de Seguí Simarro.

Esta generación comienza con la producción de esporas haploides (n), todavía dentro del esporangio, que se multiplican mediante mitosis para dar lugar a células genéticamente idénticas, y por tanto, también haploides, que conforman el *gametófito*. Al final de esta generación, en todos los casos se producen unas estructuras especializadas llamadas *gametangios*, dentro de las cuales se desarrollan unas células haploides especiales, los gametos. Los gametófitos pueden ser bisexuales o unisexuales. Los bisexuales darán lugar a gametangios y finalmente gametos de ambos sexos, mientras que los unisexuales darán lugar a un solo tipo de gametangios y gametos. Así, dentro de los unisexuales se distinguen los gametofitos femeninos, que poseen gametangios femeninos *(arquegonios)* en los que se producen gametos femeninos, y los gametofitos masculinos que poseen gametangios masculinos *(anteridios)*, en los que se generan los gametos masculinos. Una vez desarrollados ambos tipos de gametos, éstos están destinados a fusionarse con los del sexo opuesto para dar lugar al *zigoto*, ya diploide por tanto, que dará comienzo a una nueva generación esporofítica.

Las generaciones gametofítica y esporofítica pueden tener una duración mayor o menor dependiendo de la especie de eucariota de que se trate. Pero esta distinta duración no es algo casual. Muy al contrario, parece haber una clara tendencia evolutiva hacia la reducción del gametófito en cuanto a su duración, complejidad celular y autonomía, conforme escalamos en el árbol evolutivo.

Por ejemplo, en el caso de los musgos (Figura 1.4) la generación gametofítica se prolonga durante mucho más tiempo que la esporofítica, siendo el gametófito haploide la estructura adulta, verde y con hojas que se observa de forma

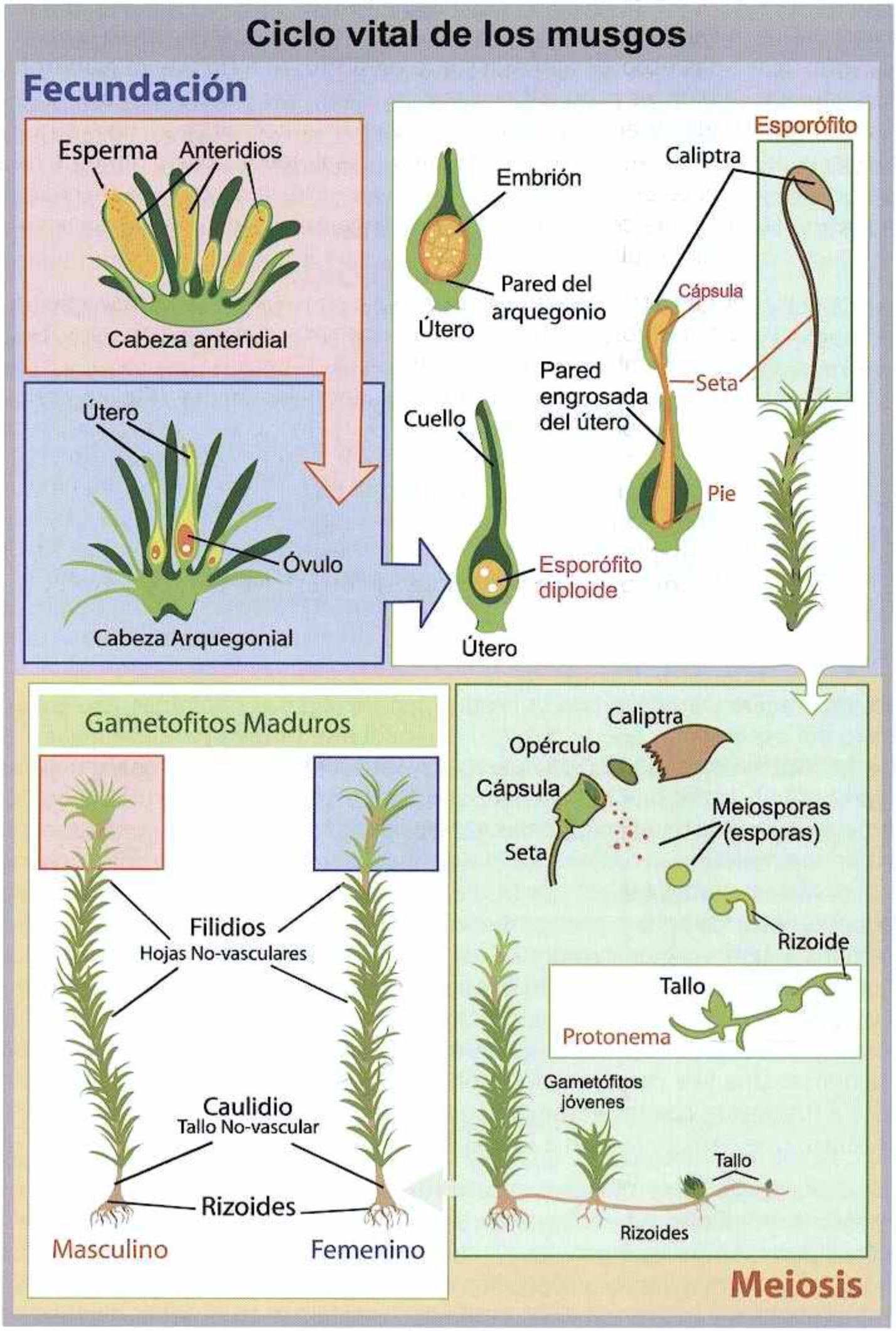


Figura 1.4: Ciclo vital de los musgos.
Adaptación de contenido libre, de dominio público,
de Wikimedia Commons. (http://commons.wikimedia.org).

predominante durante el ciclo vital del individuo. El esporófito diploide se desarrolla sobre el gametófito sólo durante un momento concreto de su ciclo vital para dar lugar a las esporas haploides que darán lugar a un nuevo gametófito. Otros ejemplos de ciclos predominantemente haploides pueden encontrarse en algunas algas verdes y en la mayoría de los hongos ficomicetos, en los que el organismo adulto, unicelular o pluricelular, es haploide y la fase diploide de su vida sólo se presenta en el zigoto diploide, que sufre inmediatamente meiosis para dar cuatro o más células haploides que darán origen a igual número de individuos haploides adultos.

Cuando tanto el gametófito como el esporofito son observables a simple vista como pasa en los musgos, se dice que hay una alternancia manifiesta de generaciones. Esto es también lo que sucede en los helechos, aunque en este caso el gametófito no es la estructura claramente dominante (Figura 1.5). En los helechos, la fase esporofítica (diploide) comienza con la aparición de una plántula en el *prótalo*, que acaba dando lugar la planta con hojas que constituye el esporófito en sí. En el envés de estas hojas es donde se desarrollan los esporangios, órganos donde se producen las esporas, que dan comienzo a la fase gametofítica (haploide). Las esporas germinan y dan lugar al gametófito (denominado *prótalo*), pequeño (pocos centímetros), verde y autótrofo, pero

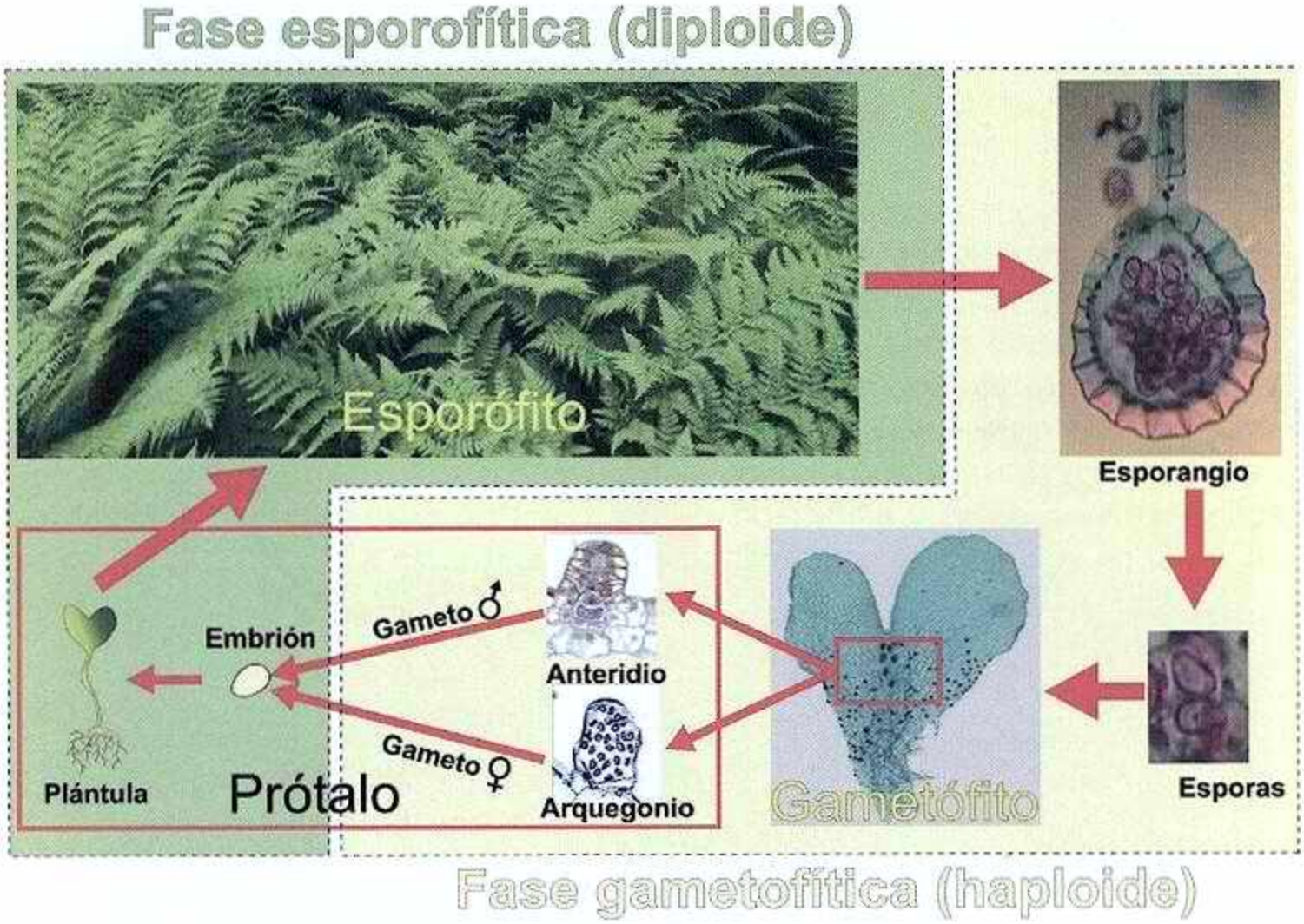


Figura 1.5: Ciclo vital de helechos.
Adaptación con imágenes de contenido libre, de dominio público, de Wikimedia Commons. (http://commons.wikimedia.org).

efímero. En la cara inferior del prótalo se encuentran los arquegonios y los anteridios, órganos donde se forman los gametos femeninos y masculinos respectivamente. Al fundirse ambos (fecundación), se forma un embrión (diploide ya) sobre el prótalo, que crece y germina dando lugar a la plántula (esporófito), y a una nueva fase esporofítica.

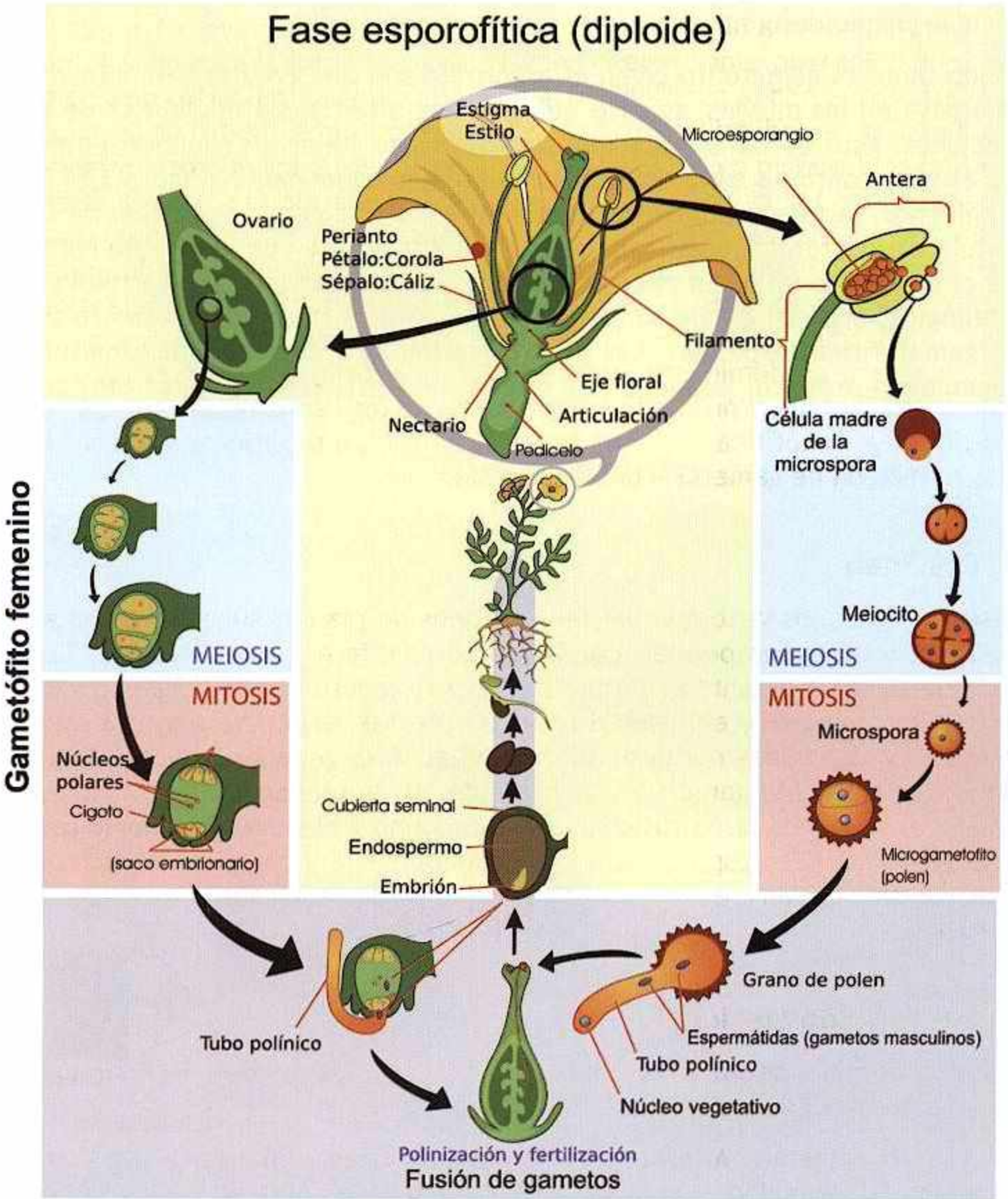


Figura 1.6: Ciclo vital de angiospermas.
Adaptación de contenido libre, de dominio público, de Wikimedia Commons. (http://commons.wikimedia.org).

En eucariotas superiores como los animales, la fase esporofítica es ampliamente dominante, ocupando la gran mayoría del ciclo vital de la especie. Sobre o dentro del organismo diploide se desarrollan los gametófitos (*gónadas*), masculinos o femeninos, normalmente pequeños, reducidos a su mínima expresión y exclusivamente destinados a producir los gametos respectivos. En el caso que nos ocupa, el de las plantas, sucede algo parecido en cuanto que el esporófito es la estructura dominante, que prevalece durante todo el ciclo vital, y dentro de la cual se forman los gametófitos masculino y femenino. La máxima expresión de esta tendencia la encontramos en las angiospermas (Figura 1.6), donde las hojas fértiles (*carpelos*), modificadas, que van a dar lugar a los gametófitos, solo aparecen cuando la planta alcanza un cierto tamaño indicativo de su estado de madurez reproductiva. Entonces aparecen las flores, dentro de las cuales está el *megasporangio* o esporangio femenino (*pistilo*) y los *microsporangios* o esporangios masculinos (*estambres*). En ellos se da la meiosis para la formación de las esporas. Las esporas crecen y se desarrollan internamente, dando los gametófitos femenino (saco embrionario) y masculino (el grano de *polen*). La fusión del gameto femenino (*célula huevo*) con el masculino (célula *espermátida*). Dará lugar a un embrión diploide, y por tanto a un nuevo esporófito independiente y predominante. A lo largo de los próximos temas veremos con mucho mayor detalle y profundizaremos en todos los aspectos de las fases esporofíticas y gametofíticas del ciclo vital de las plantas superiores relacionados con la formación de gametos y la reproducción.

1.3. Resumen

En este tema hemos visto que existen dos tipos de plantas superiores, las angiospermas y las gimnospermas, con importantes diferencias entre ellas. También hemos visto que tanto angiospermas como gimnospermas, al igual que los musgos o los helechos y en general todas las plantas, experimentan una alternancia de generaciones durantes su ciclo vital. A la generación esporofítica, diploide, le sucede la gametofítica, haploide, en la que se forman, maduran y dispersan los gametos. Al fusionarse el masculino y el femenino, comenzará una nueva generación esporofítica. La preponderancia y complejidad de cada una de estas fases van a estar ligadas a la posición de cada especie en la escala evolutiva.

1.4. Información adicional.

- Reproduccion sexual - Hipertextos del Área de la Biología. www.biologia.edu.ar/reproduccion/sexual.htm
- El reino vegetal. Alternancia de generaciones. Biblioteca de agronomía, Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado, Venezuela. http://bibagr.ucla.edu.ve

TEMA 2. Reproducción en plantas

Podemos definir en concepto *reproducción* como la capacidad de todos los seres vivos de engendrar a partir de ellos, otros seres semejantes a ellos, en algún momento de su vida. A partir de esta definición, que podría englobar a las distintas formas de reproducción conocidas y a los distintos organismos que se reproducen, se podría comenzar a matizar y a especificar las distintas variantes o particularidades reproductivas que cada organismo posee como propias.

Para los seres humanos, el modo de reproducción más familiar es el sexual. Entre otras razones, porque es el único posible en nuestra especie, así como en las especies más cercanas a nosotros, los mamíferos. Todos tenemos muy asimilado que en humanos, vacas, cerdos o gatos no hay reproducción sin sexo. Entiéndase como sexo la existencia de dos tipos de individuos en una misma especie, los de sexo masculino y los de sexo femenino, cada uno portador de caracteres sexuales distintos y complementarios, siendo en términos reproductivos el más importante de estos caracteres la capacidad de producir gametos masculinos y femeninos, respectivamente. Esto es lo que se conoce como *dimorfismo sexual*. En el caso de las plantas, esto también es así. Pero no solo así. Hay más variantes dentro de la reproducción sexual. Y también hay variantes fuera de la reproducción sexual. Es posible reproducirse sin sexo. En definitiva, hay muchas más variantes reproductivas en el reino vegetal. Estas variantes reproductivas se pueden englobar en dos grandes grupos: las variantes de *reproducción sexual*, y las de *reproducción asexual*. A lo largo de este tema veremos las características principales de estos dos tipos de reproducción.

2.1. Reproducción sexual

La reproducción sexual es aquel tipo de reproducción en el que se da la fusión de gametos haploides (*singamia*) de distinto sexo (masculinos y femeninos) para producir, mediante un proceso denominado *fecundación*, un *zigoto* diploide. El zigoto al desarrollarse formará un *embrión* y éste a su vez un nuevo individuo adulto (esporófito), que volverá a generar gametos (haploides), con los que se posibilitará una nueva generación de reproducción sexual. Es decir, la reproducción sexual viene definida en primer lugar por un fenómeno exclusivo de ella, la fecundación (Figura 2.1), o fusión de gametos haploides provenientes de ambos progenitores. En el tema 11, dedicado a la fecundación y la embriogénesis, abordaremos este concepto con más detalle. Gracias a la fecundación, se forma un zigoto en el que se combinan caracteres paternos y maternos, resultando el zigoto genéticamente similar a sus progenitores y a la vez diferente a cada uno de ellos. Este hecho es una de las grandes ventajas de la reproducción sexual.

Pero ¿de donde vienen estos gametos haploides? La respuesta a esta pregunta es la segunda gran característica de la reproducción sexual: la meiosis para formar gametos reducidos, haploides (Figura 2.1). Para que a partir de las células somáticas (diploides) se originen gametos haploides, ha de tener lugar en algún momento del ciclo vital una división reduccional: una *meiosis*. Mediante

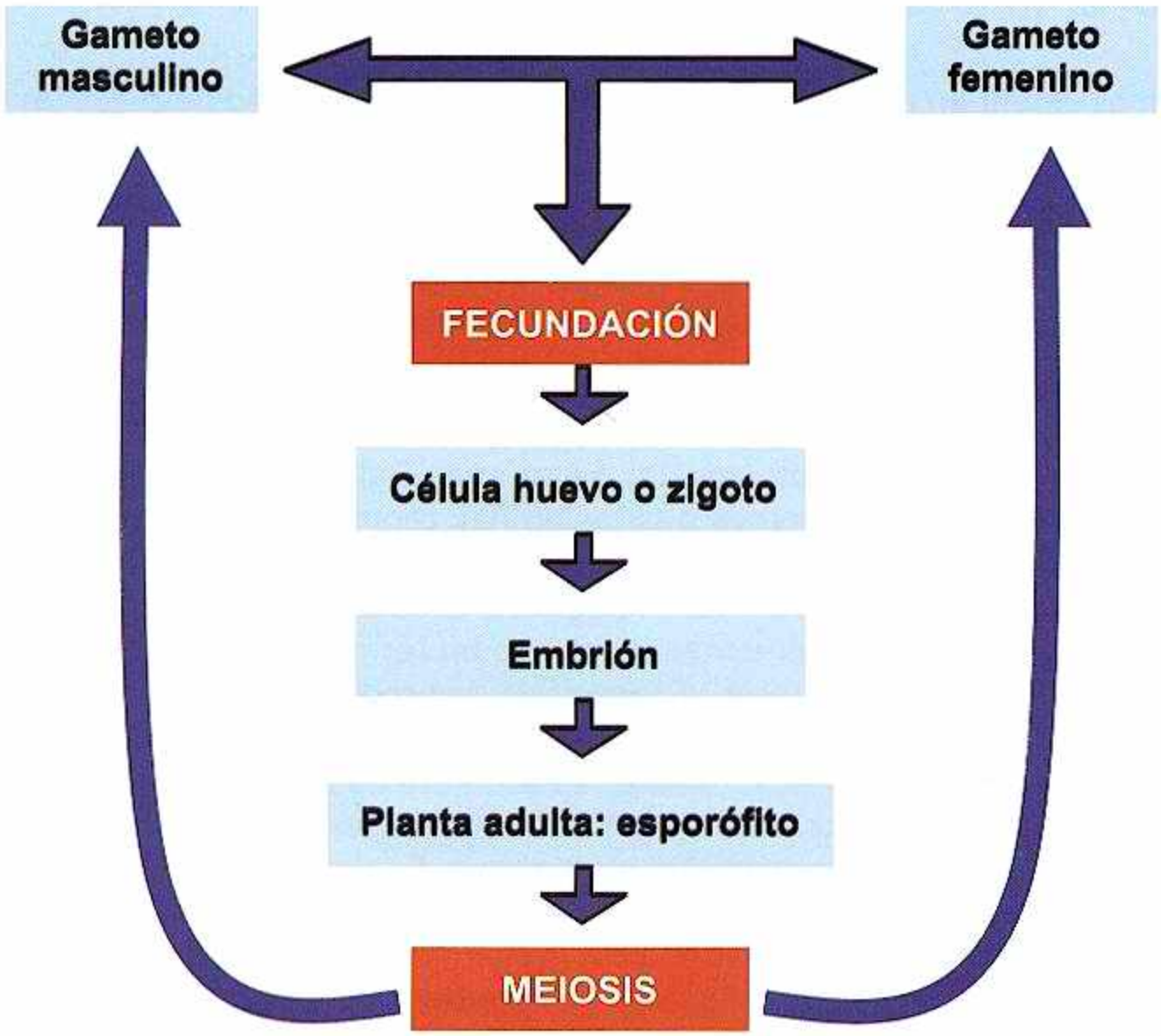


Figura 2.1: El ciclo reproductivo sexual viene determinado fundamentalmente por dos eventos: la meiosis y la fecundación.
Imagen de Seguí Simarro.

meiosis se producen a partir de cada célula madre cuatro células hijas con el número cromosómico reducido a la mitad (número gamético). Si esto no sucediera, y los gametos tuvieran el mismo número de cromosomas que las células somáticas o vegetativas, el número de cromosomas de los individuos de una especie se iría duplicando con cada generación, lo cual sería inviable para la especie. Por tanto, la meiosis es un mecanismo de mantenimiento de la constancia en la carga cromosómica de los individuos de una especie. Pero también sirve para generar variación natural. Durante la meiosis, además de segregarse los cromosomas de cada complemento haploide (lo veremos con más detalle en el tema 6), también se da un proceso denominado *recombinación*, por el cual los cromosomas se intercambian información (genes) entre ellos, dando lugar a cromosomas con nuevas combinaciones de genes. Esto permite la aparición de nuevos genotipos, y por tanto nuevos fenotipos también. Es decir, es un mecanismo de generar variabilidad genética.

Por tanto, la principal ventaja que presenta la reproducción sexual, desde un punto de vista evolutivo, es que es un modo de reproducción que permite la variación por recombinación de caracteres. Esto facilita la aparición de nuevos

fenotipos, con características nuevas, algunas de las cuales pueden ser beneficiosas para la especie, y quedar fijadas por selección natural. No obstante, esta vía reproductiva tiene también sus desventajas. Por ejemplo, que los organismos que se reproducen por esta vía lo hacen más lentamente que aquellos que optan por reproducirse asexualmente. No es esta la mejor forma de ser los primeros en colonizar un nuevo hábitat. Por tanto, la reproducción sexual, en el corto plazo, no debe ser entendida como el mejor modo de reproducción posible, sino como un modo más, con sus ventajas e inconvenientes, de modo que en unas circunstancias puede ser la más favorable pero no en otras. Sin embargo, la reproducción sexual sí se ha demostrado como la mejor opción en el largo plazo, a escala evolutiva. Se cree que la reproducción sexual ha sido la clave de muchas especies para generar variación y adaptarse a los entornos terriblemente cambiantes a los que han tenido que enfrentarse a través de las distintas eras geológicas.

Al principio del tema hemos comentado que, al contrario que en mamíferos, dentro de la reproducción sexual las plantas tienen varias alternativas. Estas alternativas vienen dadas por el hecho de que puede haber individuos vegetales hermafroditas, con presencia de aparatos reproductores funcionales femeninos y masculinos en el mismo individuo. Por tanto, una planta hermafrodita puede cruzarse con otra, como hacemos los animales, o hacerlo consigo misma, es decir, autofecundarse. A estas dos opciones es a lo que se denomina *alogamia* y *autogamia*, respectivamente.

2.1.1. Alogamia

La alogamia (*xenogamia* o *fecundación cruzada*) es un mecanismo reproductor por el que un individuo, aun siendo hermafrodita, se autoimpone barreras de distinta naturaleza, para impedir que pueda fecundarse a sí mismo. Dicho de otro modo, un individuo alógamo ha de cruzarse obligatoriamente con otros individuos para formar semilla. En muchas especies, la alogamia es obligada cuando las flores hemafroditas son *autoincompatibles*, desarrollando barreras anatómicas, genéticas y fisiológicas que impiden o bien la germinación del propio polen o bien el desarrollo del tubo polínico. De entre las barreras antes mencionadas, destacan en las angiospermas las numerosas adaptaciones florales que han desarrollado a lo largo de su evolución para favorecer la alogamia. De entre ellas podemos mencionar la *dicogamia* (separación temporal de sexos), la *hercogamia* (separación espacial de sexos), la presentación secundaria de polen, la *diclinia* y la *autoincompatibilidad*. Las veremos en el tema 9.

La alogamia es el sistema de reproducción sexual vegetal más conocido, y desde un punto de vista evolutivo, es el que mejor garantiza el éxito de una especie, pues elimina la posibilidad de endogamia, favorece la aparición de nuevas combinaciones alélicas dentro de una población, y en definitiva es una fuente de variabilidad genética en la especie, garantizando la posibilidad de sobrevivir a los cambios de medio ambiente.

2.1.2. Autogamia

La autogamia (o autofecundación) es un sistema de reproducción sexual en el que un individuo preferentemente se fecunda a sí mismo. Al contrario que la alogamia, la autogamia es un sistema preferente, pero no exclusivo. Muy raramente la autogamia es el único mecanismo. De hecho, todas las especies descritas como autogamas obligadas poseen unos niveles muy bajos de alogamia. Esto es necesario para asegurar un flujo génico entre poblaciones y garantizar la unidad de la especie. Es fácil intuir que si una especie fuera exclusivamente autogama, a la larga estaría condenada al fracaso por no intercambiar genes con el resto. Sería lo más parecido a una reproducción asexual, pese a haber fecundación. Por ello, cuando se habla de especies autogamas, en realidad nos referimos a especies predominantemente autogamas, pero siempre con un cierto grado de alogamia. Cuando la alogamia no es rara se dice que son *autogamas facultativas* u *opcionales*.

A pesar de sus inconvenientes como modo único de reproducción, la autogamia es una estrategia útil en un momento dado cuando existe un pequeño número de individuos por área, ya que es más importante asegurarse el éxito de la propagación que la producción de nuevos genotipos. Y es que la autogamia asegura una máxima eficiencia en la reproducción, ya que el polen no ha de recorrer grandes distancias, ni estar sometido a inclemencias atmosféricas o al capricho del polinizador. En el mejor de los casos, tan solo ha de caer de la antera al estigma que hay justo debajo, sin que la flor se llegue ni tan siquiera a abrir (cleistogamia). Aunque sea a costa de la variabilidad genética, es pues la mejor manera de asegurar la producción de semilla. Por esta razón, las plantas de especies autógamas son por lo general anuales, con flores pequeñas, inconspicuas, con menor cantidad de polen, con piezas florales reducidas, (reducción en el número y tamaño de los estambres y modificaciones del perianto) y sin atracción alguna para los agentes polinizadores, ni fragancia ni néctar. No lo necesitan.

La autogamia está muy difundida entre malezas, plantas pioneras y especies insulares, que necesitan la fructificación de individuos aislados, que utilizan esta herramienta genética para que los individuos mejor adaptados colonicen nuevos nichos ecológicos. Se da también en gramíneas (cereales) o violetas.

2.2. Reproducción asexual.

La reproducción asexual es un tipo de reproducción en el que no se forman gametos, ni zigotos, ni hay meiosis, ni fecundación. Generalmente ocurre con la multiplicación de células somáticas (de origen no gamético), que generan nuevas células somáticas mediante divisiones mitóticas (sin recombinación). Al no haber fusión de gametos ni recombinación, los descendientes son genéticamente idénticos (clones) al único parental (excluyendo que ocurra alguna mutación).

La capacidad de las plantas para reproducirse asexualmente tiene su base en el concepto biológico de la *totipotencia celular*. La totipotencia es la potencialidad de una célula para especializarse en virtualmente cualquier tipo celular de un organismo. Una célula totipotente sería como un libro en blanco. En función de quien lo escriba podrá acabar como un libro de poemas, un libro de texto, una novela, un cómic o un ensayo. La capacidad totipotente de una especie está íntimamente relacionada con la de reproducirse asexualmente. Por eso, las plantas pueden reproducirse asexualmente porque tienen la enorme ventaja de que cualquiera de sus células, aunque ya esté diferenciada para ser parte de una hoja, raíz o tallo, es capaz de revertir el proceso de diferenciación original y volver a un estado "embrionario", totipotente, si se dan las condiciones adecuadas.

Igual que hemos visto que la reproducción sexual tiene ciertas ventajas y desventajas, la asexual tiene también de ambas. Desde un punto de vista biológico, la vía asexual suele ser más rápida que la sexual, de modo que es útil a corto plazo para colonizar un nuevo hábitat antes que las especies competidoras. Se acaba antes propagándose vegetativamente que esperando a ser polinizada y fecundada, formar fruto y semilla dentro de él, y después dispersar y germinar la semilla. Bajo el prisma aplicado de la mejora vegetal, la reproducción asexual permite una velocidad mayor de generación, con lo que podemos obtener plantas adultas y productivas con menos recursos y en menos tiempo. Esto es especialmente útil en especies en las que la reproducción sexual, por semilla, es especialmente complicada. Es el caso de la patata (*Solanum tuberosum*). Desde hace siglos, el cultivo de la patata se basa en trocear patatas de modo que en cada trozo haya un pequeño brote (yema) y en sembrar los trozos para que cada uno regenere una nueva mata. Además, la vía asexual permite mantener invariables aquellos caracteres de interés a través de generaciones. Esta es la base para la reproducción de muchas especies vegetales de interés agronómico que, además de permitirnos perpetuar los caracteres de interés a lo largo de generaciones y evitar que se diluyan en la descendencia, resultan a menudo mucho más baratas de reproducir por vía vegetativa (asexual) que por vía sexual.

En cuanto a las desventajas, la reproducción asexual tiene sobre todo una, pero trascendental. Evolutivamente, las especies que adoptaran este modo de reproducción de forma exclusiva estarían condenadas al fracaso. Al no haber recombinación ni fusión de gametos procedentes de individuos diferentes, no habría mezcla de caracteres, ni aparición de nuevas combinaciones. No habría capacidad de adaptación, en definitiva. Mientras la población o la especie permaneciera en las condiciones a las que está adaptada, y estas condiciones se mantuvieran invariables, todo iría bien. Pero tan pronto estas cambiaran (cosa que lo largo de los siglos sucede frecuentemente) y supusieran un nuevo reto biológico, la especie comenzaría su extinción, por ser incapaz de hacerle frente.

Hay numerosas formas de reproducción asexual, desde el desarrollo de una célula sexual no fecundada hasta la fragmentación del organismo en varias partes. Estas distintas formas pueden agruparse en dos grandes bloques, en función de que haya o no embriogénesis: multiplicación (propagación) vegetativa (sin embriogénesis) y apomixis (con embriogénesis). Veremos cada uno de ellos a continuación. Sin embargo, antes es necesario hacer una aclaración. Con frecuencia se utiliza indistintamente los términos "multiplicación vegetativa" y "reproducción asexual". Pero lo cierto es que estos dos conceptos no son sinónimos: como veremos a continuación, la reproducción vegetativa es una forma de reproducción asexual que se da en partes de la planta (tallos, hojas, raíces...) no involucradas en la reproducción sexual. Pero la reproducción asexual también engloba a la apomixis, que es asexual porque no hay fecundación de por medio, pero no es un método de multiplicación vegetativa por no estar implicadas partes vegetativas de la planta, sino partes, órganos, implicados en la reproducción, como veremos en el punto 2.2.2.

2.2.1. Multiplicación vegetativa

Consiste en la regeneración (clónica) de una nueva planta directamente mediante el desarrollo de estructuras vegetativas especializadas a partir de los tejidos somáticos de la planta madre. La multiplicación vegetativa es posible gracias a la totipotencia celular, que permite que unas células, inicialmente diferenciadas, reviertan a un estado desdiferenciado, y luego se rediferencien para formar la estructura reproductora vegetativa. Este tipo de reproducción se da en muchas plantas de forma natural. Entre las estructuras naturales involucradas en la multiplicación vegetativa se encuentran los:

- ***Estolones***: tallos largos y delgados que al crecer a ras del suelo enraízan de forma espontánea. Ejemplo: fresas (Figura 2.2) y fresones (género *Fragaria*), o *Chlorophytum*.

Figura 2.2: Estolón de fresa (*Fragaria sp.*).
Imagen de Seguí Simarro.

- ***Rizomas***: tallos engrosados subterráneos. Se da en gramíneas y juncos. Algunas como el sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*) se transforman de este modo en malezas muy invasivas.
- ***Bulbos*** y ***tubérculos:*** engrosamientos de la raíz que además de almacenar reservas se usan en la reproducción. Ejemplos: patata (*Solanum tuberosum)*, ajo (*Allium sativum)*, cebolla (*Allium tuberosum*), *Pancratium* (Figura 2.3A) o chufa (Figura 2.3B).

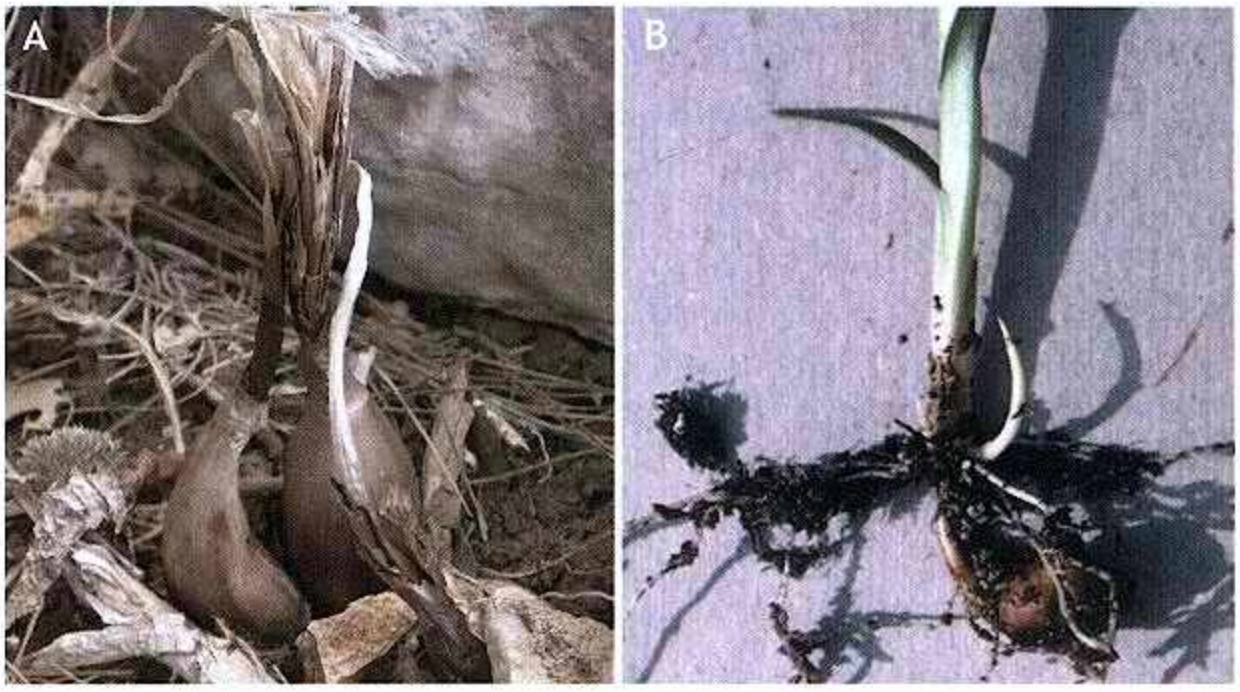


Figura 2.3: Bulbos y tubérculos. A: Bulbo de *Pancratium parviflorum*. B: tubérculo de chufa (*Cyperus esculentus*).
Imagenes de Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org). A, de Gideon Pisanty, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported (http://creativecommons.org), y B, del Dr. Stanley Kays, es reproducida con permiso.

- ***Yemas de tallos subterráneos.*** Ejemplo: plataneros (carecen completamente de reproducción sexual, los frutos son partenocárpicos, se forman sin fecundación). También se observan en el manzano y los sauces.

2.2.2. Apomixis

La apomixis, en angiospermas se define como la formación de semilla por vía asexual, a partir de los tejidos maternos del óvulo y mediante embriogénesis, pero evitando la meiosis y la fertilización. La apomixis fue descubierta al observarse que una sola planta hembra de *Alchornea ilicifolia* (originaria de Australia) de los jardines de Kew, en Inglaterra, producía semillas continuamente sin disponer de polen para ser fecundada. En 1908, Winkler introdujo el término *apomixis* para definir "la sustitución de la reproducción sexual por un proceso de multiplicación asexual sin fusión nuclear y celular". Por esta razón, algunos autores han utilizado el término "apomixis" para describir cualquier forma de reproducción asexual en plantas. Actualmente, esta interpretación del término ya no se acepta por la comunidad científica, y el término *apomixis* se usa como sinónimo del término "agamospermia". Dado que solo producen semillas

las plantas superiores (angiospermas y gimnospermas), el término apomixis se aplica solo a ellas, y no a procesos similares que puedan observarse en plantas inferiores. Lejos de ser un fenómeno raro, la apomixis se ha descrito en más de 400 especies, de más de 40 familias distintas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Hasta hoy no se conoce en gimnospermas, por eso la definición actual se aplica de momento a angiospermas.

Hay distintas variantes de la apomixis, con desarrollo del saco embrionario (diplosporia y aposporia) y sin desarrollo de saco embrionario (embrionía adventicia). En la *diplosporia*, la célula madre del saco embrionario o gametófito femenino se desarrolla directamente en un embrión. La célula madre no llega a entrar en meiosis, y el embrión resultante se deriva directamente de ella. Es por tanto, diploide, genéticamente idéntico a cualquier célula somática de ese individuo. A este proceso se le conoce también como partenogénesis diploide. En la aposporia, el saco embrionario tiene su origen en una célula somática, diploide, de las múltiples que rodean la célula madre del saco embrionario (nucela). El embrión es por tanto también diploide. Tanto en la aposporia como en la diplosporia se desarrolla un gametofito, aunque éste no haya sufrido meiosis. Por esta razón se llama también a este fenómeno apomixis gametofítica. En cambio, en la embrionía adventicia no se desarrolla saco embrionario. El embrión se desarrolla a partir de células del esporofito diploide (el integumento, por ejemplo).

El diente de león (*Taraxacum officinale*, Figura 2.4) es un ejemplo de especie que utiliza la apomixis como modo natural de reproducción. Otros ejemplos

Figura 2.4: Diente de león (*Taraxacum officinale*).
Imagen de Pöllö, de contenido libre, en Wikimedia Commons. (http://commons.wikimedia.org).

pueden encontrarse en ciertas familias como las poáceas, las rosáceas y las compuestas. En estas últimas la apomixis es un tipo de reproducción obligada en géneros como *Achillea, Brachycome, Crepis, Parthenium, Hieracium, Erigeron, Conyza* o el mencionado *Taraxacum*. En gramíneas, la apomixis se ha identificado en cientos de especies de los géneros *Poa, Setaria, Capillipedium, Themeda, Heteropogon, Sorghum, Bothriochloa, Dichanthium*, y *Cenchrus*. También se da de forma natural en cítricos (*Citrus sp.*).

2.3. Resumen

En este tema hemos definido el concepto de la reproducción, y hemos visto que las plantas pueden reproducirse a través de dos vías independientes, la sexual y la asexual. La gran diferencia de la sexual frente a la asexual es que en la primera se pasa por una meiosis que reduce el número de cromosomas a un número gamético, mitad del somático y generalmente haploide. La segunda gran diferencia es la fecundación, por la cual se funden los gametos de ambos sexos, se mezclan sus cromosomas y se restituye en el zigoto el número de cromosomas que tenían sus progenitores.

La gran ventaja de la reproducción sexual es precisamente la generación de variabilidad genética que estos dos procesos proporcionan. Dentro de la reproducción sexual podremos encontrarnos con alogamia (fecundación cruzada) y autogamia (autofecundación). En la autogamia, aunque se den todos los pasos de la reproducción sexual, no tendremos tanta variabilidad porque no hay mezcla de cromosomas de individuos distintos.

La reproducción asexual se basa en la capacidad totipotente de las células vegetales. En esta vía reproductiva no se da ni la meiosis ni la fecundación, por lo que no hay más fuente de variabilidad que la que puedan proporcionar las mutaciones espontáneas, si las hay. A pesar de ello, este tipo de reproducción puede ser ventajoso para una especie en ciertas situaciones evolutivas. Las plantas tienen distintas estrategias para reproducirse de forma asexual en su entorno natural. De hecho, en muchas especies coexisten la vía sexual y la asexual, y la planta utiliza una u otra según le interese.

2.4. Información adicional

- Cubero, J.I. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal, 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Reproducción sexual y asexual de las plantas (recurso online). http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r23336.PPT.
- Seguí-Simarro, J.M. 2009. Dos sexos ¿para qué?: Aspectos celulares, genéticos y agronómicos de la reproducción asexual de las plantas. In: Un breve viaje por la ciencia. Universidad de La Rioja Press, Logroño, La Rioja, España. Pp 63-69. ISBN: 978-84-96487-46-8.

TEMA 3. La flor

La flor es la parte de la planta que alberga los órganos reproductores, tanto masculinos como femeninos. Es, por tanto, la flor la que alberga la fase gametofítica del ciclo vital de las plantas superiores, y donde se van a llevar a cabo todos los procesos esenciales que tengan que ver con la reproducción sexual. De entre ellos destacan la *meiosis,* la formación de gametos, y la *fecundación.*

Cabe deducir de todo esto que es la flor la piedra angular sobre la que gira toda la biología reproductiva sexual de la planta. Por esta razón, en este tema veremos sus aspectos anatómicos más relevantes, sus distintas tipologías y su relación con la sexualidad, el control genético y el control hormonal. Por último veremos las distintas formas en las que las flores se pueden agrupar formando conjuntos de ellas denominados *inflorescencias.*

3.1. Diversidad floral

La presencia de flores es el carácter distintivo del grupo de plantas denominadas *espermatofitas*. Dentro de él encontramos a las angiospermas y a las gimnospermas. Las flores de angiospermas se caracterizan por poseer *verticilos* o espirales ordenadas. Se conocen actualmente más de 250.000 especies de angiospermas, por lo que es fácil deducir que en su conjunto, las flores de las angiospermas constituyen uno de los mayores ejemplos, sino el mayor, de diversidad natural de formas, tamaños y colores (Figura 3.1).

La combinación de estas tres características en flores concretas les confiere además un enorme grado de especialización a la hora de desempeñar su función biológica, la reproducción. Así, podemos encontrar flores especializadas en ser polinizadas por

determinados tipos de insectos y no otros, o por factores abióticos como el aire o el agua, o flores especializadas en la autofecundación, o en justo lo contrario, la alogamia, o flores adaptadas a ambientes sumamente hostiles, fríos, o secos, o flores modificadas para evitar ser devoradas por determinados animales.

En definitiva, hay un innumerable abanico de morfologías y especializaciones según sean las características de la especie en la que esté presente la flor, y el entorno en el que ésta se desarrolle. Desde un punto de vista más allá del biológico, las combinaciones de formas y colores de algunas flores han hecho que sean consideradas en ámbitos artísticos como el pictórico o el literario como paradigmas de la belleza y fuentes de inspiración a lo largo de la Historia.

3.2. Posición de la flor en la planta

Comúnmente las flores aparecen en la axila de las hojas, provenientes de la transformación de un meristemo vegetativo axilar en inflorescente o floral, como se verá en el Tema 4. Algunas flores se encuentran en la axila de los

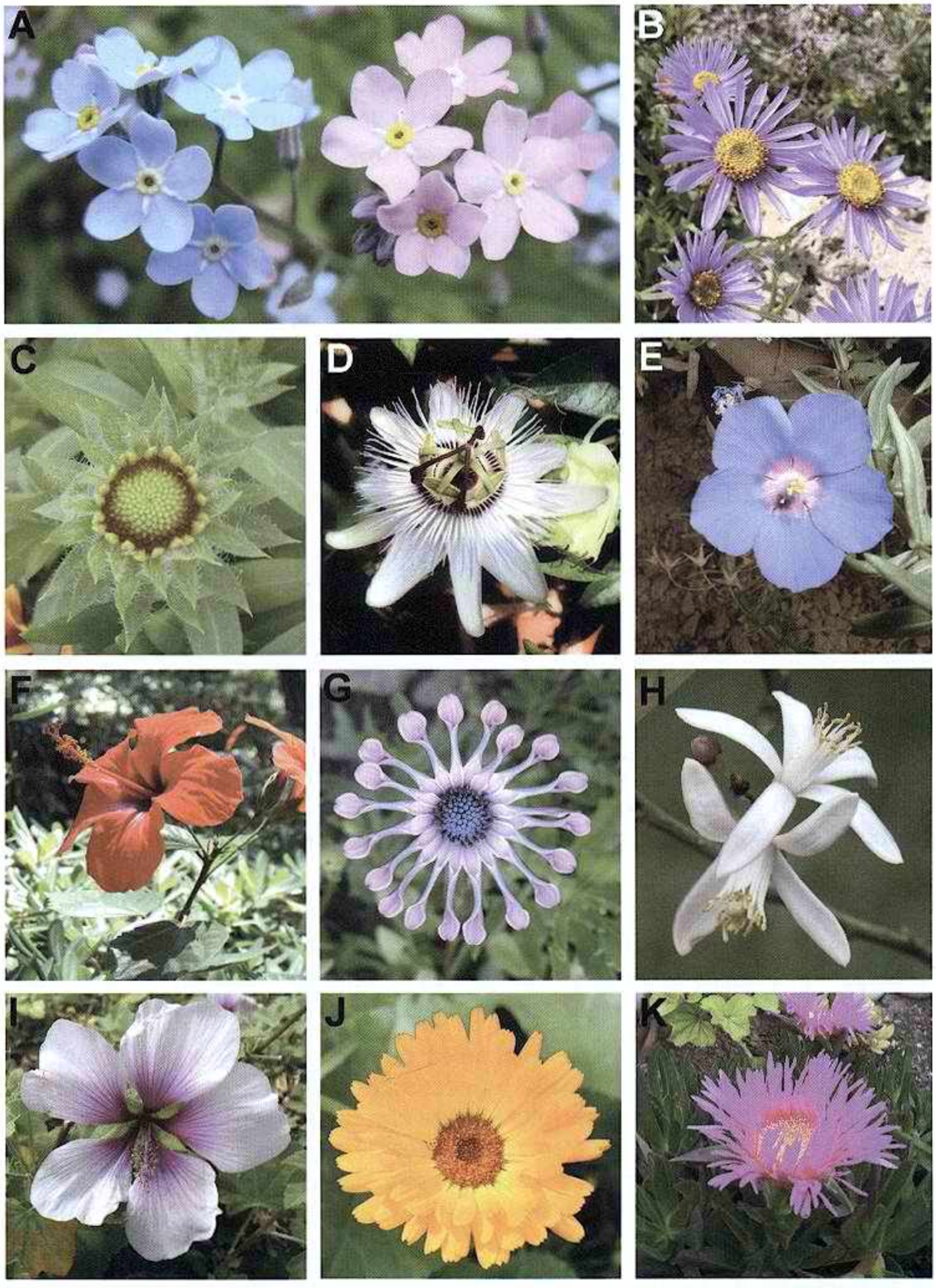


Figura 3.1: Ejemplos de la diversidad floral en angiospermas. A: *Myosotis arvensis*; B: *Aster alpinus*; C: *Gaillardia sp.*; D: *Passiflora caerulea*; E: *Anagallis monelli*; F: *Hibiscus rosa-sinensis*; G: *Osteospermum fruticosum*; H: *Citrus sp.*; I: *Lavatera maritima*; J: *Calendula officinalis*; K: *Carprobotus acinaciformis*.

Imágenes de dominio público, en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org), salvo D (de Quinet) y G (de Lenny Montana), ambas en Flickr.com bajo licencia Creative Commons Attribution.

nomófilos (las hojas vegetativas de la planta, las verdes). Es el caso, entre muchos otros, de las especies del género *Impatiens*, como *Impatiens zombensis* (Figura 3.2).

Figura 3.2: *Impatiens zombensis.*
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

A veces, la forma o el color de los nomófilos se modifica, al pasar del estado vegetativo al estado floral. Entonces se les denominan *brácteas* o *hipsófilos*. Las brácteas suelen estar en la proximidad de las flores, y se diferencian de los nomófilos y de las piezas florales. Generalmente las brácteas suelen ser coloridas, como las brácteas amarillas de *Pachystachys lutea* (Figura 3.3), o las de color rojo de la poinsettia (*Euphorbia pulcherrima;* Figura 3.4).

Figura 3.3: *Pachystachys lutea.*
Imagen de Karel Jakubec, de Wikimedia Commons. (http://commons.wikimedia.org).
Contenido libre, de dominio público.

Figura 3.4: Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima).*
Imagen de Gustavo Serrano en Flickr.com bajo licencia Creative Commons Attribution.

Además de las bracteas, las flores e inflorescencias suelen ir acompañadas de *profilos* o *bractéolas*. Son las primeras brácteas de las ramas axilares, y se disponen en el lado opuesto a los nomofilos. Suele haber generalmente solo uno en monocotiledóneas, adosado al eje que lleva la rama y dos dispuestos lateralmente en dicotiledóneas.

3.3. Anatomía floral

Anatómicamente, la flor es un eje o tallo de crecimiento definido, con entrenudos muy cortos, en el que se insertan los *antófilos* o piezas florales, hojas modificadas para cumplir con una función concreta. Existen cuatro tipos distintos de piezas florales, los *sépalos* y los *pétalos*, cuya función es protectora, y los *estambres* y los *carpelos*, de función reproductora. La flor está unida al tallo por un eje, el *pedúnculo* o *pedicelo* floral, que se ensancha en su parte superior para formar el *receptáculo*, en el que las piezas de un mismo verticilo floral se insertan en un mismo nudo. En la base del receptáculo, además, algunas especies tienen unas glándulas (los *nectarios*) que producen el néctar, sustancia azucarada de gran valor como estrategia para favorecer la polinización, como veremos en el tema 10.

A diferencia de las gimnospermas, las angiospermas se caracterizan por tener flores en las que las piezas florales se disponen siguiendo un patrón altamente estructurado. En algunos casos se disponen siguiendo un patrón espiralado, en el que las piezas se insertan consecutivamente y a diferentes niveles, describiendo una espiral sobre el eje del mismo modo en que las hojas vegetativas

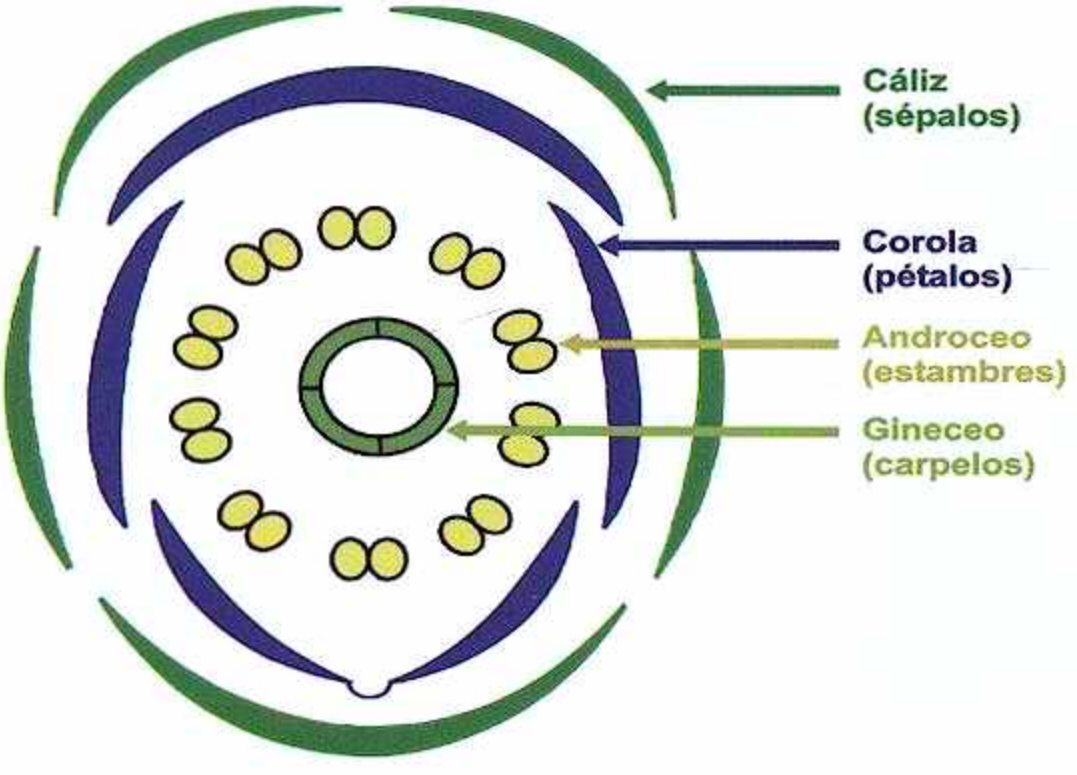


Figura 3.5: Disposición concéntrica de los verticilos.
Imagen de Seguí Simarro.

(nomófilos) se insertan en el tallo. Este es el caso por ejemplo de *Magnolia grandiflora*, *Victoria cruziana* u *Opuntia ficus-indica*. Sin embargo, la disposición de las piezas florales más común es la *verticilada* o *cíclica* (Figura 3.5). En este caso, cada uno de los distintos tipos de antófilos se estructuran formando círculos concéntricos o *verticilos*, insertados en torno al eje floral. De fuera hacia adentro, se distinguen los siguientes cuatro verticilos (Figuras 3.5 y 3.6): el *cáliz*, formado por el conjunto de todos los sépalos; la *corola*, formada por todos los pétalos; el *androceo*, formado por todos los estambres; y el *gineceo*, formado por los carpelos. Al conjunto de los dos primeros verticilos (sépalos + pétalos), estériles y de función protectora, se le denomina *perianto*. El androceo y el gineceo son las piezas fértiles, las directamente encargadas de la reproducción, generando los gametos masculinos en los estambres (en el androceo), o los femeninos en los óvulos, dentro del ovario (gineceo). En el caso del gineceo, además, se dará en su seno la fecundación, se formará el zigoto y se desarrollará el nuevo embrión.

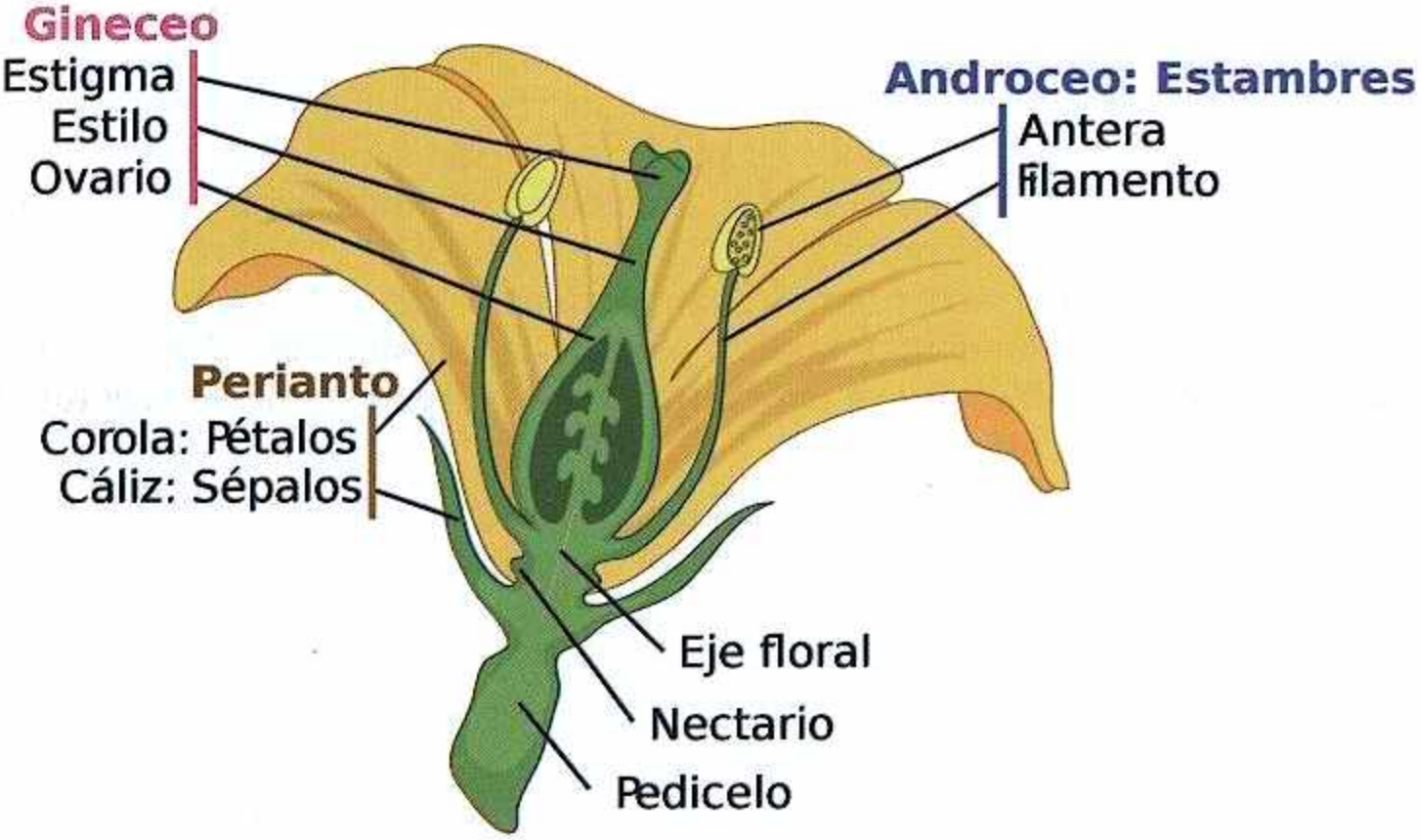


Figura 3.6: Anatomía de una flor típica en sección longitudinal.
Adaptación de imagen de Mariana Ruiz, de dominio público, en Wikimedia Commons.
(http://commons.wikimedia.org)

Esta estructuración en verticilos concéntricos y ordenados con los de protección en la parte exterior y los reproductivos en el interior (Figuras 3.5 y 3.6) es una característica prácticamente inamovible en las angiospermas conocidas. Sin embargo, esta invariabilidad en el orden de las piezas no implica que la forma, la función y la fisiología de dichas piezas esté igualmente conservada. De hecho, las angiospermas se caracterizan por presentar una enorme diversidad morfológica, funcional y fisiológica entre piezas equivalentes de distintas

especies. Esto genera un número prácticamente infinito de combinaciones de formas, tamaños y colores de cáliz, corola, androceo y gineceo, que genera formas tan bellas, exóticas o curiosas como las que se muestran, a modo tan solo de ejemplo, en la Figura 3.1.

Las piezas de cada verticilo pueden soldarse entre sí. Es lo que se denomina cohesión, y sucede en flores como las del género *Nicotiana*, en las que los pétalos se fusionan para formar con ello una especie de recipiente al que las mariposas acceden para libar el néctar. En otros casos, los de algunas solanáceas como el tomate (*Solanum lycopersicum*) y sus especies relacionadas, se fusionan los estambres como mecanismo para favorecer la *autogamia* (autofecundación), pues el polen se vierte siempre dentro del cono formado por la fusión de las anteras, que además impide la entrada de polen foráneo. Las fusiones pueden darse también entre piezas de distintos verticilos, como los sépalos y los pétalos. En este segundo caso, más infrecuente, se hablaría de *adnación*.

3.3.1. Anatomía del perianto

Como hemos comentado antes, el perianto comprende al cáliz y a la corola. Ambos son estériles y, en principio, tienen una función protectora del resto de estructuras de la flor. En algunos casos, esta función similar hace que ambos tengan una morfología también similar. Cuando no hay diferencias morfológicas entre los dos verticilos de protección, las piezas reciben el nombre de *tépalos*. Sin embargo, es muy frecuente que sean los sépalos del cáliz los que adopten principalmente esta función, y que los pétalos de la corola se especialicen en la atracción de polinizadores, y para ello adopten formas, tamaños, fragancias y sobre todo colores atractivos para ellos.

Los sépalos (Figura 3.6) muy frecuentemente son verdes, y su estructura es la que más recuerda a la de los nomófilos de las partes vegetativas de la planta. El mesófilo de los sépalos está formado generalmente por parénquima clorofiliano (fotosintético por ende) homogéneo. Generalmente en cada especie, los sépalos presentan el mismo patrón de venación que se observa en los nomófilos, lo cual contribuye también a su semejanza. No es extraño por tanto que en algunas especies ambos tipos foliares puedan llegar a confundirse. Sin embargo, en la mayoría de las especies suelen diferenciarse de éstos además de por su localización, por su forma y tamaño. En algunos casos, también por el color. Por ejemplo, en una solanácea como *Physalis alkekengi* (Figura 3.7), en flores fecundadas los pétalos caen pero los sépalos comienzan a crecer y a cambiar de color conforme se desarrolla el fruto, de tipo baya. Cuando el fruto madura, los sépalos forman una envoltura rojiza en algunas variedades (Figura 3.7C), que suelen ser las de fruto comestible. En otras desaparece el tejido foliar y persisten tan solo las venaciones (Figura 3.7D), dando lugar a un fruto de valor ornamental.

La estructura de los pétalos es similar a la de los sépalos. Sin embargo, en muchos casos su aspecto y número es muy diferente. En la Figura 3.1 tenemos tan

Figura 3.7: Flores y frutos de Physalis alkekengi.
Imágenes de Snak (A), Zeca Baronio (B), Superfantastic (C) y Gimli_36 (D), en Flickr.com, bajo licencia Creative Commons Attribution.

solo una muestra de la gran disparidad de forma, tamaño, número y color de los pétalos de las flores en angiospermas. Además, existen otras diferencias a nivel celular entre pétalos y sépalos. En primer lugar, el mesófilo de los pétalos generalmente no presenta parénquima clorofiliano, sino parénquima fundamental. Las paredes de las células epidérmicas frecuentemente son convexas o de tipo papiloso. En la epidermis de los pétalos hay también *osmóforos*, células especializadas que contienen aceites esenciales que imparten la fragancia característica a las flores. Pero de todas, la característica más distintiva de los pétalos es la presencia de distintos colores y tonalidades. Esta característica, junto con la presencia de fragancia y en algunos casos la forma, tiene una clara función de atracción de animales polinizadores, para asegurarse un transporte de polen suficiente entre flores para perpetuar la especie.

El color de los pétalos resulta de la presencia de pigmentos. Son típicos los pigmentos carotenoides presentes en los cromoplastos, que proporcionan tonalidades que oscilan del rojo al amarillo pasando por el anaranjado. También pueden haber presentes en los pétalos *betalinas* como las *betacianinas* (rojo-azul) o las *betaxantinas* (amarillo), o *antocianinas* como las *cianidinas*, que presentan un rango de color que oscila entre el rojo y el azul pasando por el morado, o la *pelargonidina* (rojo), *delfinidina* (azul) o los *flavonoles* (amarillos). Aparte de estos pigmentos coloreados, muchas flores presentan pétalos de color blanco. Esto es debido al fenómeno de reflexión total de la luz que se da en su superficie.

3.3.2. Anatomía de androceo y gineceo

El androceo es el aparato reproductor masculino. Está formado por las anteras y el filamento que las sostiene (Figura 3.6). El filamento suele variar mucho en longitud dependiendo de la especie, desde ser varias veces más largo que la antera, hasta ser prácticamente inexistente. La antera es el receptáculo donde se generan las células de la línea germinal masculina. Estas células sufrirán meiosis, y darán lugar al microsporocito (la *microspora*). La microspora se transformará

en el microgametofito (el grano de *polen*), el cual a su vez finalmente generará y albergará en su seno los gametos masculinos, las *espermátidas*.

El gineceo (Figura 3.6) es el aparato reproductor femenino. Está formado por un número variable según la especie de hojas carpelares (*carpelos*) que se cohesionan para formar una estructura en forma de botella que se denomina *pistilo*. Externamente, en el pistilo se pueden distinguir tres partes: el *estigma*, la parte superior, donde se depositará el polen durante la polinización, el *estilo*, un cuello más o menos largo que conecta el estigma con el resto del pistilo, y el *ovario*, la parte baja de la botella, donde se dará la formación del gameto femenino (megagametogénesis), la fecundación y el desarrollo del embrión (embriogénesis) y la semilla. Dada la estrechísima relación entre la anatomía de androceo y gineceo con estos procesos de desarrollo, se ha considerado oportuno no avanzar en la anatomía más allá de lo visto en esta sección, y profundizar en los detalles anatómicos de estos verticilos posteriormente, en los temas dedicados a la formación de gametos masculinos (tema 7) y femeninos (tema 8), y a la fecundación y embriogénesis (tema 11).

3.4. Sexualidad y tipos florales

La reproducción sexual de las plantas superiores, al igual que la de los animales, se caracteriza por el *dimorfismo sexual*. Es decir, por la presencia de sexos diferenciados, el masculino y el femenino. Pero a diferencia de los animales, en la mayoría de las plantas las diferencias ligadas al sexo no se manifiestan en la morfología externa de todo el individuo, sino tan solo de una parte de él, la flor. Así, hay distintos tipos florales según sea la flor masculina, femenina, hermafrodita o neutra. Otra diferencia con los animales es que los distintos tipos sexuales pueden convivir en el mismo individuo. Estas dos características son las que nos van a servir de base para ver los distintos tipos florales que podemos encontrar en las plantas. Pueden haber distintos tipos florales en función de qué tipo de órganos sexuales (los típicos masculinos o los típicos femeninos) estén presentes en una flor. Asimismo, pueden haber también distintos tipos florales en función de cómo se distribuyan las flores de los distintos sexos en uno o varios individuos. A continuación veremos las tipologías que cada uno de estos dos criterios nos proporciona.

Según la presencia de los órganos sexuales en las flores, podemos distinguir:

- **Flores *hermafroditas, bisexuales, monoclinas* o *perfectas*.** Son aquellas que cuentan con androceo y gineceo sobre el mismo eje floral (Figura 3.8). Este suele ser el tipo floral más frecuente en angiospermas, estando presente en muchas de las flores que nos rodean en nuestro entorno rural o urbano más cercano. Por ejemplo, las de solanáceas como el tomate (*Solanum lycopersicum*), pimiento (*Capsicum annuum*) o berenjena (*Solanum melongena*, Figura 3.9).

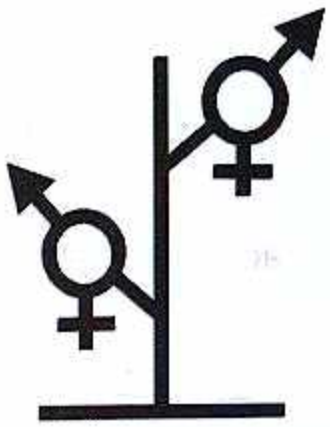


Figura 3.8:
Flor hermafrodita.
Imagen de Seguí Simarro.

Figura 3.9: Flor hermafrodita de berenjena (*Solanum melongena*).
Imagen de Alain Gilfort, en Wikimedia Commons
(http://commons.wikimedia.org),
bajo licencia Free Art License (http://artlibre.org).

- **Flores unisexuales, diclinas o imperfectas.** Portan solo uno de los órganos sexuales, el masculino o el femenino, pero nunca ambos (Figura 3.10). Si portan solo gineceo se denominan *pistiladas*. Si portan solo androceo se denominan *estaminadas*. Por ejemplo, las del género *Cucurbita*, como el calabacín *(Cucurbita pepo*, Figura 3.11).

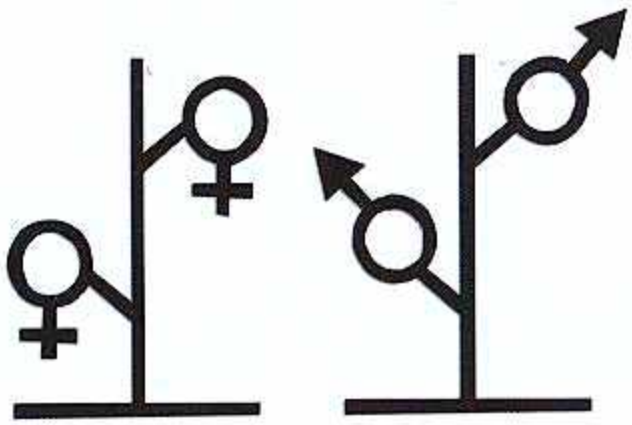


Figura 3.10: Flores unisexuales masculinas y femeninas.
Imagen de Seguí Simarro.

- **Flores *neutras*.** la flor no presenta verticilos reproductivos, sólo tiene perianto. Suelen encontrarse en la periferia de las inflorescencias. Es el caso de la hortensia (*Hydrangea*), y las flores de los capítulos de muchas compuestas como el girasol (*Helianthus annuus*, Figura 3.12A) o la margarita (*Bellis perennis*, Figura 3.12B). En estas especies, una flor neutra, compuesta únicamente por cáliz y corola rodea la inflorescencia en capítulo que se desarrolla en su interior con la presencia de cientos de flores diminutas.

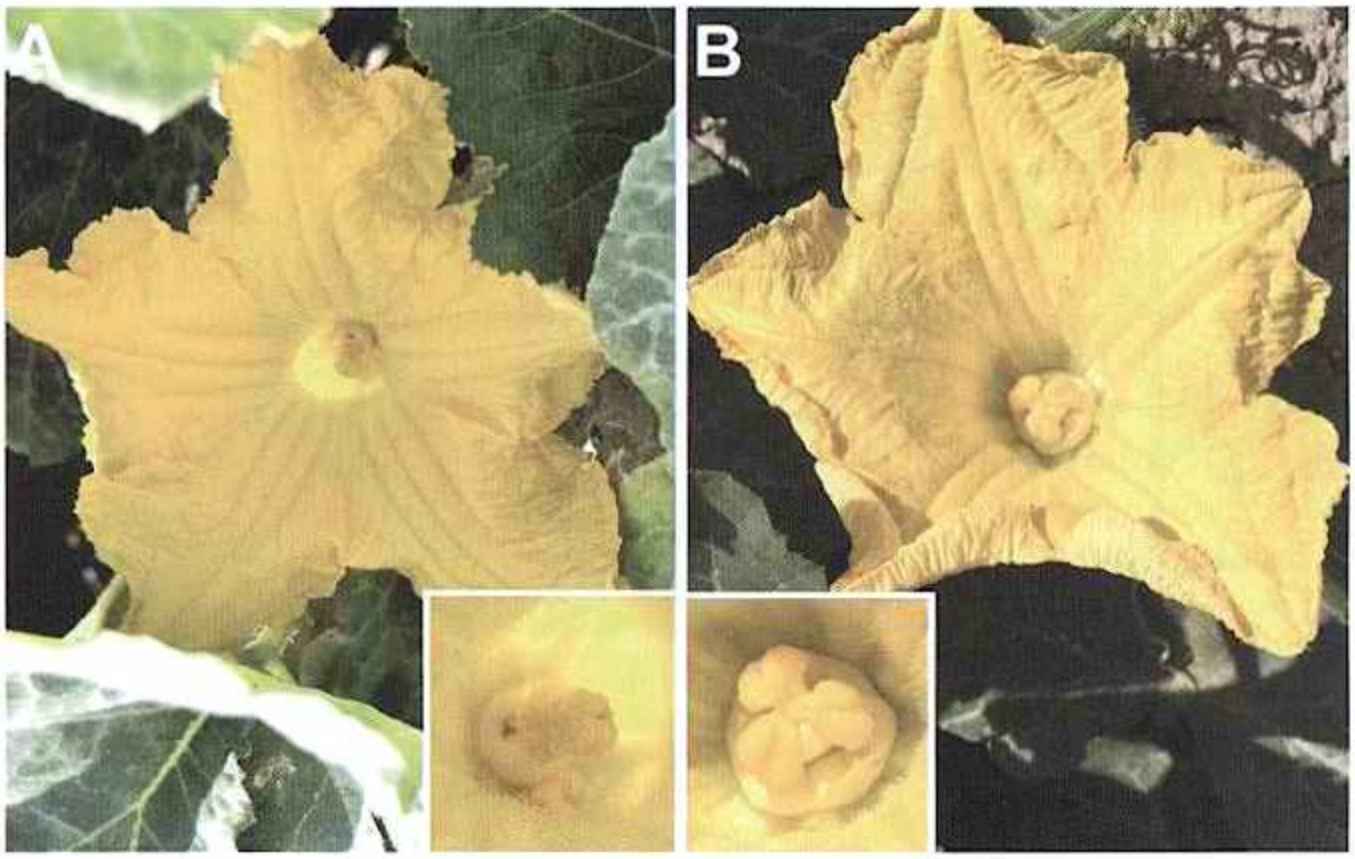


Figura 3.11: Flores femenina (A) y masculina (B) de calabacín (*Cucurbita pepo*). Nótese en los recuadros la diferencia entre el gineceo y el androceo.
Imágenes de Seguí Simarro.

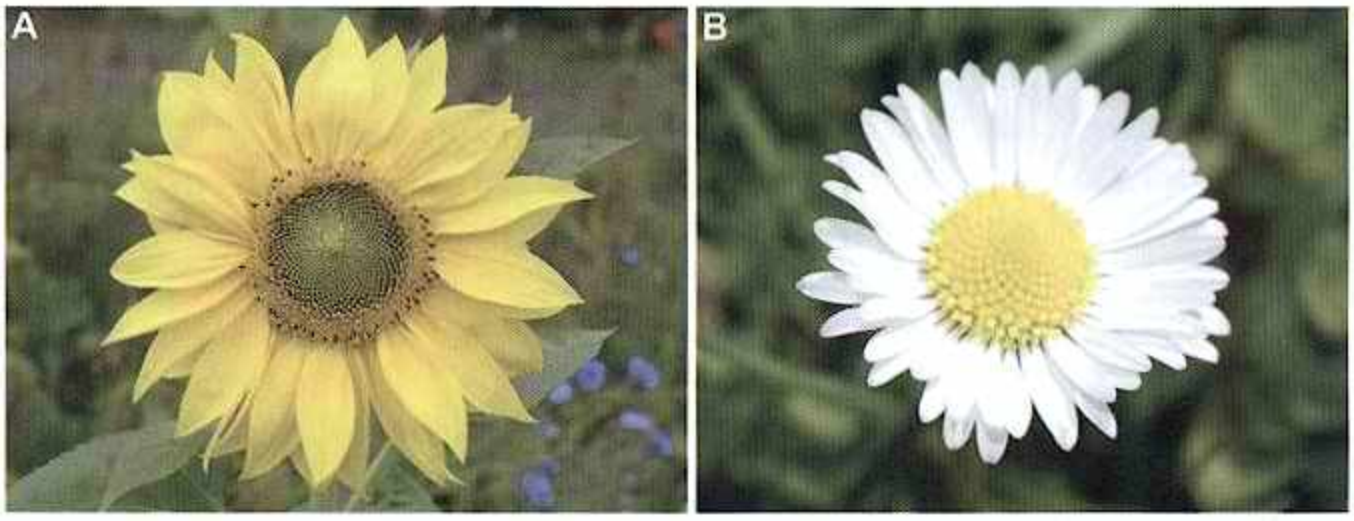


Figura 3.12: Flores neutras de la inflorescencia en capítulo del girasol (A, *Helianthus annuus*) o la margarita (B, *Bellis perennis*).
Imágenes de Luke-sz (A) y Mac Pale (B) en Stock.xchng (www.sxc.hu) bajo licencia sxu.

Según cómo se distribuyan las flores de los distintos sexos en los individuos de una población, las plantas (que no las flores) pueden ser:

- Monoicas: Son aquellas especies en las que solo hay un único tipo de plantas. Es decir, tanto las flores masculinas como las femeninas están presentes en el mismo pie (Figura 3.13). El ejemplo más típico de la monoecia es el maíz (*Zea mays*, - Figura 3.14). En maíz, la inflorescencia terminal del ápice de la planta únicamente presenta flores de sexo

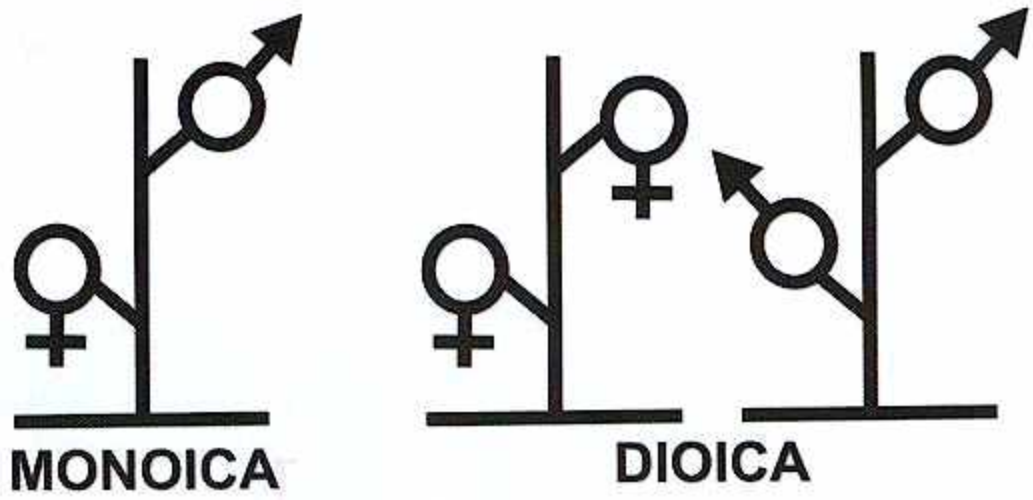


Figura 3.13: Individuos monoicos y dioicos.
Imagen de Seguí Simarro.

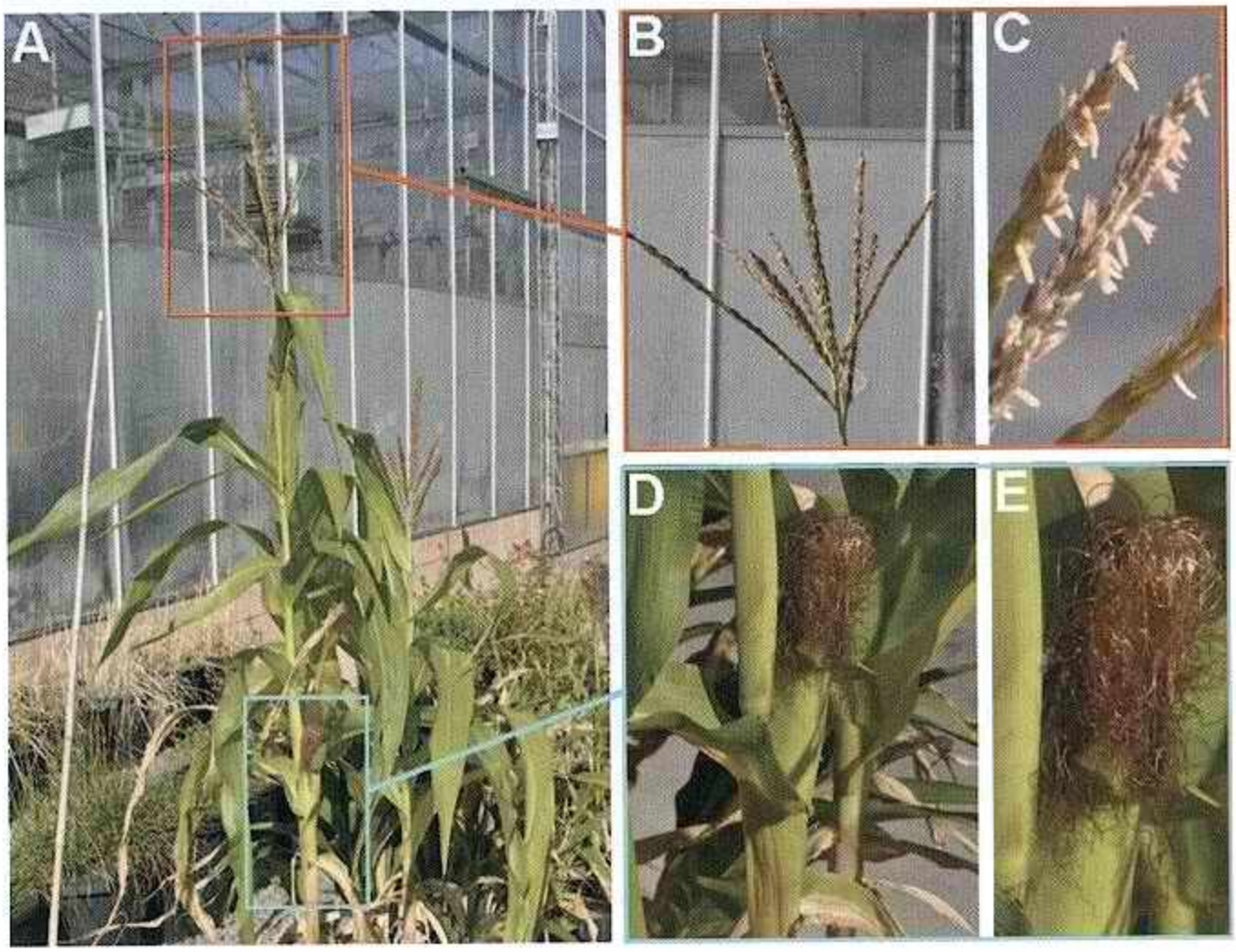


Figura 3.14. Maíz. A: Individuo monoico. B: Inflorescencia apical masculina. C: Detalle de la inflorescencia masculina, en la que se ven las anteras colgando de las flores. D: Inflorescencia femenina. E: Detalle de los largos estilos que sobresalen de la mazorca formando barbas.
Imágenes de Seguí Simarro.

masculino, mientras que el resto de las inflorescencias de la planta, situadas en las axilas de las hojas a lo largo del tallo, son femeninas. Dentro de cada una de ellas, cada flor al fecundarse dará lugar a un grano de maíz, y todos juntos darán lugar a las mazorcas. Los "pelos" largos que se ven emerger de la mazorca son los estilos, - extremadamente largos, de cada una de las flores individuales.

- **Dioicas:** Son aquellas especies en las que hay dos tipos diferenciados de plantas, según el tipo de flor que porten. Es decir, habrán dos clases separadas de individuos: unos exclusivamente masculinos y otros exclusivamente femeninos (Figura 3.13). Es el caso por ejemplo del sauce, la palmera, la datilera o la papaya (Figura 3.15).

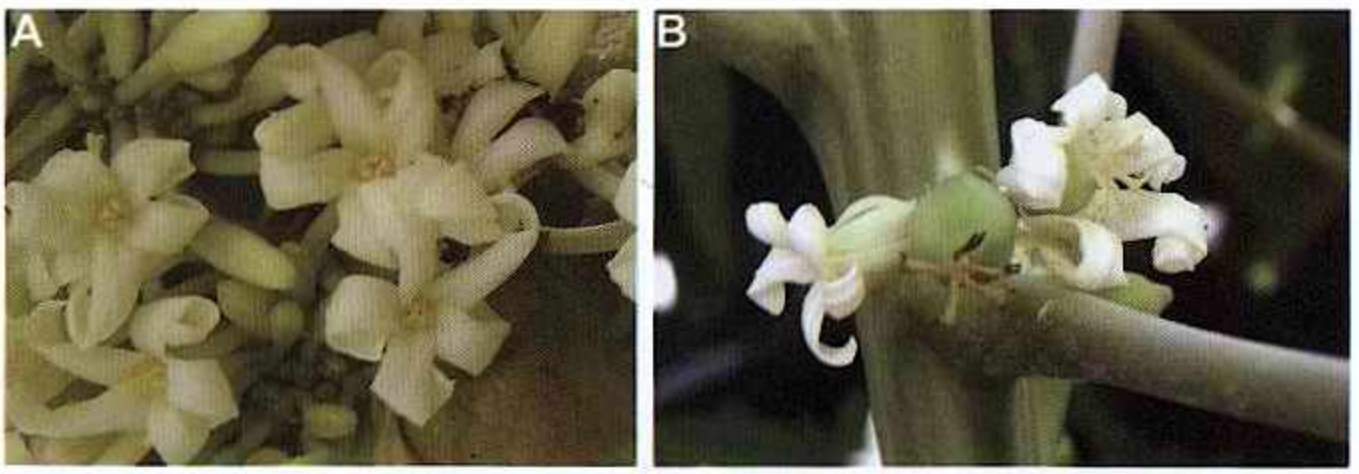


Figura 3.15: Individuos masculino (A) y femeninos (B) de papaya (*Carica papaya*). Nótese la diferente morfología de los tipos florales de cada individuo.
Imágenes de Scott Zona en Flickr.com, bajo licencia Creative Commons Attribution.

En base a los tipos de flores y de individuos vistos, la combinación de ambos en la naturaleza da lugar a los siguientes tipos de plantas:

- **Diclina monoica:** la misma planta tiene flores unisexuales masculinas y femeninas. Por ejemplo, el maíz (Figura 3.14).
- **Diclina dioica:** cuando la planta presenta solo flores masculinas que se encuentran sobre un individuo (masculino) y flores femeninas sobre otro individuo (femenino por tanto). Por ejemplo, la papaya (*Carica papaya*, Figura 3.15).
- **Monoclina monoica:** tiene solamente flores hermafroditas. Por ejemplo, el tomate.
- **Polígamas:** presentan en un mismo individuo flores hermafroditas y además flores unisexuales, bien masculinas o bien femeninas. Por tanto, dentro de las polígamas se pueden dar distintas combinaciones (Figura 3.16):
- **Andromonoicas:** flores perfectas (hermafroditas) y masculinas en el mismo pie (*Celtis tala*, umbelíferas).
- **Ginomonoicas:** flores perfectas y femeninas en el mismo pie (Compuestas, liguladas femeninas, y tubulosas hermafroditas: por ej.: *Calea uniflora*).
- **Androdioicas:** pies con flores perfectas y pies con flores masculinas (*Polygonum*).

- **Ginodioicas:** pies con flores hermafroditas y pies con flores femeninas (*Mentha*).
- **Trioicas:** Pies con flores hermafroditas, pies con flores femeninas, y pies con flores masculinas (*Fraxinus*, fresno).

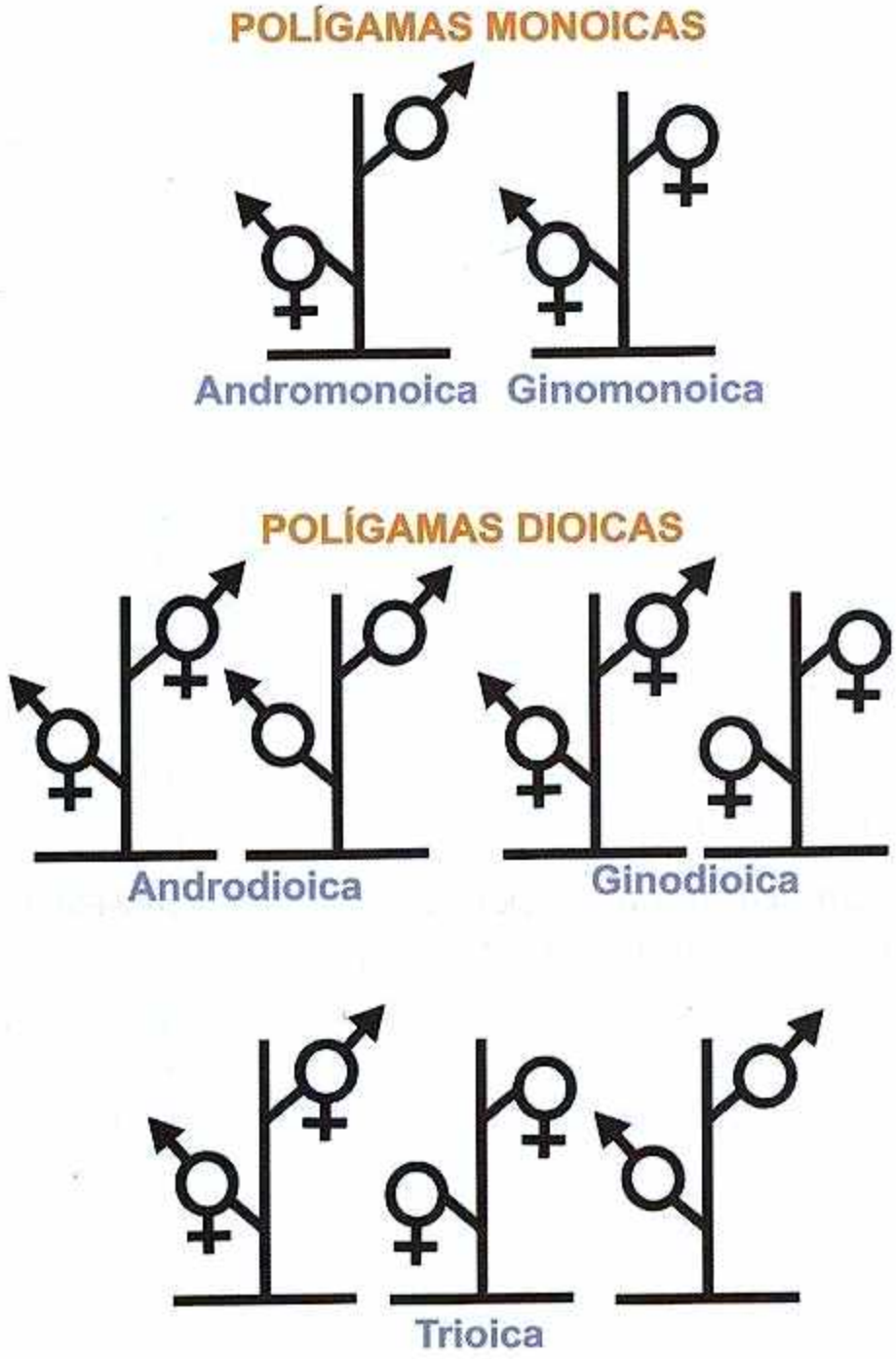


Figura 3.16: Esquema de individuos polígamos, tanto monoicos como dioicos o trioicos.
Imágen de Seguí Simarro.

3.5. Control genético de la sexualidad

Se sabe que el que una planta desarrolle flores masculinas, o femeninas, o hermafroditas, es decir, la determinación del sexo en plantas, es un carácter que está controlado genéticamente. Por ejemplo, el hecho de que una planta sea monoica viene controlada por *genes de determinación sexual*. Estos genes, y por tanto los mecanismos que controlan pueden ser distintos de una planta a otra.

Por ejemplo, en el caso del maíz, una especie en la que el control genético de la determinación sexual es bien conocido, hay dos genes involucrados, los *TASSELSEED1* y *2* (*Ts1* y *Ts2*). Los mutantes *ts1* y *ts2* se caracterizan por una ramificación anormal de sus inflorescencias, tanto la masculina como la femenina, además de una feminización de la inflorescencia masculina, la terminal, que aparece pistilada, y no estaminada, como sería lo normal. La segregación en una población de los alelos *Ts* y *ts* (mutantes) conduciría a una población ginodioica, en la que coexistirían individuos hermafroditas e individuos exclusivamente masculinos. No se ha descrito lo contrario (la existencia de individuos con fenotipos solo masculinos además o en lugar de los femeninos). Se conoce otra mutación (en este caso dominante) que afecta a la determinación del sexo, *ts5*. Esta mutación produce en la inflorescencia terminal un gradiente de flores que va desde pistiladas a estaminadas. Otras mutaciones en maíz, como *ts4* y *ts6*, causan alteraciones en el desarrollo floral pero no afectan específicamente a la determinación sexual.

Otro ejemplo sería el melón, donde la sexualidad viene controlada por el gen *a*, implicado en la ruta de biosíntesis del etileno. La presencia de alelos salvajes de este gen, no mutados, determina la monoecia de la planta. La presencia de alelos mutados en homozigosis determina la andromonoecia. En heterozigosis, la monoecia es dominante sobre la andromonoecia.

En algunas plantas dioicas, la determinación sexual puede venir controlada por la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos. Estos cromosomas se caracterizan por ser diferentes (por ejemplo, los X e Y en hembras y machos, respectivamente, de animales), y producen por tanto, dos tipos diferentes de gametos en cuanto a la presencia de uno u otro cromosoma sexual. Por ejemplo, en *Silene*, los machos son XY y las hembras XX. En *Silene*, el cromosoma Y juega un papel clave en la supresión femenina y/o activación masculina. En cambio, en el género *Fragaria* el sexo heterogamético es hembra. Además, como un caso inusual de determinación del sexo, las especies diploides son hermafroditas y las poliploides silvestres son dioicas.

En otras especies dioicas, la determinación sexual puede venir controlada por la presencia de cromosomas sexuales homomórficos. Así, en espárrago (*Asparagus officinalis*), el sexo viene determinado por el par de cromosomas homomórficos L5, al cual se han asociado los factores implicados en la determinación sexual. La expresión génica durante el desarrollo de las flores masculinas y femeninas es muy parecida, al igual que su morfología. Al parecer, la diferenciación sexual vendría más tarde, durante la etapa de la meiosis, en la que se detectan diferentes perfiles de expresión génica y de niveles hormonales (auxinas fundamentalmente) entre flores femeninas y masculinas.

Existen además otros sistemas de determinación sexual en dioicas más complejos y menos frecuentes. Por ejemplo, el sistema XY1Y2 del género Rumex. En este género, las hembras son XX y los individuos heterogaméticos XY1Y2 son machos. Sin embargo, las plantas diploides XXY y XXY1Y2 son hembras fértiles. Como vemos, aquí el cromosoma Y no tiene una acción directa sobre el

sexo. De hecho, aparte de un pequeño segmento activo, el Y se considera casi totalmente inerte. En poliploides de este mismo género, se da un control de la sexualidad basado en un balance entre cromosomas X y autosomas, de manera que si la relación X/autosomas es mayor o igual a 1, aparecen hembras. Si es menor o igual a 0,5, aparecen machos. Y si está entre 0,5 y 1, aparecen intersexos (machos/hembras parciales, o hermafroditas). Hay dos especies del género *Humulus* que tienen un sistema similar al de *Rumex*. Son *H. lupulus* (lúpulo) y *H. japonicus*.

3.6. Control hormonal de la sexualidad

En paralelo al control genético de la sexualidad visto en el punto 3.5, la determinación del sexo en algunas especies (especies dioicas o diclinas monoicas) puede ser regulada por el ser humano mediante la aplicación exógena de reguladores de crecimiento (fitohormonas). Por ejemplo, pulverizando auxinas sobre plantas masculinas de marihuana (*Cannabis sativa,* dioica), se induce la aparición de flores femeninas. En algunas variedades diclinas monoicas de pepino, en las que primero aparecen las flores masculinas y después las femeninas, si aplicamos auxinas en las hojas de plantas jóvenes, se acelera la transición hacia la producción de flores femeninas. Algo parecido sucede si tratamos con etileno. En cambio, si aplicamos giberelinas, aumenta la producción de flores masculinas. En otras variedades de pepino, en este caso androdioicas, en las que existen individuos hermafroditas y otros solo con flores masculinas, los niveles endógenos de auxinas son más bajos en los individuos masculinos que en los hermafroditas. En variedades de pepino ginodioicas, en las que existen individuos hermafroditas y otros únicamente con flores femeninas, los niveles endógenos de giberelinas son más bajos en los individuos femeninos que en los hermafroditas. Y si a los individuos femeninos se les aplican giberelinas, aparecen también flores masculinas.

A la vista de todo esto, parece ser que las auxinas y el etileno favorecen la determinación de sexo femenino, mientras que las giberelinas parecen favorecer la determinación de sexo masculino.

3.7. Inflorescencias

Una inflorescencia es un vástago o sistema de vástagos portadores de flores. Desde el punto de vista ecológico, la reunión de flores en conjuntos mayores (inflorescencias) tiene una clara ventaja como atractivo para la polinización, pues la mayoría de las flores son pequeñas. Pero cuando se reúnen en un espacio concreto, y a menudo rodeadas de brácteas coloreadas, o incluso perianto, se vuelven más llamativas y atraen así mejor a los agentes polinizadores bióticos. Así, tenemos casos como el de los capítulos del girasol o la margarita (Figuras 3.12A y B), o las espigas de trigo o maíz, en los que la inflorescencia se comporta como si fuera una flor aunque sea en realidad un conjunto de flores pequeñas, en ocasiones diminutas.

La inflorescencia suele estar delimitada, con mayor o menor claridad, respecto al área vegetativa de la planta. Se considera que una inflorescencia comienza justo a partir del punto de inserción del último nomófilo. Desde el punto de vista estructural, las inflorescencias plurifloras están constituídas por las flores, con o sin pedicelo, el *raquis* o receptáculo común, el *pedúnculo* y las *brácteas* (Figuras 3.17 y 3.18).

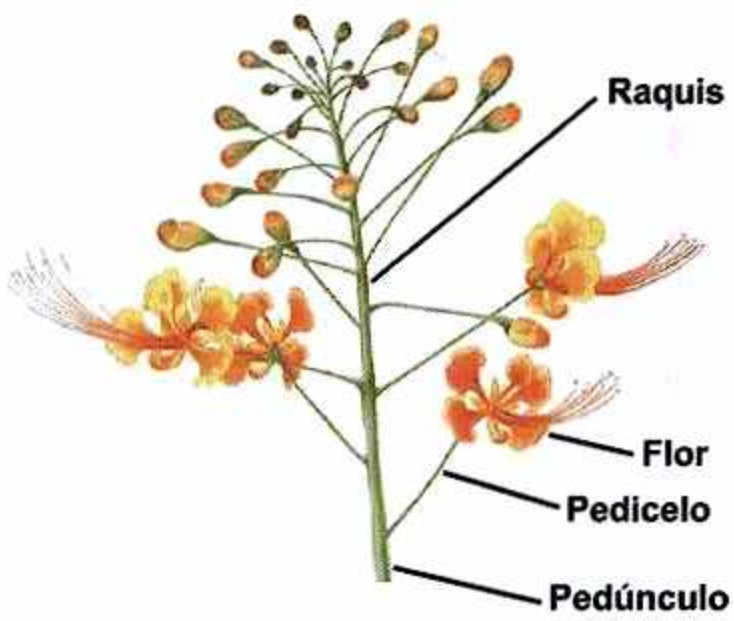


Figura 3.17: Inflorescencia de *Caesalpinia pulcherrima*.
Imagen de dominio público, en Wikimedia Commons.
(http://commons.wikimedia.org), modificada de Blanco,
FM. Flora de Filipinas, 1880.

El pedicelo es el elemento que sostiene la flor. En algunas flores, denominadas *sentadas* o *sésiles*, el pedicelo está ausente. En las que sí lo tienen, éste puede tener una longitud variable, en función de la especie. El raquis o eje es la parte alargada del tallo que porta las ramas de la inflorescencia. Es en el raquis donde se insertan las brácteas, en cuyas axilas nacen las flores, o bien las inflorescencias secundarias. Puede ser sencillo como en el gladiolo (*Gladiolus spp.*) o ramificado como en la vid (*Vitis vinifera*). En ocasiones, el raquis es corto en longitud pero muy ensanchado; en forma de plato, y se le denomina *receptáculo común* o *clinanto*. Cuando el eje emerge de una base arrosetada, como en *Arabidopsis thaliana*, o de un órgano subterráneo, al eje se le llama *escapo*. El pedúnculo es el punto de unión del raquis con el tallo.

Las brácteas o hipsófilos (Figura 3.18) son hojas modificadas situadas en la proximidad de las flores, distintas al resto de hojas de la planta por su forma, color (a veces), consistencia o tamaño. Las brácteas nacen sobre el raquis o acompañan a las flores, y suelen ser menores en tamaño que los nomófilos. A menudo son coloreadas, aunque pueden ser también verdes. Sin embargo, a

pesar de ser verdes en estos casos, su función principal no es la fotosíntesis, sino proteger las flores o inflorescencias.

Figura 3.18: Inflorescencia de Bougainvillea spectabilis.
Imagen de Forest & Kim Starr, en Wikimedia Commons
(http://commons.wikimedia.org),
bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported.

Algunas veces las inflorescencias carecen de brácteas, como en el caso de las crucíferas. Otras veces presentan *bracteolas* o *profilos*. La bracteola o profilo es la primera bráctea de una rama axilar. Está dispuesta del lado opuesto a la hoja normal. En las monocotiledóneas es bicarenada y por el dorso, cóncavo, se adosa el eje que lleva la rama. En algunos casos reciben nombres especiales, tales como *glumas* y *glumelas* en las poáceas y ciperáceas, o *espata* en las aráceas (Figura 3.24). Cuando las brácteolas son hojas téctrices (de recubrimiento) de yemas florales, se les denomina también *brácteas madre*. Son brácteas madre, por ejemplo, las glumas o la espata. En otros casos las brácteas forman órganos protectores de las flores (involucros), como la cúpula de *Quercus* y el *erizo* del castaño. Las monocotiledoneas suelen llevar un profilo adosado en posición dorsal, y las dicotiledoneas suelen contar con dos profilos, al mismo nivel y en posición opuesta.

3.8. Tipos de inflorescencias

Las inflorescencias son casos particulares de ramificaciones, que en algunas especies pueden llegar a ser muy complejas y presentar gran variedad de formas. Esto hace que se haya desarrollado para ellas una nomenclatura mucho más

rica (y también más compleja) que la de las ramificaciones vegetativas. Esta complejidad y diversidad, que se mantiene invariable para una misma especie, hacen de este un carácter ideal para clasificaciones botánicas y estudios sistemáticos. A continuación veremos algunos de los tipos de inflorescencias más representativos.

Hay autores que distinguen entre inflorescencias *unifloras* y *plurifloras*. Cuando las flores aparecen de forma individual tanto a partir del ápice terminal (como en el tulipán) como de las yemas axilares (como en la camelia), algunos autores consideran que se trata también de una inflorescencia, en este caso *uniflora*. Hay quien por el contrario cree que una sola flor, atendiendo a la definición de inflorescencia, no se debería considerar inflorescencia en ningún caso. Más allá del debate terminológico, lo cierto es que aquellas que presentan los rasgos de complejidad, diversidad e invariabilidad son las plurifloras, que son las que veremos en esta sección.

Según el sentido del crecimiento de la inflorescencia (tomando como referencia dónde se sitúan las primeras flores que entran en antesis), las inflorescencias pueden ser *racimosas* o *cimosas* (Figura 3.19). Las inflorescencias racimosas (también llamadas racemosas o abiertas) presentan una ramificación de tipo *monopodial*. Es decir, todas las inflorescencias derivan de un mismo nivel de ramificación. Las inflorescencias racimosas tienen un crecimiento indefinido, y conforme se va alargando el raquis, van apareciendo más inflorescencias, que por tanto serán más jóvenes. Esto implica que el sentido de la antesis será *acropétalo* o centrípeto. Es decir, las flores de la inflorescencia van entrando en antesis de fuera hacia adentro.

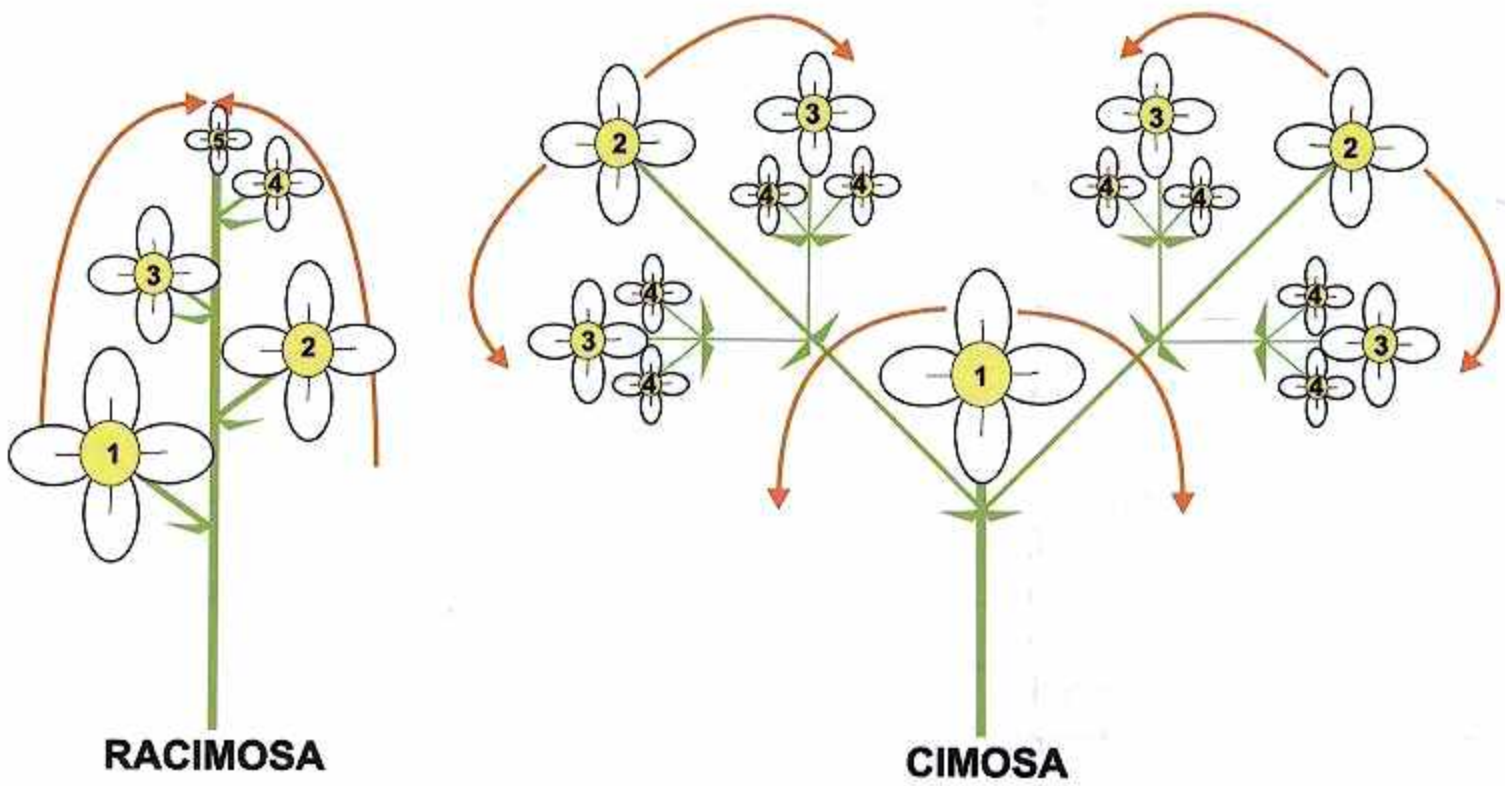


Figura 3.19: Inflorescencias racimosas y cimosas. Las flechas negras y los números indican el sentido de la maduración (antesis) de la flor, siendo la 1 la más vieja y la 5 la más joven. Imágenes de Seguí Simarro.

Por el contrario, las inflorescencias cimosas (también llamadas cerradas) presentan un patrón de ramificación *simpodial*. Este sistema de ramificación se caracteriza por un desarrollo determinado, limitado, del meristemo vegetativo del eje principal, que puede transformarse en floral y dar lugar a una flor terminal, o incluso interrumpir por completo su crecimiento. En paralelo, las ramas laterales continúan creciendo, en ocasiones más que el eje principal. Las yemas axilares, generalmente las superiores, hacen las veces del meristemo apical y forman nuevos brotes laterales, que a su vez desarrollan nuevas yemas axilares y nuevos brotes, con lo que la ramificación se vuelve más compleja, habiendo varios niveles jerarquizados. Esto hace que las inflorescencias cimosas tengan un sentido de la antesis *basípeto* o centrífugo. Es decir, que las flores de la inflorescencia entran en antesis de dentro hacia fuera, siendo la primera en entrar la flor terminal del ápice del eje principal. En algunos casos pueden darse inflorescencias mixtas en las que hay presentes partes racimosas y cimosas. En otras ocasiones, de forma excepcional, el ápice de la inflorescencia, una vez determinado y transformado a floral, puede reanudar el crecimiento vegetativo, volviendo a formar nomofilos, como ocurre con la piña (*Ananas comosus*, Figura 3.20). Este fenómeno recibe el nombre de *proliferación*.

Figura 3.20: Crecimiento vegetativo de la inflorescencia terminal de la piña.
Imagen de dominio público, en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

Según el grado de ramificación (y por tanto de complejidad) de la inflorescencia, éstas pueden ser *simples* o *compuestas*. Las inflorescencias simples son las que constan solo de un eje o receptáculo común en el que se encuentran las flores, todas al mismo y único nivel. En las compuestas, del eje primario nacerían otras ramificaciones que portarían las flores, o bien darían lugar a un tercer nivel de ramificación. Y serían también posibles niveles adicionales de ramificación, de tal manera que en el último nivel se encontrarían las flores, y la estructura de ese último nivel se vería reflejada, a mayor escala, en los niveles superiores de la ramificación.

3.8.1. Inflorescencias simples

Dentro de las inflorescencias simples, podemos encontrar el *racimo*, la *espiga*, la *espiguilla* o *espícula*, el *amento*, el *espádice*, el *capítulo*, la *umbela*, el *corimbo* y el *estróbilo*.

El **racimo** (Figura 3.21) está constituido por un eje principal, el raquis, con brácteas en cuya axila se encuentran flores con pedicelo, que puede tener una longitud variable. Es el caso de *Caesalpinia pulcherrima* (Figura 3.17), o de *Utricularia foliosa*.

La **espiga** (Figura 3.22) es semejante al racimo, pero se diferencia de él en que las flores que presenta son sésiles o sentadas (sin pedicelo). Por ejemplo, en *Glandularia peruviana*; *Sacoila, o el género Orchidaceae*.

La **espícula** o **espiguilla** presenta en la base dos brácteas denominadas *glumas*. Luego siguen los *antecios*. Cada antecio está constituido por la *lema* o bráctea tectriz y la *pálea, glumela o glumilla superior*. Se trata de un profilo, procedente de la unión de los sépalos, que encierra la flor. La flor consta de *lodículas* o *glumélulas*, que derivan de los pétalos y que llegado el momento, provocan la apertura de la flor. En su interior se encuentran el androceo y el gineceo. Esta es la inflorescencia típica de las gramíneas (poáceas).

El **amento** es un tipo especial de espiga, típico de árboles, en el que el eje principal es blando y por tanto colgante. La inflorescencia crecerá por tanto en sentido descendente. Ejemplos: sauces (*Salix*), nogal o alcornoque (*Quercus*).

El **espádice** (Figura 3.23) es asimilable a una espiga con el raquis muy engrosado, en el que las flores, diminutas, apenas son perceptibles a simple vista. La bráctea (denominada *espata*) que acompaña la inflorescencia está muy modificada, adoptando en ocasiones formas, tamaños y colores muy llamativos. Ejemplos: *Zantedeschia aethiopica* (cala), *Anthurium spp.*, o *Dracunculus vulgaris* (Figura 3.24).

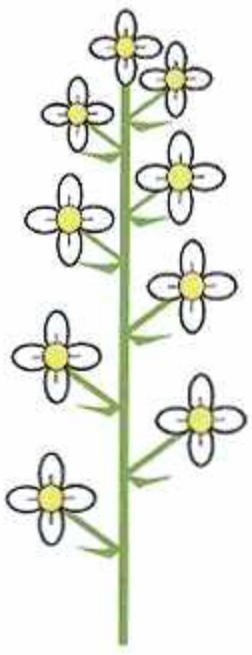


Figura 3.21: Racimo

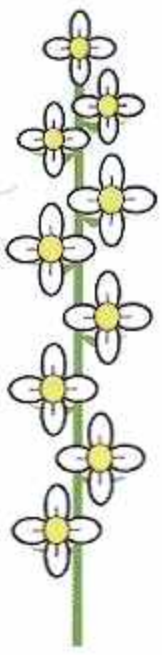


Figura 3.22: Espiga

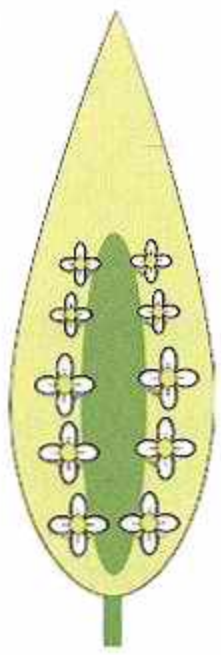


Figura 3.23: Espádice

Imágenes de Seguí Simarro.

Figura 3.24: *Dracunculus vulgaris.*
Imagen de Pleinair, en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org), bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported.

El **capítulo** (Figura 3.25) sería una forma especial de espádice, pero con el eje muy corto y dilatado, formando un receptáculo común. En su base se formaría un involucro compuesto por numerosas brácteas o hipsófilos. La bráctea tectriz de cada flor recibe el nombre de *pálea*. Ejemplos: en la familia *Compositae*, el girasol (*Helianthus annus*, Figura 3.12A) que presenta un capítulo ligulifloro, o la margarita (*Bellis perennis*, Figura 3.12B), que presenta un capítulo radiado, y algunas asteráceas como la alcachofa (*Cynara scolymus*), que presentan capítulos cinarocéfalos. Cuando el capítulo simula la apariencia de una sola flor, como en el girasol o la margarita, se le denomina *pseudanto*.

La **umbela** (Figura 3.26) deriva del racimo. Se caracteriza por presentar entrenudos muy cortos y brácteas en forma de roseta formando un involucro. Todas las flores tienen pedicelos de igual longitud, de forma que todas las flores parecen emerger de un mismo punto. Ejemplos: Liliaceas, *Nothoscordum*, o el género *Allium* (cebolla, ajo).

El **corimbo** (Figura 3.27) es también semejante a un racimo, pero los pedicelos de las flores presentan distintas longitudes, siendo los inferiores más largos y acortándose a medida que se acercan al ápice. De esta manera, los verticilos florales de todas las flores de la inflorescencia quedan a la misma altura, en un mismo plano. Ejemplos: *Spiraea cantoniensis*; *Prunus*; o algunas brasicáceas.

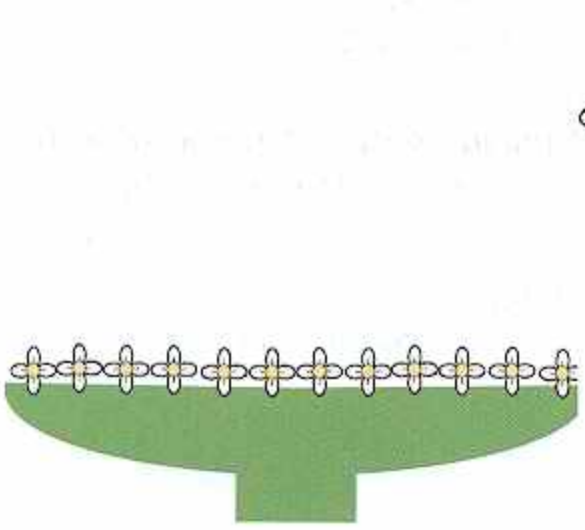


Figura 3.25: Capítulo

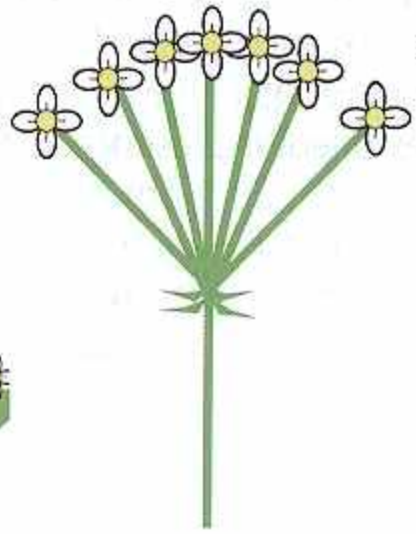


Figura 3.26: Umbela

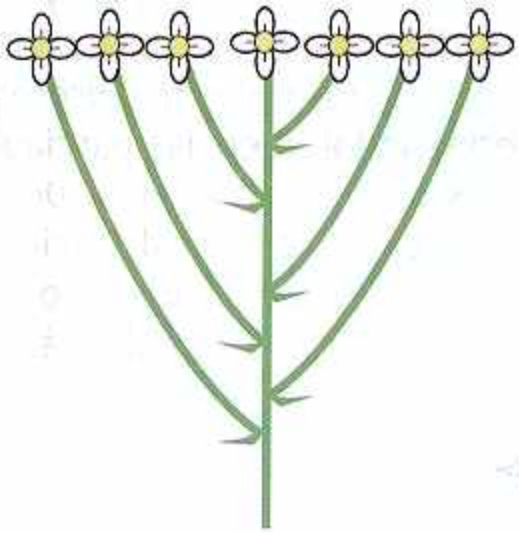


Figura 3.27: Corimbo

Imágenes de Seguí Simarro.

El **estróbilo** o **cono** (Figura 3.28) es la inflorescencia típica de las coníferas. Se trata de una estructura basada en un eje terminal, alrededor del cual se ordenan en disposición helicoidal las brácteas tectrices, gruesas e inicialmente apretadas. En la inflorescencia femenina (conocida como piña en las pinaceas), sobre cada una de las brácteas se disponen una o varias brácteas seminíferas, portadoras del megasporángio. Los conos masculinos son siempre mucho más pequeños que los femeninos, solo poseen un tipo de brácteas (poliníferas), y se agrupan alrededor del final de las ramas.

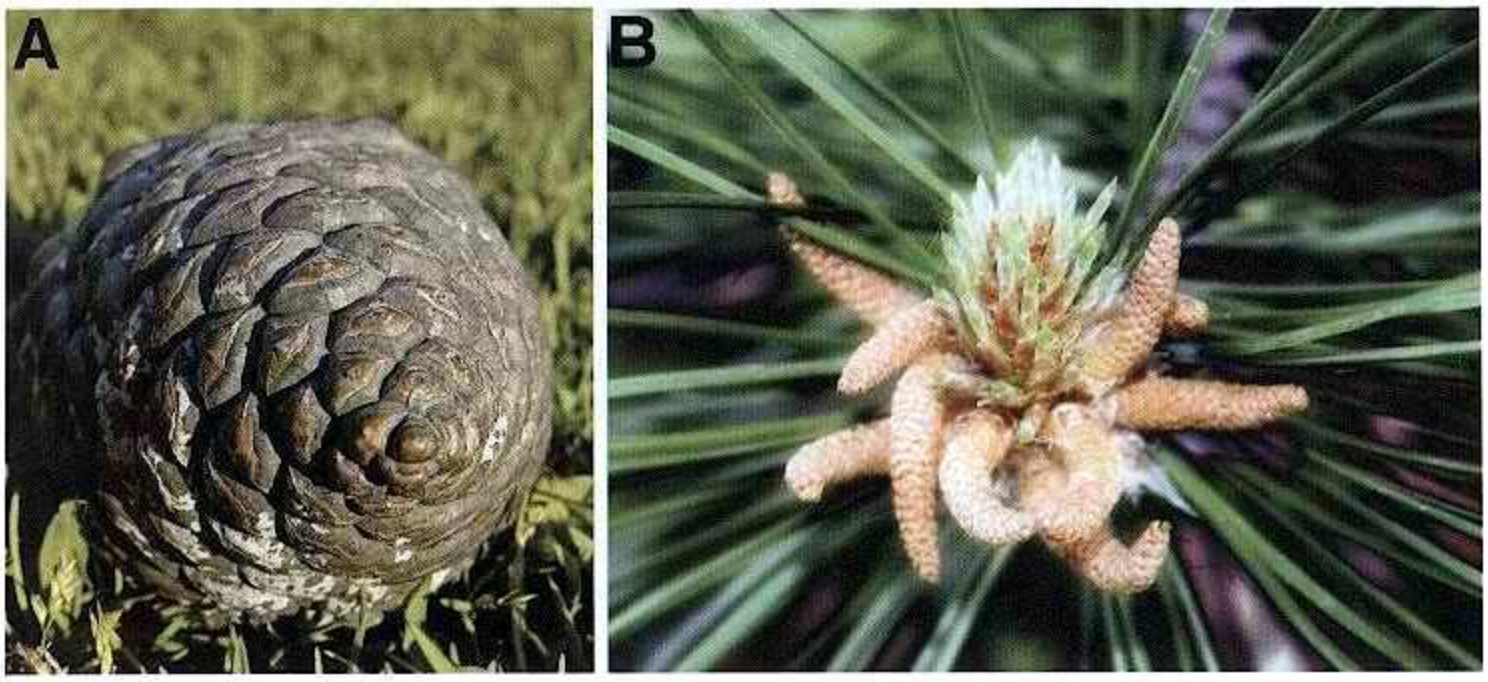


Figura 3.28: Estróbilos. Inflorescencias femenina (A) y masculina (B) de *Pinus*.
Imágenes de Paddy Patterson (A) y Robert Picco (B) en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org), bajo licencia Creative Commons Attribution 2.0 Generic.

3.8.2. Inflorescencias compuestas

Las inflorescencias compuestas son aquellas que están formadas por combinaciones de varias inflorescencias simples a varios niveles. Al igual que las simples, las hay de naturaleza racimoide y cimoide. En las racimoides, monopodiales o racimosas, el eje principal presenta inflorescencias parciales en la axila de las brácteas, en lugar de las flores que presentarían las inflorescencias racimosas simples. A su vez, estas inflorescencias parciales pueden presentar un mayor o menor número de ramas laterales floríferas. Dentro de las racimosas, podemos distinguir los dibotrios y las panículas. Los dibotrios incluyen la umbela **doble** (umbela de umbelas, Figura 3.29), la **espiga doble o compuesta** (una espiga de espigas), propia de gramíneas, o de las umbelíferas o del género *Daucus*, o el **racimo doble o panícula** (Figura 3.30),

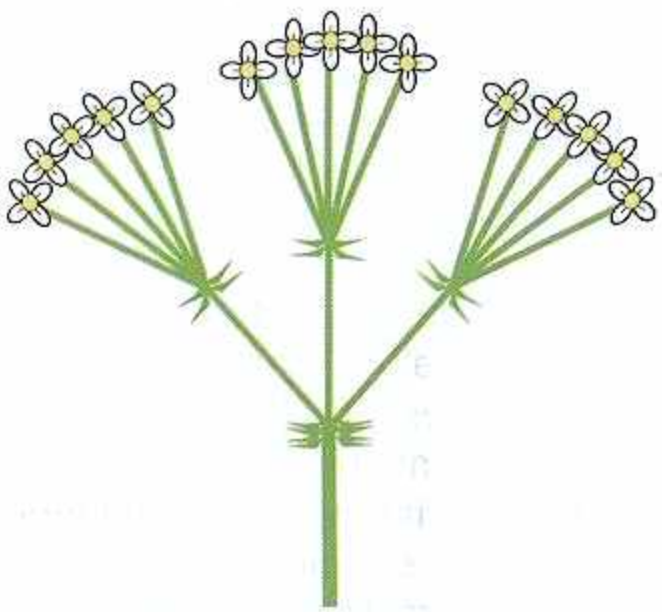


Figura 3.29: Umbela doble

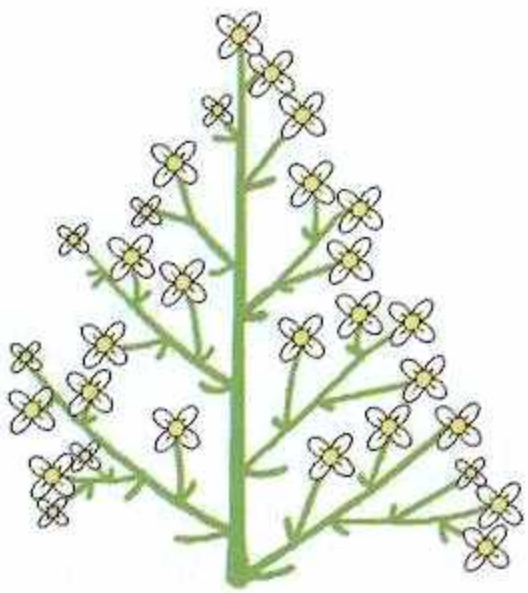


Figura 3.30: Panícula

Imágenes de Seguí Simarro.

que no es sino un racimo de racimos, típico de las leguminosas, del género *Vitis* o de las poáceas.

En las inflorescencias cimoides, cimosas o simpodiales, se desarrollan una o varias inflorescencias parciales en las axilas de los profilos, por debajo de la flor terminal. Dichas inflorescencias pueden ser *monocasios, dicasios*, o *pleiocasios*, según se desarrollen, respectivamente, una, dos o más inflorescencias por debajo de la flor terminal.

En los monocasios, sólo un profilo del nudo es fértil, y de él emergerá la única inflorescencia de siguiente nivel. Según la arquitectura de las ramas de la inflorescencia se pueden distinguir *cimas escorpioides* o *circinadas* (todas las ramas surgen en un mismo lado del eje principal, Figura 3.31) y *cimas helicoides* (las ramas surgen en distintas direcciones con respecto al eje principal, Figura 3.32).

En los dicasios o *cimas biparas* (Figura 3.33), los dos profilos por debajo de la flor terminal son fértiles, y se forman por tanto dos inflorescencias parciales, cada una de las cuales repite el comportamiento del eje terminal. Es el caso de muchas especies del género Caryophyllaceae como el clavel *(Dianthus caryophyllus*), o de los jazmines (género *Jasminum*).

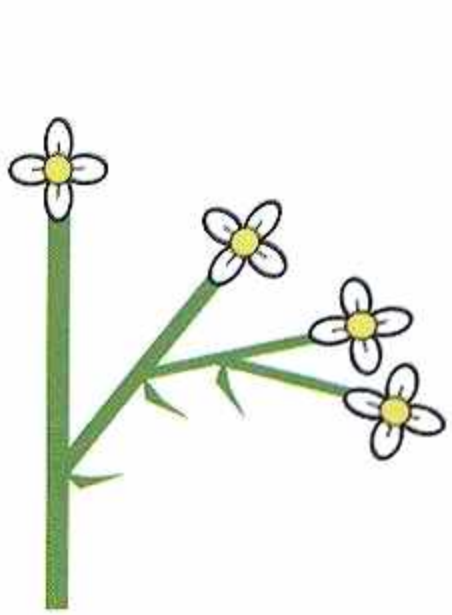


Figura 3.31: Cima escorpioide: drepanio.

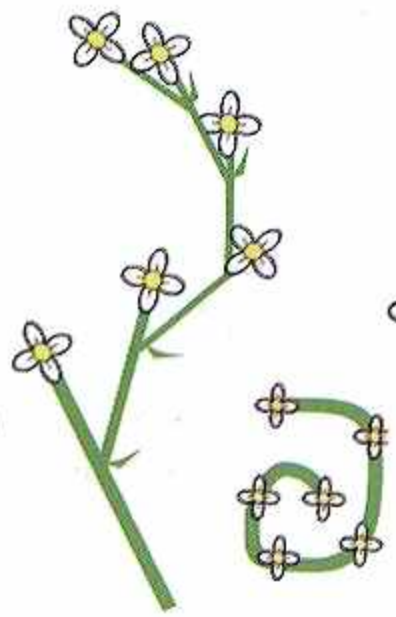


Figura 3.32: Cima helicoide: bóstrix.

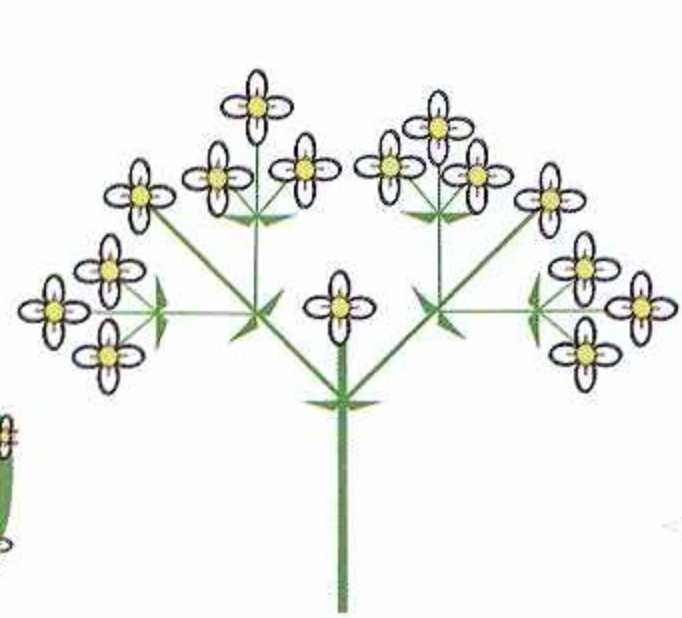


Figura 3.33: Dicasio.

Imágenes de Segui Simarro.

Los pleiocasios (Figura 3.29) presentan tres o más inflorescencias parciales dispuestas en un verticilo por debajo de la inflorescencia terminal. Ejemplos: géneros *Sedum*, *Sempervivum* o *Cornus* (Figura 3.34).

Existen también casos de inflorescencias especiales, que no siguen ningún patrón específico para la ramificación del eje floral. Son muy raras, y se presentan sólo en algunos géneros muy concretos. Un ejemplo muy conocido es el *sicono* (Figura 3.35). El sicono es la inflorescencia típica del género *Ficus* (los higos).

Figura 3.34: *Sedum nussbaumerianum.*
Inflorescencia en pleiocasio.
Imagen de Michael Wolf en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org), bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 Generic.

En esta inflorescencia, el eje floral es carnoso y envolvente, casi cerrado. En el caso de los higos; estas características junto con la acumulación de azúcares hacen que a menudo se confunda esta inflorescencia con un fruto. Las flores son unisexuales pero se presentan en la misma inflorescencia en igual número. Otro ejemplo de inflorescencia especial sería el *ciatio*. En el ciatio, el eje es carnoso; las flores son unisexuales, con un número variable de flores masculinas por debajo de una sola flor femenina central. Se presenta solamente en el género *Euphorbia*, como la Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*, Figura 3.4) o *Euphorbia cyathophora* (Figura 3.36).

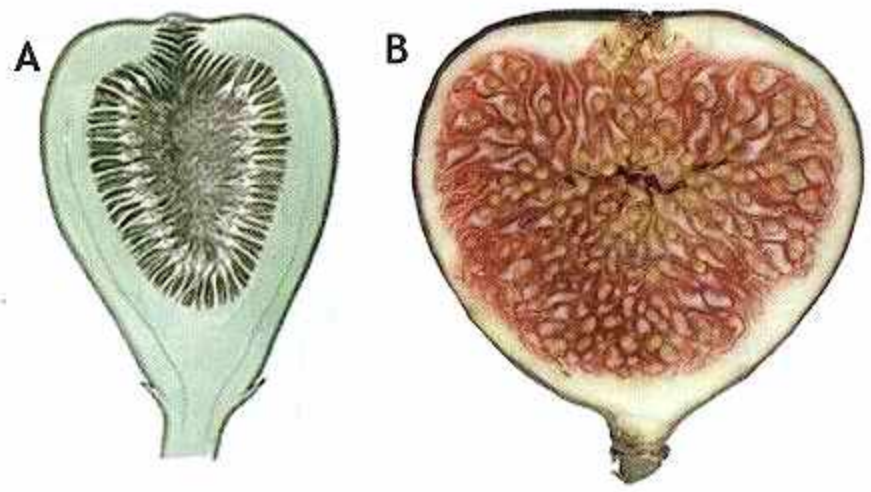


Figura 3.35: Sicono de *Ficus carica* (higuera).
A, inflorescencia joven y B, madura, fructificada.
Imágenes de contenido libre, de dominio público, de Wikimedia Commons.

Figura 3.36: Ciatios de *Euphorbia cyathophora.*
Imagen de Junichiro Aoyama en Flickr.com, bajo licencia Creative Commons Attribution.

3.9. Resumen

Este tema lo hemos dedicado íntegramente al estudio de la flor como estructura central de la reproducción sexual de las plantas superiores. En ella hemos visto que tienen lugar todos los procesos claves para dar lugar a una nueva planta por vía sexual. Hemos visto que las angiospermas presentan una increible variedad en cuanto al tamaño, forma, ubicación, estructura, color e incluso aroma, dado en gran medida por su especialización en uno u otro tipo de polinización. Sin embargo, todas ellas mantienen una cierta uniformidad en cuanto al tipo de órganos que las forman (sépalos, pétalos, estambres y carpelos, y en cuanto a su disposición concéntrica formando verticilos. Los dos vercilos más externos (cáliz y corola) tienen una función eminentemente protectora y de reclamo hacia los polinizadores, mientras que los dos interiores (androceo y gineceo) son los directamente implicados en la producción y desarrollo de los gametos masculino y femenino, respectivamente.

Pueden haber flores de distintos tipos en función de los órganos sexuales que alberguen (de un solo sexo, de ambos o de ninguno de ellos), y pueden haber plantas de distintos tipos en función del o de los sexos que alberguen sus flores. Hemos visto diversos ejemplos de cada uno de ellos. La combinación de estas dos clasificaciones puede dar lugar a muy distintos tipos de plantas, lo cual a su vez tiene importantes implicaciones en cuanto a la sexualidad de cada especie y su mecanismo reproductivo. La sexualidad es un carácter bajo control genético y hormonal, de modo que se puede influír en él si conocemos su mecanismo de control.

Por último, las flores pueden aparecer en la planta de forma aislada, o agrupadas formando inflorescencias. La inflorescencia teiene un papel biológico

relevante, y consta de estructuras bien definidas. Existen muy distintos tipos de inflorescencias en función de cómo se dispongan las flores que la componen. Según el sentido del crecimiento de la inflorescencia, las inflorescencias pueden ser racimosas o cimosas. Según el grado de ramificación (y por tanto de complejidad) de la inflorescencia, éstas pueden ser simples o compuestas. Dentro de las simples existen muchas variantes, cada una con un patrón de disposición floral característico. Las compuestas constan de inflorescencias de las cuales surgen otras inflorescencias, que pueden ser del mismo o de distinto tipo que la inflorescencia que las engloba. Dentro de las compuestas existen también distintas variantes, en este caso según la combinación de inflorescencias simples que presente, y según el patrón de ramificación que siga.

3.10. Información adicional

- Boualem A., Fergany M., Fernández M., Troadec C., Martin A., Morin H., Sari M.A., Collin F., Flowers J.M., Pitrat M., Purugganan M.D., Dogimont C., Bendahmane A. 2008. A conserved mutation in an ethylene biosíntesis enzyme leads to andromonoecy in melons. Science, 321: 836-838.
- Cubero J.I. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal, 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Dellaporta S.E., Calderon-Urrea A. 1993. Sex Determination in Flowering Plants. The Plant Cell, 5:1241-1251.
- Gola G., Negri G., Cappeletti C. 1965. Tratado de Botánica. 2da. edición. Editorial Labor S.A., Barcelona.
- Reproducción sexual - Hipertextos del Área de la Biología (recurso online). http://www.biologia.edu.ar/reproduccion/sexual.htm
- Strassburger E. 1994. Tratado de Botánica. 8ª edición. Omega, Barcelona.

TEMA 4. Inducción de la floración

Una vez vistas las partes y estructuras de la flor y la inflorescencia, en este tema veremos cómo aparecen. Más concretamente, veremos cómo y porqué la planta decide en un momento dado de su ciclo vital que ha de comenzar a florecer. Analizaremos también los distintos factores físicos y químicos, externos a la propia planta, que desencadenan la respuesta de floración. Veremos también qué cambios sufre un meristemo que hasta el momento de la floración era un meristemo vegetativo, encargado del crecimiento de la planta y de la formación tan solo de ramas y hojas, y que a partir de ese momento se transforma para producir tan solo flores e inflorescencias.

4.1. Etapas del ciclo vital de las plantas

Desde el punto de vista del desarrollo del individuo vegetal, podemos distinguir tres etapas en su crecimiento (Figura 4.1): la **etapa vegetativa,** la **etapa reproductiva,** y la **etapa de reposo**. La etapa de reposo es aquella en la que el embrión, antes de germinar, se va preparando para ello, como veremos más adelante en el tema 12. La fase vegetativa se inicia con la *germinación* del embrión y la aparición de la plántula, y comprende todo el desarrollo de los órganos de la planta denominados vegetativos, como las hojas o las raíces, o la elongación del tallo y la aparición de ramificaciones laterales. En un momento

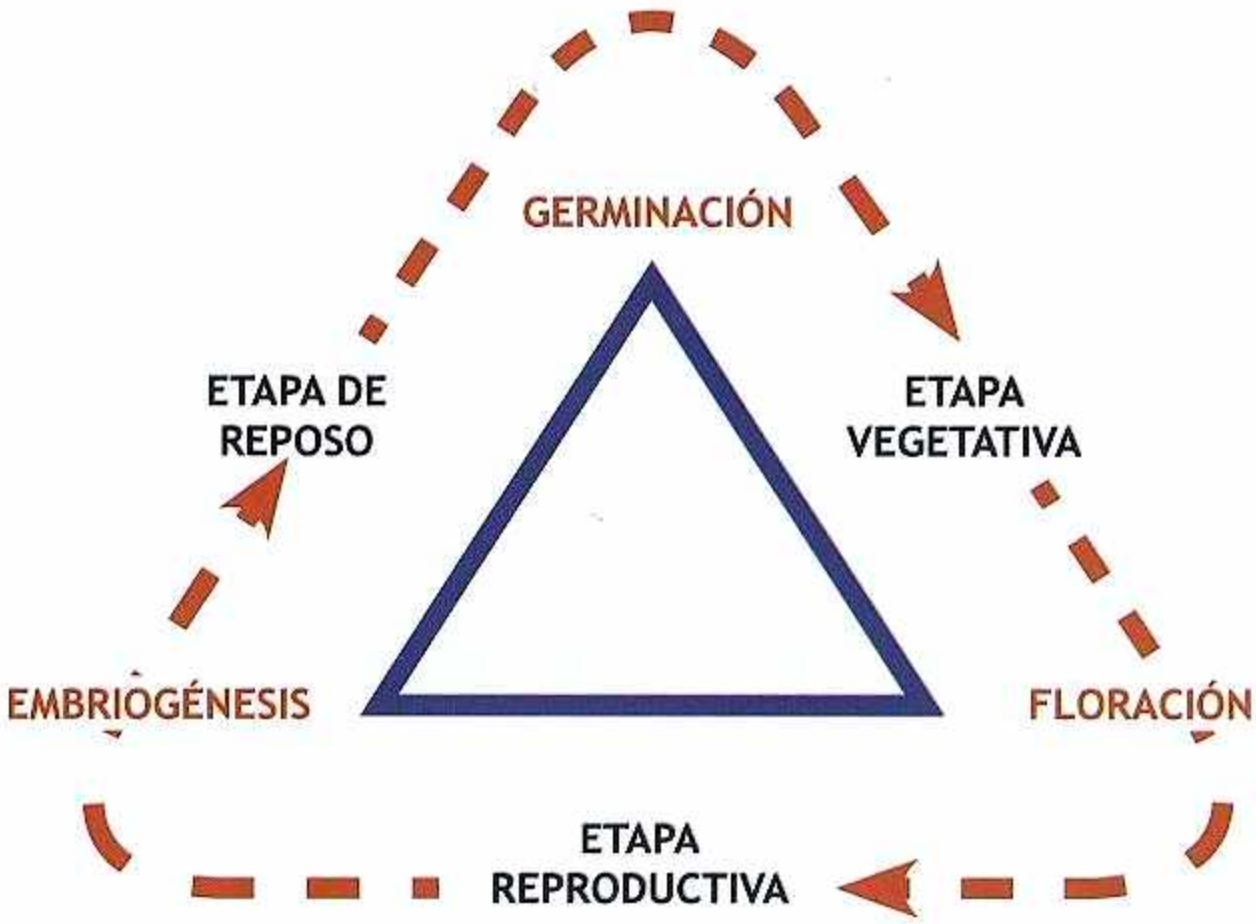


Figura 4.1: Las tres etapas del desarrollo de una planta.
Imagen de Seguí Simarro.

dado del ciclo, cuando se alcanza un tamaño adecuado y las condiciones ambientales son favorables, las plantas anuales sufren una transición irreversible de su desarrollo vegetativo hacia el reproductivo. Esta transición es lo que se conoce como *floración*, pues en ella se forman las *flores*, los órganos vegetales donde se aglutinan todas aquellas estructuras relacionadas con la reproducción. Es decir, con la formación de los gametos, la polinización, la fecundación, la embriogénesis, la formación de semilla y finalmente de fruto (*fructificación*). Para la planta, asegurarse de que el momento de esta transición es el adecuado para una correcta polinización y desarrollo de la semilla es crucial para la generación de descendencia. Es decir, para su éxito reproductivo como individuo, y a nivel de especie, para el éxito evolutivo de la especie. Por tanto, la transición hacia floración supone uno de los momentos clave dentro del desarrollo de la planta. Quizás, el momento más importante.

4.2. La transición hacia floración

La transición hacia floración (Figura 4.2) se caracteriza por la transformación de un meristemo, vegetativo hasta ese momento, en un meristemo inflorescente que generará inflorescencias, o directamente en un meristemo floral que generará directamente una flor. El meristemo vegetativo es una estructura con un tipo de tejido vegetal especial, meristemático, que alberga *células totipotentes*, indiferenciadas y por tanto capaces de dar lugar a cualquier otro tipo de tejido. Entre ellos, el meristemo inflorescente y posteriormente el floral.

El meristemo inflorescente será una estructura indiferenciada de la cual podrán diferenciarse únicamente aquellos tejidos y órganos que vayan a estar implicados en la reproducción, normalmente englobados dentro de la flor, y en la sustentación de las flores e inflorescencias (pedúnculo, raquis y pedicelo).

El meristemo floral, por su parte, dará lugar exclusivamente a la flor, con los órganos que la componen. Además de esta, existen otras diferencias entre el meristemo vegetativo y el floral. En primer lugar, la *filotaxis verticilada*. Dicho de otro modo, la ausencia de elongación del tallo entre los sucesivos *verticilos* florales que van surgiendo del primordio o yema floral. Dichos verticilos darán lugar de fuera hacia dentro a los sépalos, pétalos, estambres y carpelos. Otra diferencia es que los meristemos florales están determinados. Es decir, que una vez se forma la flor, las células que la conforman dejan de dividirse.

La transición hacia floración se caracteriza por un profundo cambio anatómico del meristemo vegetativo. El signo más evidente de este cambio hacia floración es que uno o más ápices dejan de producir hojas y yemas axilares y pasan a producir inflorescencias o flores. Estos cambios macroscópicos tienen su origen a nivel microscópico. Por lo general, el meristemo vegetativo tiene un aspecto ligeramente abovedado (Figuras 4.2 y 4.3).

Durante su transformación a inflorescente, el meristemo vegetativo experimenta un significativo aumento de las divisiones celulares en la zona más interna o *corpus*. Posteriormente las divisiones se extienden hacia las zonas central y

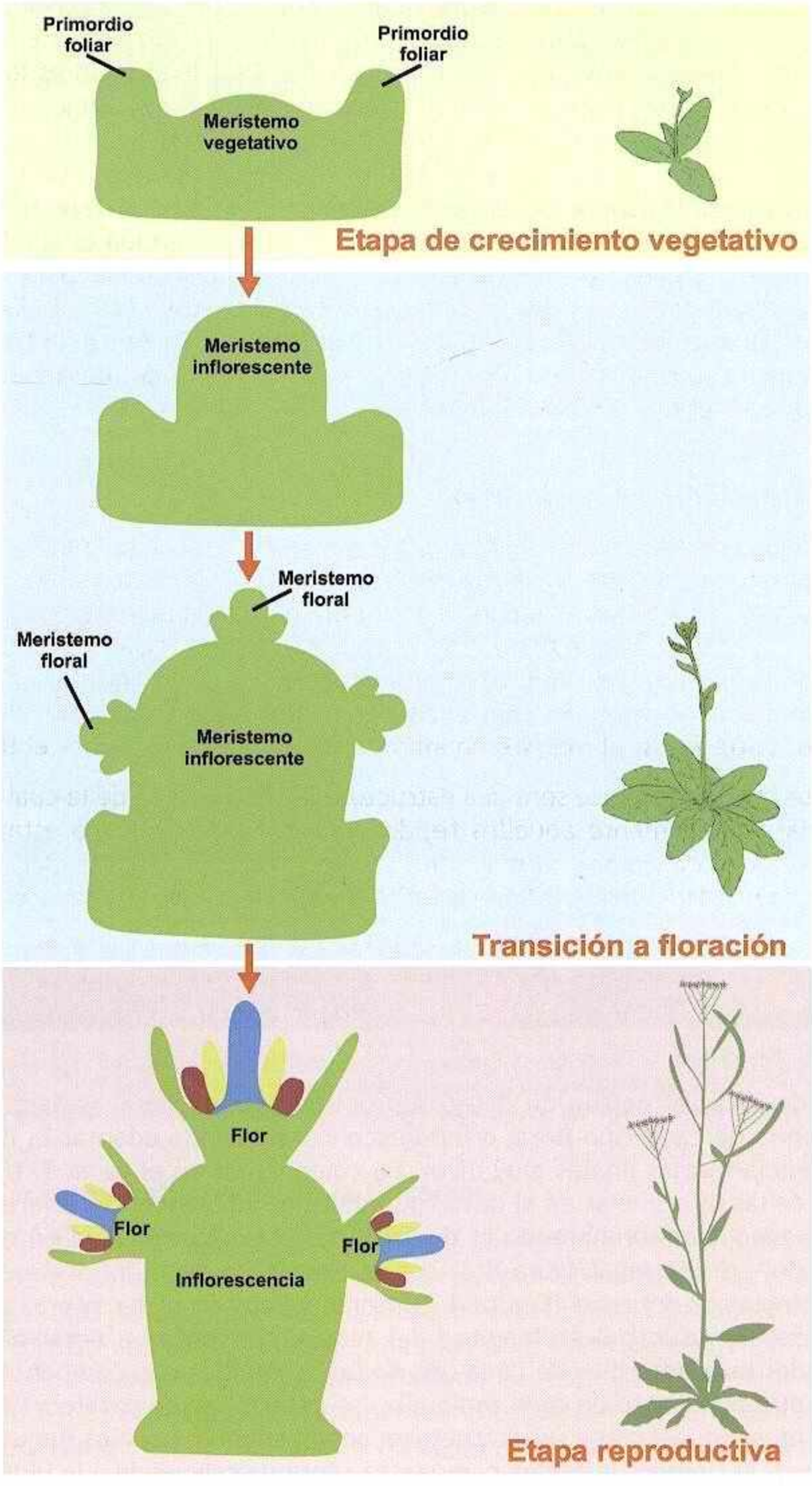


Figura 4.2: Transición del meristemo vegetativo hacia floración.
Imágenes de Seguí Simarro.

periférica del meristemo, de forma que éste en general gana en anchura y en altura, salvo en las inflorescencias en capítulo cóncavo, en las que se aplana, como en el caso de la alcachofa o el girasol. En el caso del crisantemo (Figura 4.3), se forma también un capítulo, pero convexo, lo cual permite el crecimiento también en altura.

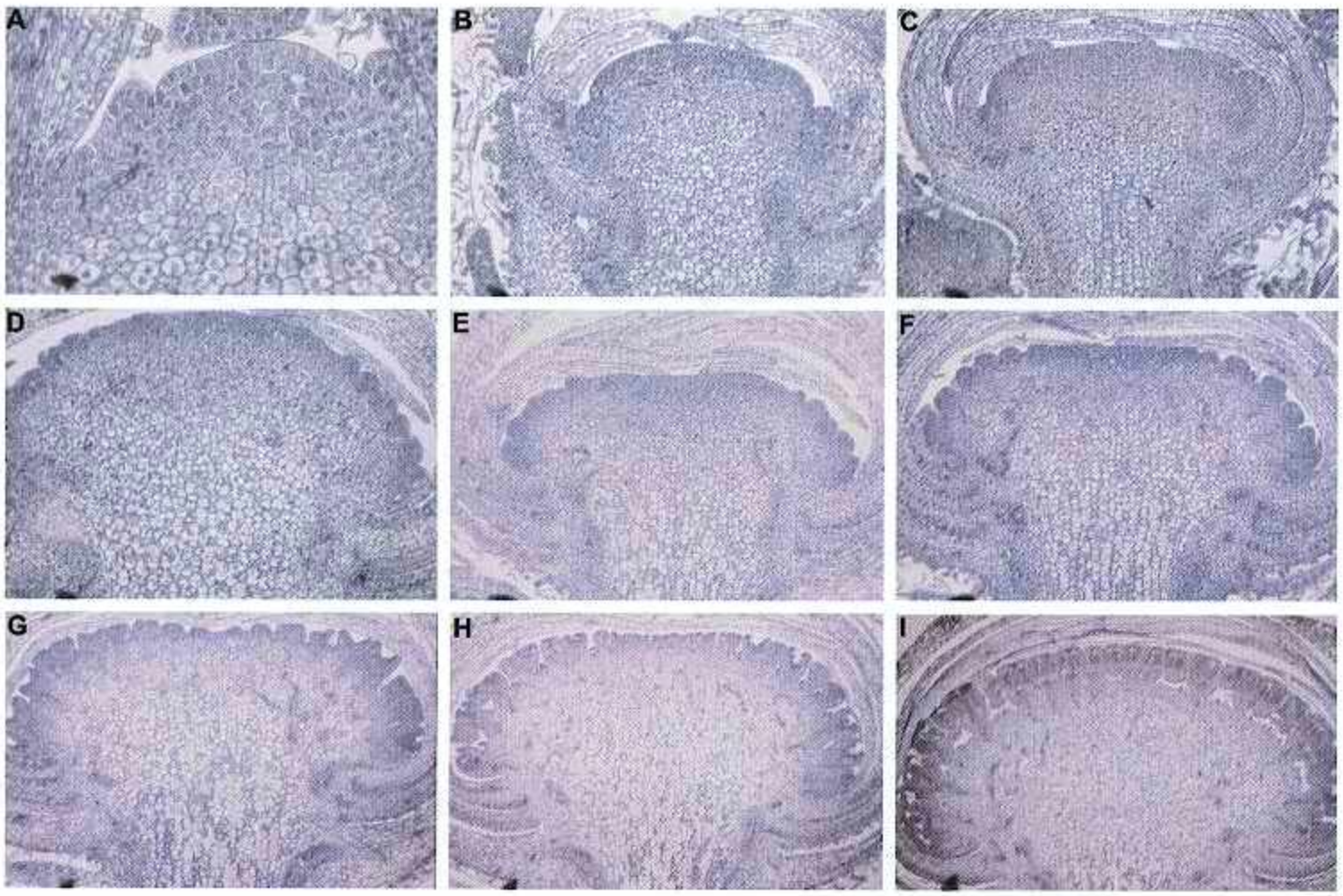


Figura 4.3: Desarrollo de la inflorescencia de Chrysantemum.
En las figuras A-C se muestran los cambios anatómicos que sufre el meristemo inflorescente.
En las figuras D-I se muestran la aparición de meristemos florales sobre el inflorescente (D-F), y la transformación de éstos en primordios florales (G-I).
Imágenes del portal web A Photo Laboratory Study of Plant anatomy (http://web.itctel.com/plantanatomy/index.htm), reproducidas con autorización del Prof. Gerald A. Myers.

A partir de aquí, el patrón de desarrollo del meristemo floral variará mucho dependiendo de cada tipo floral o inflorescente, pudiendo adoptar la flor o la inflorescencia formas finales muy diversas, como vimos en el tema 3. Un claro ejemplo de las diferencias en el desarrollo de tipos inflorescentes diferentes lo podemos encontrar comparando el desarrollo de la inflorescencia en capítulo convexo del crisantemo (Figura 4.3) con el desarrollo de la inflorescencia en espiga compuesta del trigo (Figura 4.4). Como vemos en dicha figura, a partir de un crecimiento inicial en longitud del raquis, comienzan a desarrollarse a ambos lados los primordios de cada una de las espiguillas que componen la espiga compuesta. Dentro de cada espiguilla, se desarrollan en paralelo las flores que la componen, así como sus estructuras acompañantes (glumas, lema, pálea y lodículas). Al tiempo, la espiga compuesta continua creciendo a lo largo de su eje hasta alcanzar el tamaño final.

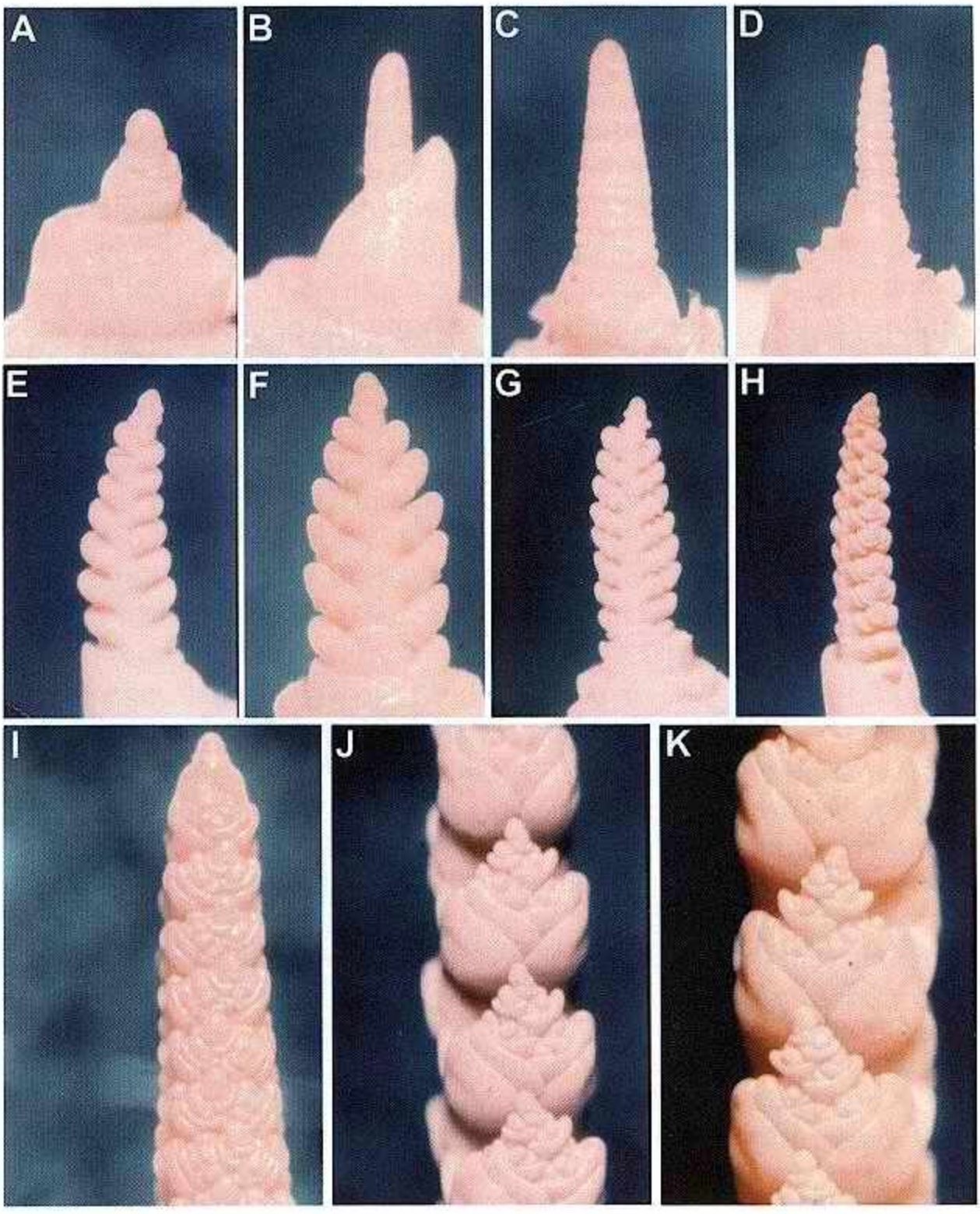


Figura 4.4: Desarrollo de la inflorescencia en espiga compuesta del trigo (*Triticum* sp.).
Imágenes del portal web *A Photo Laboratory Study of Plant anatomy*
(http://web.itctel.com/plantanatomy/index.htm), reproducidas con autorización del Prof. Gerald A. Myers.

4.3. Factores inductores de la floración

Desde cerca de 100 años se sabe que para florecer, las plantas han de percibir una serie de señales en su entorno, que marcan el momento apropiado de la floración. Uno de los experimentos pioneros en el estudio del control de la floración consistió en tomar hojas de una planta en floración e injertarlas en otra que aún no estaba floreciendo. Inmediatamente, ésta última comenzaba a producir flores. Estos resultados claramente indicaban que las señales de floración se perciben a través de las hojas, y de algún modo, la información que proporcionan ha de ser transmitida desde las hojas hasta el lugar donde aparecen las flores, el ápice caulinar o los axilares. En un primer momento, se pensó que

esta transmisión estaba mediada por un intermediario que se desplazaba desde el origen de la señal (las hojas), hasta su destino (los ápices), para activar el programa de desarrollo floral. A esta señal se le llamó *florígeno*. Quedaba por saber cual era la naturaleza química del florígeno. En 2005, dos laboratorios independientes de Alemania y Japón ayudaron a descifrar este enigma. Al parecer, la floración en el ápice del tallo está mediada por la interacción de dos proteínas, denominadas FT y FD. Mientras no interaccionen, no hay floración. FD es una proteína propia de los tejidos del ápice caulinar. En cambio, FT parece que proviene, directa o indirectamente, de las hojas. Es decir, mientras las hojas no perciban las señales adecuadas, FT no aparecerá en el ápice. Y mientras FT no aparezca en el ápice, FD por si sola no tendrá capacidad de inducir la floración, y la planta seguirá creciendo vegetativamente.

Como decía Miguel Ángel Blazquez, investigador del CSIC con una amplia trayectoria en el estudio del control de la inducción de la floración, en una entrevista concedida a El País el 4 de enero de 2006: *"la inducción de la floración se parece al funcionamiento de un interruptor, en cuanto a que la floración sólo se desencadena cuando las dos proteínas (FT y FD) están juntas, por separado no hacen nada. Se puede decir que la planta integra la información relativa al cuándo florecer, codificada en la proteína FT, y la información relativa al dónde florecer, codificada en la proteína FD. De esa manera, la planta se asegura que no florecerá fuera de tiempo ni generará flores en lugares que no sean el ápice. Es como una clave de seguridad"*.

Como estamos viendo, la transición de un meristemo vegetativo hacia floración es un proceso complejo, regulado por una serie de factores de muy distinta naturaleza. Muchos de estos factores tienen una **naturaleza exógena**, es decir, tienen relación con el entorno en el que se encuentra la planta. Otros factores son de **naturaleza endógena** y dependen por tanto de la propia fisiología de la planta, pero puede modularse la floración aplicando estos factores desde fuera, de forma exógena.

La mayoría de factores que vamos a ver a continuación engloban fundamentalmente aquellos que la planta es capaz de percibir, que provienen del entorno en el que vive, y que tienen un efecto en su respuesta de inducción de floración. La identificación y el conocimiento de estos factores permite que, en condiciones controladas, el agricultor los pueda manipular experimentalmente para provocar/inhibir la floración, de acuerdo con sus intereses. De entre estos factores podemos citar la temperatura, la luz (intensidad, calidad y sobre todo fotoperíodo), la disponibilidad de nutrientes, y la vernalización. Cabe mencionar que no todas las plantas son igual de sensibles a estos factores. Así, es frecuente que distintas especies, expuestas a los mismos factores ambientales, tengan una respuesta en términos de floración completamente distintas. Por ejemplo, existen plantas de día corto, que necesitan días de pocas horas de luz solar para florecer, y que en días de muchas horas de luz (por ejemplo, los días de verano) no lo hacen, mientras que hay otras, las plantas de día largo, que necesitan de estos días de verano, con muchas horas de luz, para florecer. Veremos esto con

más detalle en el punto 4.3.3.1, más adelante en este tema. Además, también se sabe que cuanto más vieja es una planta, más independiente es de los factores ambientales, y menores son sus requerimientos de presencia de los factores ambientales adecuados para florecer.

4.3.1. Estacionalidad

Además de su efecto aislado, en condiciones controladas, existen algunos de estos factores que en el entorno natural de la planta ejercen su efecto de forma combinada. Por ejemplo, la temperatura y el *fotoperiodo* (diferencia entre la longitud del día y de la noche), que se combinan de forma distinta en distintas épocas del año. Estaríamos pues ante un factor combinado como sería la **estacionalidad**. En la naturaleza, el ciclo vital de las plantas viene determinado principalmente por factores estacionales definidos por temperatura y fotoperiodo. Las plantas tienen una serie de "sensores" de luz (*fotorreceptores*) en las hojas que les permiten percibir cuanta luz reciben y durante cuanto tiempo la reciben (ver apartado 4.3.4). Las plantas también son capaces de percibir la temperatura y sus cambios (si disminuye o aumenta), aunque en este caso todavía no se han identificado los receptores. Es más, una planta es capaz de calcular temperaturas medias durante una época determinada del año, tal como lo demuestra el hecho de que las plantas no se "dejan engañar" por un día extraordinaria o inusualmente caluroso de otoño o invierno. Necesitan que la combinación calor-luz se mantenga durante varios ciclos día-noche para "darlos como buenos". Una hipótesis que se maneja a este respecto es que las plantas tengan un mecanismo acumulativo basado en la medición de luz y temperatura que, una vez se alcanza un cierto umbral, desencadena el programa de floración de forma irreversible.

En base a estas dos mediciones, las plantas perciben en qué estación del año se encuentran y sincronizan germinación y floración con la estación del año más favorable. De acuerdo con esto, hay plantas, que se denominan de primavera, cuyas semillas germinan en condiciones de temperaturas templadas y días de duración media (primaverales), y necesitan condiciones de final de verano para florecer. Por otro lado, hay plantas (de invierno), cuyas semillas germinan a finales de otoño o entrando en el invierno, y necesitan condiciones primaverales para florecer (Figura 4.5).

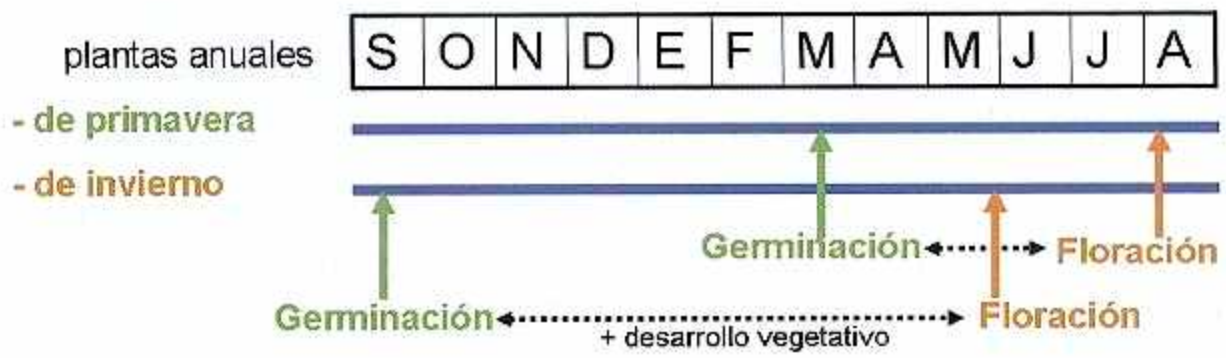


Figura 4.5: Distintos tipos de plantas (de primavera y de invierno) en función de las condiciones estacionales que necesitan para germinar y florecer.
Imagen de Seguí Simarro.

4.3.2. Temperatura

Aparte de su efecto combinado en la estacionalidad, la temperatura es un factor que puede manipularse en condiciones controladas (invernaderos, cámaras de crecimiento) en función del proceso que queramos favorecer. Un descenso de la temperatura por debajo de la idónea de la especie, como es fácil de imaginar, inhibe la transición a floración, con lo que todos los procesos que de ello dependen se ralentizarán también. Por el contrario, el aumento de la temperatura acelera el desarrollo de las yemas, lo cual puede redundar en un adelanto de la floración. Pero cuidado, también puede tener efectos colaterales, como una reducción del cuajado. Por ejemplo, en el caso del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), se ha estudiado la influencia de las temperaturas antes de floración en el desarrollo floral y el cuajado de frutos, y se ha visto que el adelanto de la floración por efecto de la temperatura no supone un adelanto en el crecimiento del pistilo. Se da una floración prematura, con flores con pistilos poco desarrollados, incapaces de generar fruto. Es decir, la consecuencia es una reducción en el cuajado. En resumen, temperaturas bajas inhiben la floración, mientras que temperaturas altas la promoverían, pero con posibilidad de alteraciones en los pistilos y en el cuajado de los frutos.

4.3.3. Luz

Las plantas son capaces de detectar cambios en la intensidad, composición espectral y duración de la luz, y de generar distintas respuestas fisiológicas en virtud de esos cambios. Una de ellas, como ya sabemos, es la inducción de la floración en respuesta a la duración de la luz. Según el efecto de la duración del día (luz) en las plantas, éstas se dividen en:

- **plantas de día corto:** inician la floración cuando la duración del día está por debajo de un cierto límite.
- **plantas de día largo:** inician la floración cuando la duración del día está por encima de un cierto límite.
- **plantas de día intermedio:** inician la floración cuando la duración del día está entre un límite máximo y uno mínimo (sólo florecen cuando el día no es ni muy largo ni muy corto).
- **plantas neutrales:** inician la floración en respuesta a otros estímulos ambientales, pero no a la luz.

Como siempre en la naturaleza, hay casos intermedios. Es el caso de *Arabidopsis thaliana*. Arabidopsis es una planta facultativa de día largo. Es decir, puede florecer en un régimen de días cortos, pero los días largos promueven una floración mucho más temprana. Por ejemplo, con un régimen de entre 8 y 10 horas de luz al día, florece en dos meses desde la germinación. Sin embargo, con alrededor de 16 horas de luz por día, florece en tres semanas desde la germinación.

De lo visto hasta ahora en cuanto a la terminología "día corto" y "día largo", podríamos pensar que lo que la planta percibe como señal es la mayor o menor duración del día, entendido como horas de luz ininterrumpida. Sin embargo, mediante un diseño experimental semejante al utilizado por Hammer y Bonner con el cadillo (*Xanthium strumarium*), es posible demostrar que esa idea dista bastante de la realidad (Figura 4.6).

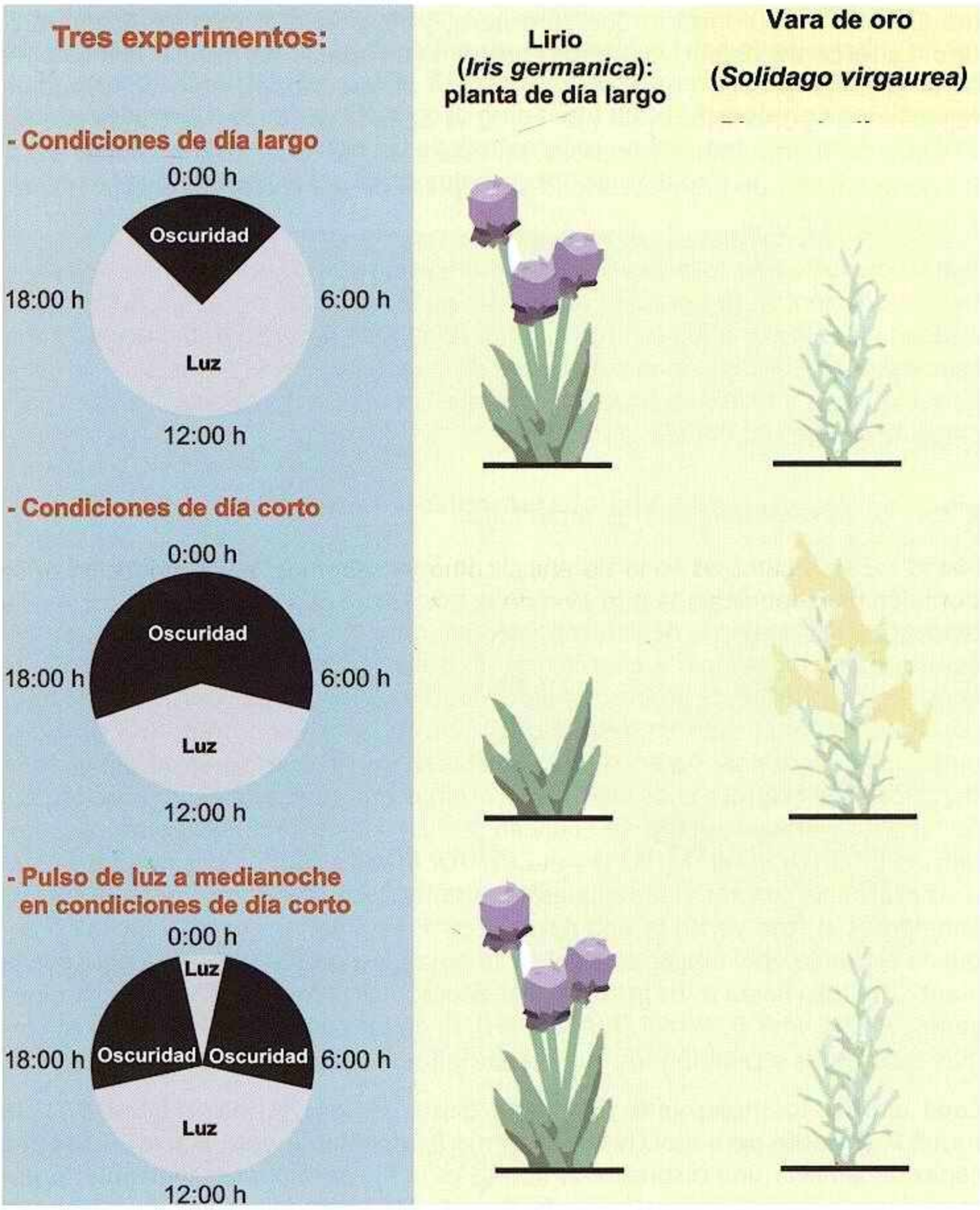


Figura 4.6: Experimento que determina que las plantas perciben el fotoperiodo como la duración ininterrumpida de la fase oscura, y no de la fase luminosa como se podría pensar.
Imágenes de Seguí Simarro.

El experimento consiste en utilizar una planta de día largo, por ejemplo el lirio (*Iris germanica*) y una de día corto, por ejemplo la vara de oro o vara de San José (*Solidago virgaurea*) y exponerlas a distintos regímenes lumínicos. El primero de estos regímenes simularía condiciones de día largo, con tan solo 6 horas seguidas de oscuridad, y 18 de luz. Como cabría esperar, bajo estas condiciones florecería el lirio, y no la vara de oro. El segundo fotoperiodo simularía condiciones de día corto, con cerca de 14 horas de oscuridad y tan solo 10 de luz. De nuevo sucedería lo que se espera, y florecería la vara de oro y no el lirio. La tercera y definitiva prueba consistiría en aplicar las mismas condiciones de la segunda prueba (10 horas de luz y 14 de oscuridad), pero aplicando un fogonazo, un pulso intenso de luz en mitad de la fase oscura, de forma que las 14 horas no fueran ininterrumpidas. En este caso, se observaría que pese a que las horas totales de luz y oscuridad son típicas de día corto, florecería el lirio, y no la vara de oro.

Como conclusión de esta experiencia se deduce que lo que determina realmente la inducción de la floración no es el número total de horas de luz o de oscuridad, sino la duración ininterrumpida de la fase oscura, el número de horas seguidas en oscuridad. Se entiende que en la naturaleza, la oscuridad nocturna no suele verse interrumpida, y eso es lo que las plantas perciben y utilizan para calcular la longitud del día.

4.3.4. La base química del fotoperiodo

La ruta responsable de la inducción de la floración por fotoperiodo comienza por la percepción de la luz en al menos cinco regiones del espectro visible, a través de distintos tipos de *fotorreceptores* (cromoproteínas capaces de activar una respuesta biológica al captar luz). Existen varios tipos de fotorreceptores implicados en diversos procesos relacionados con el fotoperiodismo. En *Arabidopsis* se han analizado en detalle dos tipos de fotorreceptores, los *criptocromos* y los *fitocromos*. De entre ellos destacan los fitocromos en su papel en la floración. Los criptocromos son flavoproteínas que funcionan como receptores de luz azul y ultravioleta A. Se conocen dos genes que codifican para criptocromos, el *CRYPTOCROME 1 (CRY1)* y el *CRYPTOCROME 2 (CRY2)*. Los fitocromos son unas proteínas con actividad quinasa, sensibles a las longitudes de onda correspondientes al rojo y rojo lejano del espectro. Están en las hojas y basta un pequeño estímulo en un lugar puntual de la hoja para que se transmita por toda la planta, incluso hasta a los injertos. Los fitocromos vienen codificados por cinco genes, *PHY A*, *PHY B*, *PHY C*, *PHY D* y *PHY E*, de los cuales *PHY A* y *PHY B* son los más estudiados y también los que mayor influencia ejercen sobre la floración.

Cada uno de los fitocromos (P) puede existir en dos formas (Figura 4.7), la forma P_r (estable pero inactiva) y la forma P_{fr} (inestable pero activa). La forma capaz de generar una respuesta biológica es la P_{fr}, pero por ser inestable, pronto revierte a P_r. Esta reversión se da durante las fases de oscuridad, o bien por exposición a luz de longitud de onda roja lejana (730 nm). La conversión de P_r a P_{fr} es facilitada por la exposición a luz roja (660 nm).

En base a estas premisas, se elaboró una hipótesis sobre el papel del fitocromo en la floración. Según esta hipótesis, la respuesta biológica desencadenada por el P_{fr} sería distinta en plantas de día largo y de día corto. En plantas de día corto, el P_{fr} inhibiría la floración, mientras que la estimularía en plantas de día largo. Por tanto, el mecanismo de actuación sería también algo distinto para cada tipo de plantas. En las de día corto, el P_{fr} se acumularía durante la fase luminosa y se eliminaría en la fase oscura. Así, cuando las noches fueran lo suficientemente largas, se eliminaría el P_{fr} (o al menos una cantidad suficientemente importante) y desaparecería con ello la inhibición de la floración. Por el otro lado, en las plantas de día largo, en las que el P_{fr} promovería la floración, durante las largas noches de invierno se revertiría todo (o gran parte del) P_{fr} necesario para florecer. Solo cuando las noches fueran lo suficientemente cortas como para que no diera tiempo a revertir todo el P_{fr}, la floración podría ser inducida.

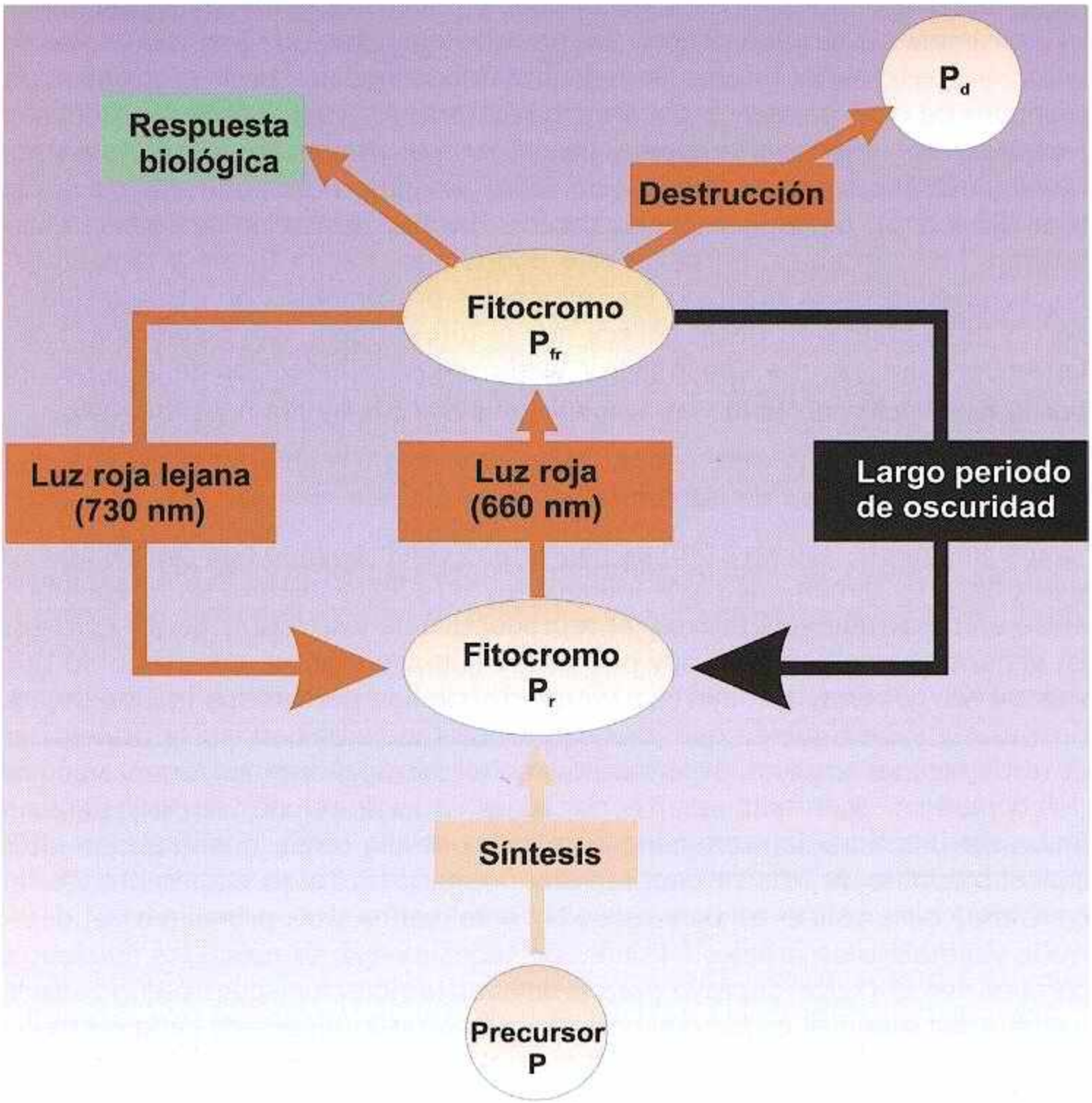


Figura 4.7: La base química del fotoperiodo: interconversión de las formas r y fr del fitocromo. Imagen de Seguí Simarro.

Esta hipótesis, aunque atractiva, pronto se encontró con un serio obstáculo: experimentos que demostraron que en muchas plantas el P_{fr} desaparece durante las primeras tres o cuatro horas de oscuridad. Por corta que sea una noche, todas duran más de cuatro horas. Estos y otros datos han llevado a la conclusión de que la captación de señales de fotoperiodicidad no está solamente controlado por la interconversión P_{fr}/P_r. Además de esto, para que el fotoperiodo controle el tiempo de floración ha de existir un mecanismo endógeno para "medir" la duración del fotoperiodo. Éste es el *reloj circadiano*. El reloj circadiano controla los ritmos diarios en la expresión génica y en patrones cíclicos de comportamiento, como por ejemplo el del movimiento de las hojas). En el próximo tema veremos cómo se combinan las señales provenientes del fitocromo con las del reloj circadiano para generar una respuesta al fotoperiodismo dentro de la ruta del fotoperiodo.

Independientemente de lo hasta ahora comentado, hay también un gran número de especies en las que la floración no se ve muy afectada por la duración de la luz, es decir, por el fotoperiodo. Son las denominadas *especies foto-neutras*. Ejemplos de ellas pueden ser el pepino *(Cucumis sativus)*, el tomate (*Solanum lycopersicum)*, ciertas variedades de tabaco (*Nicotiana tabacum)*, la patata *(Solanum tuberosum)*, el haba (*Vicia faba*), la judía (*Phaseolus vulgaris*) o la rosa (*Rosa spp*). En estas especies parece que hay otra serie de "mecanismos internos" responsables, entre los que podríamos citar la forma y tamaño del ápice, la edad de la planta o las influencias provenientes de otros tejidos o partes de la planta. Es decir, parece que el fotoperiodo, solo o combinado con la temperatura, no es el único factor implicado en la inducción de la floración, sino que debe haber algún otro mecanismo adicional también involucrado.

4.3.5. Disponibilidad de nutrientes

Tradicionalmente, los agricultores han venido comprobando que ciertos abonos y fertilizantes tienen una clara influencia y un efecto distinto en el equilibrio entre en desarrollo vegetativo y el reproductivo de las plantas de sus cultivos. En general, parece ser que hay nutrientes que aceleran un desarrollo de tipo vegetativo, y otros que ejercen un efecto similar pero sobre la fase reproductiva. Se sabe también que los que parecen acelerar uno, suelen ralentizar el otro. Algunos ensayos experimentales con nitrógeno en su forma amónica (NH_3^-) parecen confirmar esta teoría: bajas concentraciones de NH_3^+ parecen promover una floración temprana en plantas de día largo, mientras que altas concentraciones de NH_3^+ promueven una floración tardía en el guisante. Por el contrario, unas concentraciones de NH_3^+ igualmente altas promueven el desarrollo vegetativo en árboles frutales. De todos modos, tampoco los nutrientes parecen ser el factor decisivo para promover la floración, puesto que todavía hay muchas especies en las que no se ha demostrado un efecto de la nutrición en la floración.

4.3.6. Vernalización

Por *vernalización* se entiende el requerimiento de frío de algunas plantas cultivadas como condición previa para germinar o florecer. De este modo, estaríamos imitando las condiciones que en su entorno natural necesitan estas especies para su germinación, o en el caso que nos ocupa, la inducción de la floración. En su entorno natural, estas plantas necesitarían de una exposición prolongada al las bajas temperaturas, para poder posteriormente florecer en primavera. El momento del requerimiento de frío varía entre las especies vernalizables. Unas lo requieren durante la germinación (en la semilla), mientras que en otras la vernalización ha de darse cuando poseen ya cierto desarrollo foliar. En cualquier caso, la parte de la planta que requiere pasar frío es el ápice, y más concretamente, sus células meristemáticas. Si se aplica frio a cualquier otra parte, la planta no lo percibe. Parece evidente que los receptores de la planta para la vernalización están situados en la zona apical. Las temperaturas más efectivas para vernalizar oscilan entre 1° y 9° C. Además, la venalización será tanto más efectiva cuantos más días de frío se apliquen. Esto no es sorprendente, si consideramos que estamos tratando de imitar unas condiciones invernales, que no duran pocos días, sino más bien al contrario. La vernalización es en algunos casos reversible, mediante la aplicación inmediata de temperaturas "desvernalizantes", que lógicamente serán altas (en torno a 30° C).

Algunos estudios sugieren que la vernalización está relacionada con la desmetilación del ADN. De hecho, hay algunos ecotipos de Arabidopsis que adelantan igualmente la floración mediante vernalización, o mediante tratamientos con 5-aza-citidina. La 5-aza-citidina es un análogo de la citosina (base nitrogenada que se encuentra de forma habitual en el ADN de los seres vivos). Cuando se trata con 5-aza-citidina a un ser vivo, éste la incorpora en su ADN durante la replicación, por ser muy parecida estructuralmente a su análoga la citosina. Pero tiene una diferencia fundamental con ella: la imposibilidad de ser metilada. Así, cuando se incorpora al ADN 5-aza-citidina en lugar de citosina, ese ADN no puede ser metilado cuando se necesite. Es considerada pues un agente de desmetilación del ADN.

La metilación - desmetilación del ADN es un mecanismo epigenético que los seres vivos utilizan para activar o desactivar la expresión de un determinado gen. Así pues, cuando un gen está metilado no se expresa, y cuando se desmetila, sí puede expresarse. Por tanto, al imposibilitar la 5-aza-citidina la metilación del ADN, mantendría al gen o genes donde se ha incorporado (los de la inducción a floración, por ejemplo) siempre activados, expresables. Y en el caso que nos ocupa, esto mismo consigue la vernalización en algunos ecotipos de Arabidopsis, activar los genes de inducción a floración. Todo esto ha llevado a la idea de que el frio "vernalizante" puede ejercer su acción promotora precisamente promoviendo la desmetilación de los genes implicados en la inducción a floración (el gen *FLC*, en concreto, un represor de la floración), y por tanto la activación (desrrepresión) de su expresión.

De todos modos, y al igual que sucede con los otros factores vistos hasta ahora, no todas las plantas requieren vernalización. Y de entre las que lo requieren, no todas tienen el mismo tipo de requerimiento. Las hay vernalizables que tienen un requerimiento absoluto o cualitativo. Es decir, que si no son vernalizadas, no germinan. Ejemplos de este tipo son los cereales de invierno, la zanahoria (*Daucus carota*), la remolacha (*Beta vulgaris*), el beleño negro (*Hyosciamus niger*) o algunas perennes como *Dianthus deltoides*, *Lolium perenne* o *Poa supina*. Las hay también que tienen un requerimiento de vernalización relativo, o cuantitativo. Es decir, que cuanto más tiempo dure el frío, mayor será la inducción de la floración. Por ejemplo, cereales como el centeno (*Secale cereale*), la avena (*Avena sativa*), la cebada (*Hordeum vulgare*) o el trigo (*Triticum aestivum*), u hortícolas como la lechuga (*Lactuca sativa*) o las espinacas (*Spinacia oleracea*). Y por último, hay plantas que no son vernalizables en absoluto, como las monocárpicas bianuales en roseta o las monocárpicas bianuales caulescentes. Por tanto, éste tampoco parece que vaya a ser por si solo el estímulo universal de la floración, sino que deben haber aún más elementos implicados.

4.3.7. Reguladores de crecimiento

Distintas evidencias empíricas indican que la aplicación exógena de reguladores del crecimiento vegetal (hormonas vegetales o *fitohormonas*) tiene un efecto en la inducción o inhibición de la floración. Es el caso, por ejemplo, de la aplicación de giberelinas. En la Figura 4.8 se ilustra un experimento en el que tres plantas son sometidas a distintos tratamientos. La primera, control, no sufre tratamiento alguno. La segunda es tratada con una giberelina, el ácido giberélico (GA), a una dosis de 10 g/día, y la tercera es sometida a vernalización durante 8 días. El resultado de ambos tratamientos es la inducción de la floración, mientras que la planta control permanece en crecimiento vegetativo.

Hoy en día se sabe que la aplicación exógena de giberelinas acelera la floración y la elongación de los internodos en determinadas especies. En concreto, en aquellas especies que requieren vernalización, o en especies de día largo cuando son mantenidas en condiciones de día corto. En estas especies, las giberelinas parecen sustituir a las condiciones de día largo o a la vernalización. En cambio, en otras especies las giberelinas solo promueven la elongación internodal, pero no la floración. Existen también especies en las que para inducir la floración se requiere de la combinación de varios estímulos (factores exógenos) a la vez. Por ejemplo, la combinación de aplicación de giberelinas y de vernalización. Y también las hay que no responden a ninguno de estos estímulos, ni por separado ni combinados.

Aparte de las giberelinas, se conocen otras fitohormonas cuya aplicación exógena parece promover la floración. Por ejemplo, auxinas y etileno en piña, kinetina y adenina en *Perilla,* zeatina en *Wolffia microscopica* (planta acuática) o ácido abscísico (ABA), CCC y B.9 en algunas (pocas) especies frutales como el peral o el manzano. En definitiva, lo que se sabe hasta ahora sobre el control hormonal de la inducción a floración indica que no parece haber ninguna

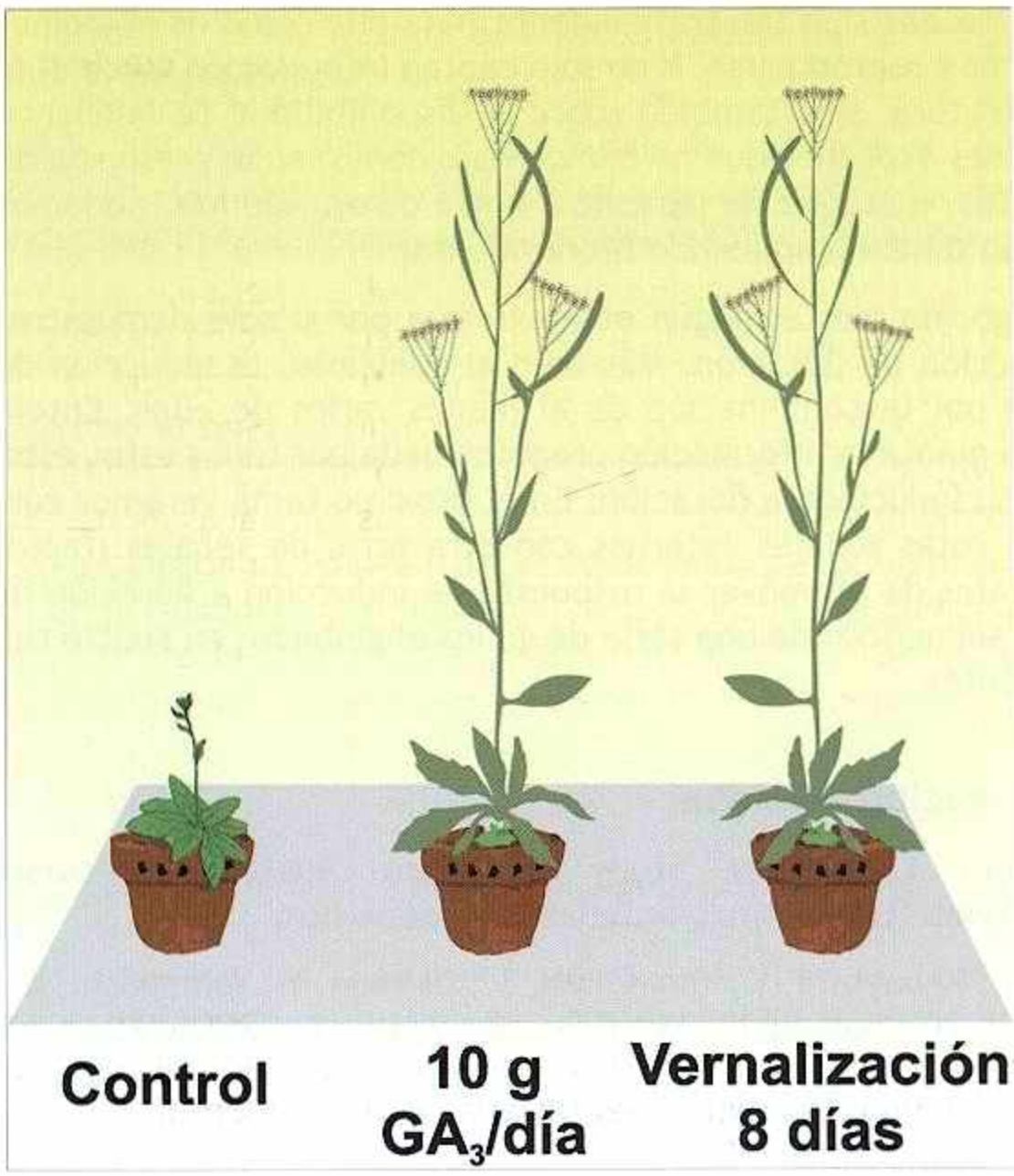


Figura 4.8: Efecto comparativo de la aplicación de giberelinas y la vernalización en la inducción de la floración.
Imagen de Seguí Simarro.

combinación de hormonas que pueda promover por si misma la floración de forma universal, sino que deben influir otros factores en la floración.

4.4. Resumen

A lo largo de este tema hemos visto que la inducción de la floración es el proceso con el que se inicia toda la biología reproductiva de las plantas superiores. Una vez se dispara la transición hacia floración, el meristemo hasta entonces vegetativo sufre una serie de cambios que determinan de forma irreversible su paso a inflorescente o floral. Este proceso se da en un momento concreto del ciclo vital de las plantas, cuando se combinan las condiciones ambientales adecuadas (luz, temperatura, época del año, disponibilidad de nutrientes, etc.).

En general, de lo visto hasta sobre el efecto de factores endógenos sobre la inducción a floración, podemos concluir que las plantas son capaces de captar y procesar informaciones de muy distinta naturaleza y gran complejidad, antes

de tomar una decisión tan trascendente para ella como es el momento idóneo para florecer y reproducirse. Y no sólo captan información sobre el fotoperiodo y la temperatura, sino también sobre la disponibilidad de nutrientes, o sobre otros factores exógenos que no hemos visto como son la presencia de condiciones de estrés, o ataque de parásitos, entre otros. Además, podemos influir en la inducción también aplicando fitohormonas.

Sin embargo, no existe ningún estímulo que por si solo demuestre ser eficaz en la inducción de floración. Más bien al contrario, la inducción debe de ser controlada por la combinación de al menos varios de ellos. Entonces ¿cómo combina la planta la información proporcionada por todos estos estímulos para promover su inducción a floración? En el próximo tema veremos cómo se integran todas estas señales externas con otra serie de señales (factores) endógenos, en aras de promover la respuesta de inducción a floración mediante la activación secuencial de una serie de genes englobados en cuatro rutas génicas independientes.

4.5. Información adicional

- A Photo Laboratory Study of Plant Anatomy (recurso online). http://web.itctel.com/plantanatomy/index.htm
- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. Science, 309 (5737): 1052-1056.
- Bolaños, L. Desarrollo reproductivo. Floración y gametogénesis (recurso online). http://web.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/FisioVegetal/TeoriaFisioVegetal/Resumenes/tema23.htm
- Plant Biology.com. Investigation of flowering time (recurso online). http://www.plant-biology.com/flowering-time.php
- Plant Biology.com. The model plant Arabidopsis thaliana and its use in flowering-time studies (recurso online). http://www.plant-biology.com/model-plant-Arabidopsis-thaliana.php
- Raven, P.H., Johnson, G.B. (1996). Biology. 4th edition. W.C. Brown Publishers.
- Reproduccion sexual - Hipertextos del Área de la Biología (recurso online). http://www.biologia.edu.ar/reproduccion/sexual.htm
- Special issue on Plant Reproduction. The Plant Cell, Volume 16, supplement. June 2004. Este es un número especial de la revista The Plant Cell donde diversos especialistas en biología reproductiva aportan revisiones sobre algunos de los temas más relevantes de este campo, incluyendo la inducción de la floración.

- Urbano Terrón, P. 1995. Tratado de Fitotécnia General. 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., Weigel, D. 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. Science, 309 (5737): 1056-1059.

TEMA 5. Control genético del desarrollo floral

Para asegurar el éxito reproductivo, en las angiospermas el proceso de la transición floral está regulado por un complejo circuito de expresión génica que integra las múltiples señales ambientales recibidas (fotoperiodo, calidad y cantidad de luz, temperatura) con otras endógenas y de desarrollo (edad de la planta, niveles de sacarosa o de distintas fitohormonas) en una serie de rutas de transmisión de señales que termina en la expresión de los ***genes de tiempo de floración***. De esta manera, se aseguran florecer en el momento en que hayan acumulado las reservas internas suficientes y en que las condiciones ambientales sean favorables.

El conocimiento de que se dispone actualmente al respecto de los genes de inducción floral se debe en gran medida al trabajo realizado en *Arabidopsis thaliana*. Esta planta es considerada modelo para el estudio de muy distintos aspectos de la fisiología y la genética vegetal por la facilidad con la que estos aspectos pueden ser manipulados por el ser humano. Así, es muy fácil generar mutantes en esta planta. Los mutantes son una herramienta muy poderosa para estudios genéticos, pues siempre que sepamos qué gen ha sido mutado, el mutante nos revelará la función de dicho gen en un determinado proceso. En el caso concreto que nos ocupa, la estrategia de estudio de los genes de inducción a floración ha sido la siguiente: en primer lugar generar mutantes mediante mutagénesis inducida, y en segundo lugar aislar y caracterizar aquellas mutaciones que den lugar a fenotipos de floración temprana o tardía. En aquellos mutantes en los que se de una floración tardía, estarán afectados los genes de activación de la floración. En cambio, en aquellos mutantes en los que se de una floración temprana, los genes alterados serán los de la represión de la floración. Por último, y para ver hasta qué punto los genes identificados pueden tener un papel más o menos relevante en estos procesos, se lleva a cabo un análisis de la variación genética para el tiempo de floración típico de las diferentes poblaciones naturales (ecotipos). De esta manera se han identificado aproximadamente 80 loci que regulan el tiempo de floración en Arabidopsis. Dado el complejo entramado de rutas génicas en las que intervienen estos genes, que excede en mucho la complejidad deseable para un texto como este, en este tema daremos una visión general de ellos, mencionando tan solo los genes más relevantes.

5.1. Control genético del tiempo de floración

Los genes que regulan cuando ha de darse la floración se organizan en dos rutas de respuesta a condiciones ambientales (la *ruta de promoción por fotoperiodo* y la *ruta de la vernalización*), y otras dos rutas de respuesta a factores endógenos, independientes de las condiciones ambientales (la *ruta autónoma* y la *ruta de las giberelinas*). A continuación veremos cada una de ellas.

5.1.1. Ruta de promoción por fotoperiodo

Hemos visto en el apartado 4.3.4 del tema anterior que la ruta responsable de la inducción de la floración por fotoperiodo comienza por la percepción de la luz por el fitocromo. A partir de ahí, se dispara una cascada de transducción de señal mediada por los productos de los siguientes genes principales implicados en la ruta del fotoperiodo: *GI*, *CO*, *FD*, *FE*, *FHA*, *FT* y *FWA*. *GI* es un gen asociado al reloj circadiano que actúa por encima de *CO*. De todos ellos, es CO el que juega un papel central en el control de la floración por fotoperiodo en *Arabidopsis*. Se sabe que la proteína codificada por *CO* tiene como dianas directas y en paralelo a los genes *FT* y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*), que actúan por tanto por debajo de *CO*. *SOC1* es un gen tipo MADS-box que integra las respuestas frente a fotoperiodo, y también frente a la vernalización y giberelinas. Diversos experimentos sugieren que además, podrían haber más genes de floración directamente afectados por la expresión de *CO*. Por tanto la principal ruta de activación de floración por fotoperiodo sería *GI* *CO* *FT* y *SOC1*. Otro gen que afecta a la ruta del fotoperiodo es FWA, que se cree que podría reprimir la interacción entre los productos de los genes *FT* y *FD*, que como vimos en el tema 4, es necesaria para la floración. Existen también dos genes que actúan como represores de esta ruta. Son *FLM* y *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*), que actuarían en una misma vía de represión.

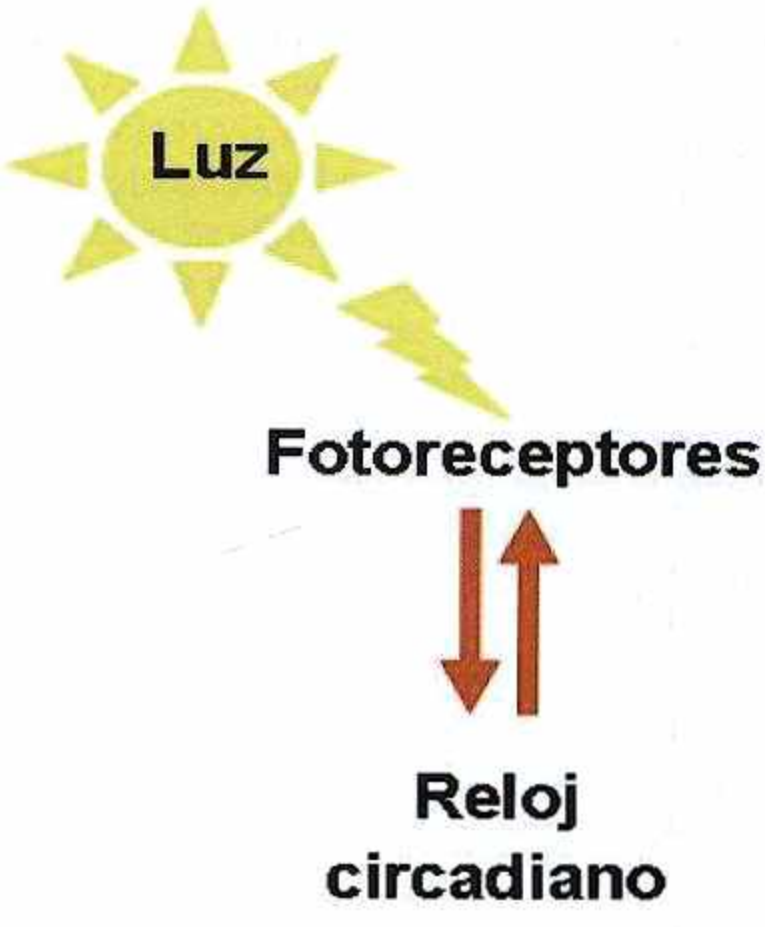


Figura 5.1: Integración de la información lumínica y el reloj circadiano por parte de los fotorreceptores.
Imagen de Seguí Simarro.

Hemos visto también que la captación de señales de fotoperiodicidad no está solamente controlada por la interconversión entre las formas P_{fr}/P_r del fitocromo, sino que además de esto, para que el fotoperiodo controle el tiempo de floración ha de existir un mecanismo endógeno para "medir" la duración del fotoperiodo. Éste es el *reloj circadiano*. El reloj circadiano controla los ritmos diarios en la expresión génica y en patrones cíclicos de comportamiento, como por ejemplo el del movimiento de las hojas. Existe una estrecha relación entre fotoperiodo y ritmo circadiano, como lo demuestra el hecho de que hay un grupo de genes de la ruta del fotoperiodo que forman también parte del reloj circadiano. Estos son *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*), *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*), *EARLY FLOWERING 3* (*ELF3*), *TIMING OF CAB1 (TOC1), ZEITLUPE* (*ZTL*), *FKF1* y *GI*. Mutaciones en cualquiera de estos genes provocan una floración temprana.

En base a todo esto se ha propuesto un modelo (Figura 5.1) en el que por una parte la luz solar proporcionaría la información sobre día y noche, y por otra el reloj circadiano actuaría como medidor en la respuesta fotoperiódica. En medio de ambos, los fotorreceptores estarían controlando el acoplamiento del reloj circadiano y los ciclos diarios de luz y oscuridad, mediante la captación de información asociada a la calidad y cantidad de luz ambiental, y la generación de señales que interaccionen con los componentes de dicho reloj. Los fotoreceptores envían señales al reloj circadiano que le permiten oscilar con periodo de 24 horas. Pero a pesar de esta influencia, es aún más importante la coordinación entre el ritmo del reloj y la luz.

Así, en el *modelo de coincidencia externa*, por el que se explica cómo se mide la longitud del día en el control de la floración, la duración del fotoperíodo se mide por una interacción entre la señal generada por la luz y la del ritmo circadiano. En este proceso, la percepción de la luz desempeñaría dos funciones. En primer lugar, sincronizaría los ritmos circadianos con los ciclos diarios de luz y oscuridad. En segundo lugar, la luz interactuaría con el ritmo circadiano promoviendo o reprimiendo la floración si la planta es expuesta a la luz en una fase determinada del ritmo circadiano. O sea, el modelo de coincidencia externa propone que hay una fase del reloj circadiano sensible a la luz, durante la cual se puede promover la floración si se expone la planta a la luz.

Esto se ha comprobado experimentalmente al verse que las plantas de Arabidopsis son capaces de distinguir entre longitudes de fotoperíodo diferentes, gracias a la integración del reloj circadiano con los niveles de expresión del gen *CO*. Así, cuando las plantas crecen en condiciones de día largo, aproximadamente 12 horas después del amanecer aparece un alto nivel de expresión de CO, que se mantiene alto hasta poco antes del próximo amanecer. En cambio, en condiciones de crecimiento de día corto, este patrón cambia. A las 12 horas, hay un menor pico de expresión que desaparece rápidamente, y le sigue un pico mayor 20 horas tras el amanecer. Por tanto, el reloj circadiano regula la expresión de CO de modo que en días largos se expresa durante la fase luminosa, mientras que en días cortos se expresa durante la fase oscura. Además, hay un

segundo nivel de regulación de las proteínas de CO, en función de su estabilidad frente a la luz. Esta regulación también desempeña un papel importante en la percepción de la duración del día. De hecho, la estabilidad de la proteína del gen *CO* está fuertemente influenciada por la luz. Se degrada rápidamente en la oscuridad, y por tanto sólo las plantas que crecen en condiciones de fotoperiodo de día largo tienen proteína CO estable.

5.1.2. Ruta autónoma

A diferencia de las otras rutas vistas hasta ahora, existe una ruta que no depende de los estímulos externos que reciba la planta. Hay una serie de genes como el *FCA, FY, FPA, FVE, LD y FLD* que cuando son mutados hacen que la planta florezca más tarde, tanto bajo fotoperiodos inductivos de floración como no inductivos. De forma por tanto independiente del fotoperiodo. Es decir, tienen una clara influencia en el tiempo de floración, y además los productos correspondientes a los genes silvestres promueven la floración de manera independiente del fotoperiodo. Por este motivo a esta ruta se le ha dado en llamar *ruta de promoción autónoma*. Los mutantes en algunos genes de esta ruta, además, presentan una fuerte respuesta a la vernalización, lo cual ha hecho deducir que la ruta de promoción por vernalización y la ruta de promoción autónoma actuarían, al menos en parte, de forma redundante.

La ruta autónoma controla los niveles de ARNm de un represor floral, *FLC*. De esta manera, reprimiendo o activando a un represor, se influye sobre la inducción de la identidad de meristemo floral. Esta ruta comprende tres genes que codifican proteínas de unión al ADN (FCA, FPA y FLK), uno que codifica un factor de procesado del ARN (FY), y otros dos que lo hacen para dos factores, FVE y FLD, que regularían FLC epigenéticamente. De este modo, la combinación de un control post-transcripcional y un control epigenético de FLC proporcionaría precisión a la regulación de FLC y por tanto del tiempo de floración.

5.1.3. Ruta de vernalización

En el tema anterior hemos visto que la vernalización tiene un papel fundamental en algunas especies. Pues bien, las señales vernalizantes que recibe la planta son integradas en el control del tiempo de floración mediante la acción coordinada de una serie de genes integrados en la denominada *ruta de vernalización*. Los genes implicados en esta vía fueron identificados, como muchos otros de este tipo de procesos, estudiando la floración de mutantes, en este caso de floración tardía, que siguen manifestando este fenotipo incluso tras un tratamiento de vernalización. Los mutantes *vernalization 1* and *vernalization 2* (*vrn1* y *vrn2*) fueron identificados sobre un fenotipo ya mutante (*fca1*) para el gen *FCA*, implicado en la ruta autónoma, y por tanto en la represión de *FLC*.

En los mutantes dobles *vrn1 fca1* y en los *vrn2 fca1* la acción represora de la floración de FLC se reduce al vernalizar, pero no se mantiene a esos bajos niveles cuando las plantas son devueltas a un ambiente más cálido. Se deduce por

lo tanto que los genes *VRN1* y *VRN2* estarán involucrados en el mantenimiento, pero no en el inicio de la acción represora de *FLC*. La clonación de ambos genes *VRN* ha mostrado que *VRN1* codifica una proteína nuclear con capacidad de unión al ADN y con dominios B3, relacionados con factores de transcripción específicos de plantas. *VRN2* codifica una proteína nuclear con un motivo del tipo "dedo de zinc", y muestra cierta similaridad con las proteínas del tipo Polycomb, que en plantas y animales sueles estar implicadas en procesos de remodelación de la cromatina a través de modificación (metilación) de las histonas asociadas al gen *FLC*. Esto encaja perfectamente con lo que vimos en el tema anterior, donde planteábamos el efecto desmetilador de *FLC* de la vernalización. Ahora sabemos que este efecto vendría mediado por la función de los genes *VRN*, que provocarían cambios en la metilación de las histonas en dominios concretos del gen *FLC*, los dominios K9 y K27 de la histona H3. Esta idea viene refrendada por el hecho de que en los mutantes *vrn* no se observan estos cambios en la metilación de la histona H3 de *FLC*. Se sabe también que *VRN1* actúa por detrás de *VRN2*, y que los niveles de expresión de ambos no se alteran al comienzo de la vernalización.

Sin embargo, hay un tercer gen implicado en la represión de FLC por vernalización (denominado *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*), que sí ve alterados sus niveles. *VIN3* se expresa en los meristemos apicales del tallo y la raíz, donde la planta percibe las bajas temperaturas. La expresión de *VIN3* aumenta con la aparición de temperaturas vernalizantes, lo cual lleva a una disminución de los niveles de *FLC*. Cuando las plantas son expuestas de nuevo a temperaturas más templadas, la expresión de *VIN3* disminuye. Sin embargo, y a pesar de lo dicho, en los mutantes *vin3* no se observa represión de FLC. *VIN3* por tanto, sería esencial para la represión inicial de FLC en la respuesta a vernalización.

En base a todo lo visto, la idea actual sobre la regulación de la vernalización propone que *VIN3* reprime la expresión de *FLC* reduciendo el grado de acetilación de sus histonas. La posterior metilación de esas histonas por parte de *VRN1* y *VRN2* aseguraría que la expresión de *FLC* se mantenga en un estado estable y reprimido cuando las plantas vuelven a estar sometidas a temperaturas más cálidas.

5.1.4. Ruta de las giberelinas

Ya hemos visto que las giberelinas aplicadas de forma exógena tienen un claro papel en la inducción de la floración. Pero además, los niveles de giberelinas producidos de forma endógena por la planta son capaces de generar una señal que parece jugar un papel esencial en promover la floración bajo fotoperiodos no inductivos. Por ejemplo, los mutantes de Arabidopsis que no sintetizan giberelinas, o que son insensibles a esta hormona, nunca florecen en condiciones de día corto.

El estudio de mutantes dobles, en este caso con mutaciones que provocan deficiencias en la biosíntesis de GA (mutaciones en los genes *ga1, ga2 y ga3),* junto con mutaciones en genes de la ruta del fotoperíodo o la autónoma, han permitido analizar las interacciones entre giberelinas, fotoperiodo y la ruta autónoma. Estos análisis evidenciaron que las giberelinas ejercen su efecto a través de una ruta diferente a la ruta autónoma o la de internalización del fotoperiodo. Se trata pues de una ruta independiente, denominada *ruta de las giberelinas*. No obstante, en determinadas condiciones, como por ejemplo las de día largo, existe una redundancia entre la ruta de promoción por giberelinas y la dependiente del fotoperiodo.

Dentro de esta ruta, de nuevo el estudio de mutantes ha permitido identificar una serie de genes involucrados en la transducción de la señal de las giberelinas, como el *SPINDLY (SPY* o *GAS1*), que al parecer codifica una proteína represora de esta ruta, pues los mutantes *spy* presentan un fenotipo similar al resultante de aplicar giberelinas exógenas. Otros genes como el *GA-INSENSITIVE (GAI* o *RGA2*) y el *RGA* o *GRS* (*Repressor of the ga1-3 mutant*) tendrían un papel opuesto, puesto que los mutantes *gai* y *rga* presentan fenotipos similares a los de los mutantes en genes de la ruta de biosíntesis de las giberelinas.

5.2. Genes de identidad del meristemo vegetativo

Hasta ahora hemos visto una serie de factores, que en último término modulan la expresión de una serie de genes que determinan donde y cuando florecer (los genes de regulación del tiempo de floración). Pero una vez eso está determinado, el siguiente paso ha de ser la iniciación del desarrollo floral en sí. Para esto hacen falta otra serie de genes. En definitiva, los genes de regulación del tiempo de floración controlan otro grupo, mucho más reducido, de genes de iniciación floral.

Para que se de la iniciación floral (formación de los meristemos florales) se requiere la **acción antagonista** de dos tipos de genes: los *genes de identidad del meristemo vegetativo* y los *genes de identidad de meristemo floral*, que a continuación veremos. Ambos grupos de genes son activados por los genes de tiempo de floración como consecuencia de la inducción floral, y de la interacción entre ellos surgirá el fenotipo final, vegetativo o floral.

Por un lado los genes de identidad del meristemo vegetativo reprimen la expresión de los genes de identidad de meristemo floral impidiendo su expresión en el meristemo apical. De esta forma, mientras los genes de identidad del meristemo vegetativo mantengan su expresión, ésta impedirá la expresión de los de identidad de meristemo floral.

Dentro de este grupo, el más relevante es *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*. Este gen especifica el crecimiento indeterminado y no floral del meristemo inflorescente apical, manteniendolo como vegetativo mientras permanezca activa su expresión. A esta conclusión se ha llegado al evidenciarse que (1) en mutantes *tfl1*, el meristemo inflorescente apical acaba desarrollando una flor, y (2) que

la expresión ectópica de *TFL1* convierte en vegetativos los meristemos florales laterales.

5.3. Genes de identidad del meristemo floral

Los genes de identidad de meristemo floral son los que especifican el destino floral de los nuevos meristemos laterales. Es decir, determinan si estos meristemos desarrollarán flores en lugar de hojas o ramas. Entre ellos podemos citar los genes *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*), *CAULIFLOWER* (*CAL*), *FRUITFULL* (*FUL*, previamente llamado *AGL8*), *APETALA2 (AP2)* y *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*). De entre ellos, los que parecen jugar un papel principal en la especificación de los meristemos florales son *LFY* y *AP1*, mientras que los otros juegan un papel secundario.

5.3.1. Estudios con mutantes para los genes LFY y AP1

Como vimos al comienzo de este tema, la gran mayoría de datos de que se disponen sobre los genes que intervienen en el desarrollo floral provienen del estudio de mutantes de Arabidopsis en los que se inactiva la función del gen objeto de estudio. Así, se ha observado que las mutaciones en *LFY* y *AP1* afectan a la identidad del meristemo de manera que las flores son reemplazadas por estructuras similares a inflorescencias, cuyo carácter inflorescente se va atenuando progresivamente cuanto más cerca están de las posiciones apicales del tallo. En plantas mutantes homozigotas para los alelos fuertes *lfy*, en el lugar donde aparecerían las primeras flores en la inflorescencia silvestre (*wild type*), se desarrollan inflorescencias secundarias sustentadas por hojas. En los mutantes fuertes *ap1*, en el lugar donde en el individuo silvestre (*wild type*) deberían aparecer las flores basales de la inflorescencia, aparecen inflorescencias secundarias no sustentadas por hojas. Además, los dobles mutantes *lfy ap1*, independientemente de la fuerza de los alelos mutantes combinados, muestran una fuerte intensificación de las transformaciones de flores a inflorescencias, aunque finalmente llegan a producir algunas estructuras florales.

Todos estos fenotipos mutantes sugieren que los genes *LFY* y *AP1* interaccionan para especificar la identidad del meristemo floral, y que tienen funciones parcialmente redundantes. Además, *LFY* y *AP1* se regulan positivamente de forma recíproca, pues se ha visto que en los mutantes *lfy*, el inicio de la expresión de *AP1* se retrasa, y en plantas que expresan constitutivamente *AP1*, *LFY* se expresa prematuramente en meristemos inflorescentes, que pasan a transformarse en florales.

5.3.2. Estudios de expresión constitutiva de los genes LFY y AP1

Otra estrategia muy útil para estudiar la función de un gen es hacer que se exprese de forma constitutiva. Es decir, diseñar una planta transgénica en la que el gen objeto de estudio esté bajo el control de un promotor que se exprese

siempre, en cualquier momento y en cualquier tejido. Para ello, una de las mejores opciones es utilizar el promotor 35S. El promotor 35S es también conocido como promotor CaMV, pues es el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), que provoca la enfermedad del mosaico de la coliflor en varias hortalizas, como la coliflor, el bróculi, la col y la colza. Pues bien, cuando diseñamos plantas que, bajo el control del promotor 35S, expresan constitutivamente los genes *LFY* (plantas 35S::*LFY*) o *AP1* (plantas 35S::*AP1*), se produce una dramática aceleración de la transición floral. Es decir, se forman flores en todos los meristemos disponibles, apicales y laterales. Además, las plantas 35S::*LFY* y 35S::*AP1* florecen antes que las plantas silvestres, tanto bajo condiciones de día largo como de día corto. Estos datos sugieren que ambos genes son suficientes para especificar los meristemos florales en el contexto de un meristemo silvestre.

Un paso más en el estudio del papel de estos genes en la identidad del meristemo floral sería estudiar qué pasaría en aquellas plantas mutantes para uno de estos genes y que a la vez sobreexpresaran el otro. Esto también se consiguió, y los resultados fueron bastante clarificadores en cuanto a la posición de ambos genes en la ruta génica. Se vio que en las plantas 35S::*AP1 lfy (LFY* no funciona pero *AP1* se sobreexpresa), los meristemos laterales se convertían a meristemos florales. En cambio, las plantas 35S::*LFY ap1 (AP1* no funciona pero *LFY* se sobreexpresa) seguían mostrando los defectos típicos del mutante *ap1*. En pocas palabras, estos datos indicaban que AP1 actúa por detrás de LFY.

5.3.3. Integración de las rutas de tiempo de floración con la respuesta floral de los genes LFY y AP1

Aunque acabamos de ver que los efectores directos de la respuesta floral son *LFY* y *AP1*, hay otros genes que actúan por encima de ellos, integrando las señales de las diferentes rutas involucradas en la transición a floración vistas en el tema anterior. Estos genes son *FLOWERING LOCUS T (FT), FLOWERING LOCUS C (FLC)* y *SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC)*. Como podemos ver en la Figura 5.2, las diferentes rutas implicadas en la transmisión de las señales externas relativas al fotoperiodo o a la vernalización, junto con la ruta autónoma y la de las giberelinas, terminan en estos genes *FT*, *SOC*, y *FLC* que son los que actúan inmediatamente por encima de *AP1* y *LFY*. En el caso de *FLC*, la acción de este gen es represora, inhibiendo la expresión de *FT* y *SOC*, y actuando por tanto indirectamente sobre *LFY* y *AP1*. En el caso de FT y SOC, su efecto sería activador, directamente sobre *LFY* y *AP1*.

5.4. Genes de identidad de órgano floral

Como acabamos de ver en la Figura 5.2, la expresión de LFY y AP1 termina con la especificación de las características del meristemo floral. Lo que queda ahora es que se desarrolle la flor. Para ello, es necesario el concurso de un nuevo conjunto de genes, denominados *genes de identidad de órgano floral*. Estos

genes codifican para proteínas que en general actúan como factores de transcripción que a su vez regulan la expresión de muchos otros genes implicados en aspectos más concretos del desarrollo floral. En esta sección veremos cuales son los genes de identidad de órgano floral y de qué manera ejercen su función regulatoria de este proceso.

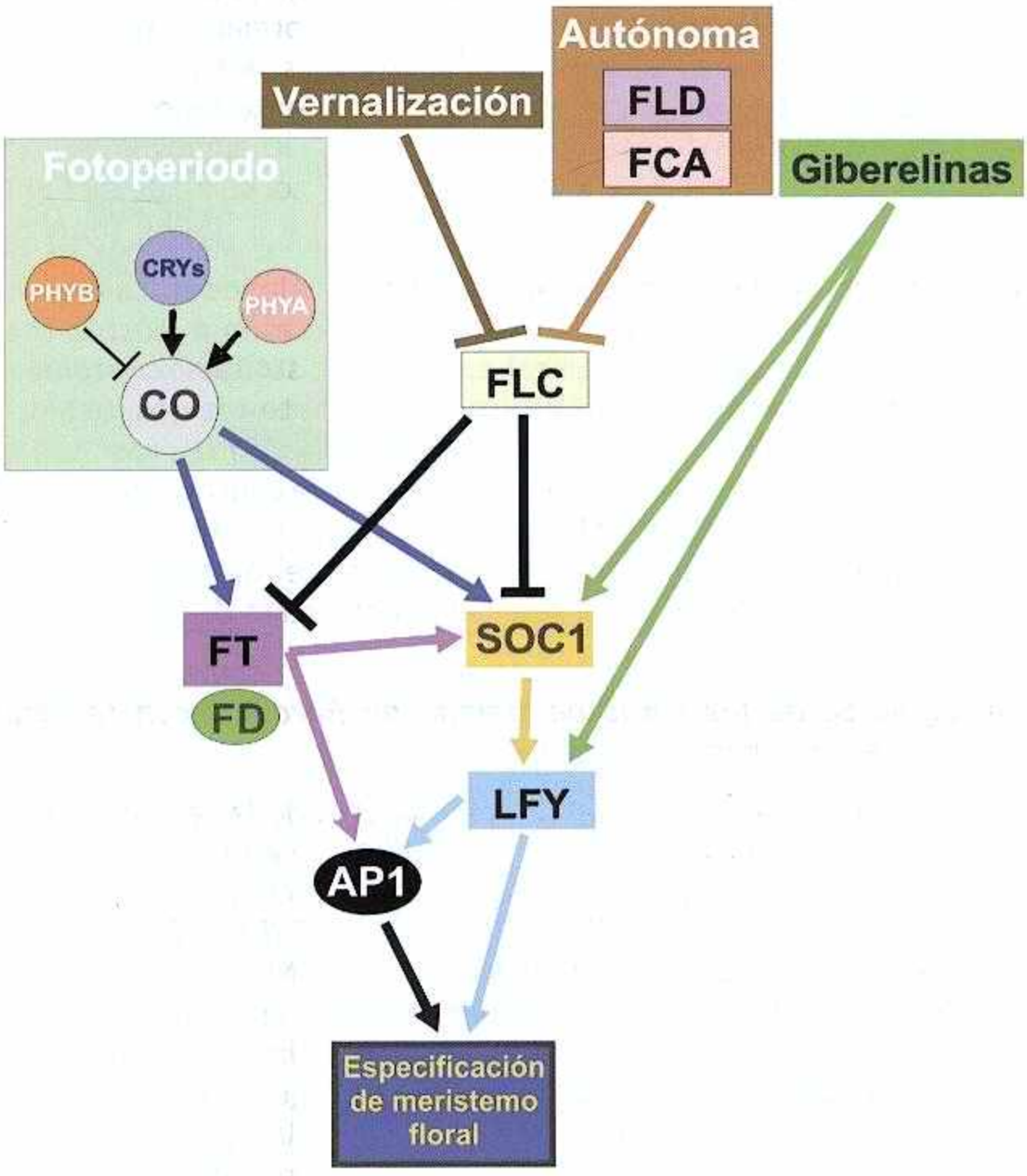


Figura 5.2: Integración de las principales rutas de inducción de floración con los genes de identidad de meristemo floral *LFY* y *AP1* para la especificación de dicha identidad.
Imagen de Seguí Simarro.

5.4.1. Genes homeóticos y MADS-box

Llegados a este punto, se hace necesario definir un concepto como el de *genes homeóticos*. Los genes homeóticos, también denominados *homeogenes* o *genes homeobox*, son aquellos genes implicados en el desarrollo de un organismo, sea animal o vegetal. Por tanto, serán los genes responsables de establecer la

arquitectura del desarrollo de las plantas y los animales, influyendo sobre la expresión de otros genes. Es fácil intuir que una mutación en los genes homeóticos podría originar la aparición ectópica de órganos, es decir que surgieran órganos en lugares inadecuados. Aunque no existe casi ninguna similitud entre las secuencias de los genes homeóticos de animales y vegetales, su mecanismo de actuación es el mismo, y es por eso por los que se les considera conjuntamente. Centrándonos en el caso que nos ocupa, en las plantas muchos de estos genes homeóticos de identidad de órgano floral pertenecen al grupo denominado "*genes MADS-box*".

Los genes MADS-box tienen una secuencia de nucleótidos característica que codifica proteínas con una secuencia denominada "*dominio MADS*". Esta secuencia permite a estas proteínas unirse a secuencias específicas de ADN, regulando su transcripción. El resto de la secuencia de los genes MADS-box es distinta para cada gen, según la función reguladora que vaya a ejercer. La presencia de genes MADS-box controlando la identidad floral es común a muchas especies, incluso genéticamente lejanas. De hecho, los genes MADS-box *ortólogos* (que comparten una misma función) de especies muy distantes genéticamente se parecen más entre sí que los genes MADS-box de la misma especie pero con funciones distintas. Esto tiene una gran significación evolutiva, pues indica que los mecanismos de la identidad floral en plantas están altamente conservados, por lo que posiblemente aparecieran al principio de la historia evolutiva de las plantas.

Como ya sabemos del tema 3, la mayoría de las plantas cuentan con cuatro capas concéntricas de hojas modificadas o verticilos (Figura 3.5), el verticilo 1° o cáliz (el más externo, formado por sépalos), el verticilo 2° o corola (compuesta por los pétalos), que rodea al verticilo 3° o androceo (agrupa a los estambres), y finalmente el verticilo 4° o gineceo (el más interior, con los carpelos femeninos que forman el pistilo). Pues bien, lo que va a determinar que una célula del meristemo floral se convierta en sépalo, pétalo, estambre o carpelo, será la expresión de toda una serie de genes homeóticos, de acuerdo con un modelo denominado *modelo ABC* que veremos con más detalle a continuación.

5.4.2. El modelo ABC de identidad de órgano floral

En 1991, Coen y Meyerowitz publicaron en *Nature* un nuevo modelo de interacción génica que explicaba de manera bastante elegante cómo la expresión, conjunta o no, de determinados grupos de genes es la responsable de la diferenciación de cada uno de los verticilos florales. A este modelo se le conoce como el *Modelo ABC*. Hasta la fecha, es el modelo que mejor explica lo que hasta ahora se sabe sobre los mecanismos de formación de la flor.

Se le denomina modelo ABC porque los genes intervinientes se clasifican en tres grupos: A, B y C. Cada grupo de genes se expresaría únicamente en dos de los cuatro verticilos florales, bajo las siguientes premisas:

Los genes A se expresarían en los dos verticilos externos

- Los genes B en los dos verticilos intermedios
- Los genes C en los dos verticilos internos
- Los genes A y los C son mutuamente excluyentes. Es decir, la expresión de genes de uno de estos grupos bloquea la del otro, de modo que los dos no pueden expresarse al mismo tiempo.

Según la combinación de genes que se expresen a la vez, se desarrollará un verticilo u otro, de acuerdo con el esquema mostrado en la Figura 5.3. Allá donde se expresen únicamente genes del grupo A, aparecerán sépalos. Allá donde coincida la expresión de genes de los grupos A y los B aparecerán pétalos. Donde coincidan los grupos B y C se desarrollarán estambres. Finalmente, si solo se expresan genes del grupo C, se generarán carpelos.

ACTIVIDAD		sépalo	pétalo	estambre	carpelo
	A				
	B				
	C				
VERTICILIO		1	2	3	4

Figura 5.3: Expresión de los distintos órganos florales en función de la combinación de genes ABC que se de en cada verticilo.
Imagen de Seguí Simarro.

Combinando estas premisas con las distintas regiones (verticilos) del incipiente meristemo floral, se llega a las siguientes conclusiones (Figura 5.4):

- Como hemos dicho que los genes del grupo A se expresan en los dos verticilos más externos, lo normal es que el primer verticilo esté formado por sépalos.
- Puesto que los A se expresan en los dos verticilos más externos y los B en los dos verticilos medios, la expresión de los A y los B coincidirá en el segundo verticilo. Por tanto, se formarán pétalos en el segundo verticilo.
- Puesto que los B se expresan en los dos verticilos medios y los C en los dos verticilos más internos, la expresión de los B y los C coincidirá en el tercer verticilo. Por tanto, se formarán estambres en el tercer verticilo.
- Por último, los genes del grupo C se expresan en los dos verticilos más internos, y en el más interno de todos, su expresión es exclusiva. Por tanto, es de esperar que el último verticilo, el cuarto, esté formado por sépalos.

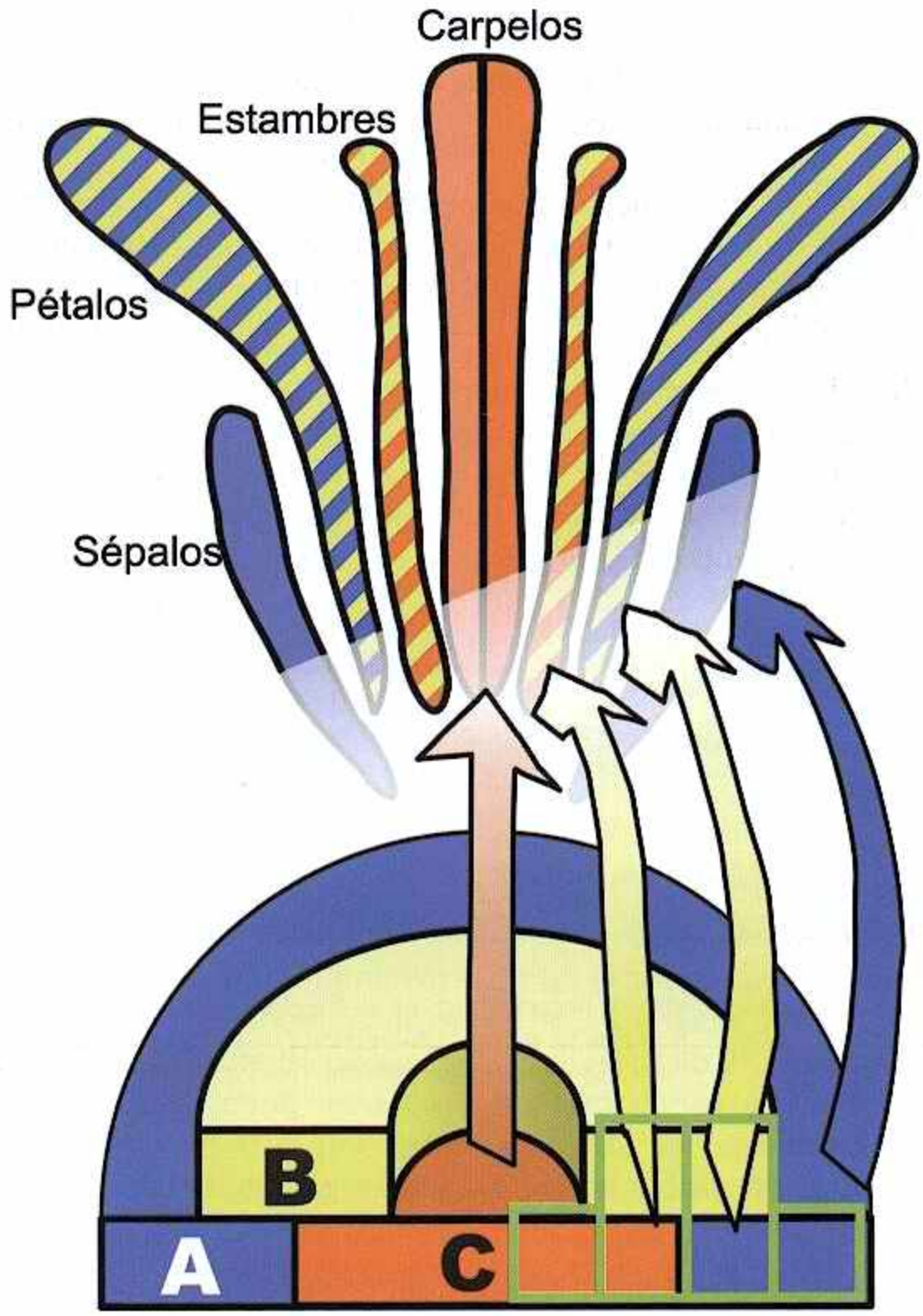


Figura 5.4: Modelo ABC de desarrollo floral.
Adaptación de la figura original de Madeleine Price Ball, de dominio público, de Wikimedia Commons. (http://commons.wikimedia.org)

Como ejemplos de genes de los grupos ABC podemos citar en *Arabidopsis thaliana* los *APETALA1 (AP1)* y *APETALA2 (AP2)* como ejemplos del grupo A, los *APETALA3 (AP3)* y *PISTILLATA (PI)* como ejemplos del grupo B y los *AGAMOUS (AG)* como ejemplos del grupo C. Salvo *AP2*, el resto de genes de identidad de órgano floral son de tipo MADS-box, muy relacionados además entre sí tanto estructural como funcionalmente. En *Antirrhinum majus*, otra especie muy utilizada en el estudio de los genes de desarrollo floral, tenemos los genes *SQUAMOSA (SQUA)*, *LIPLESS1 (LIP1)* y *LIPLESS2 (LIP2)* como ejemplos de genes del grupo A, los *DEFICIENS (DEF)* y *GLOBOSA (GLO)* como ejemplos del grupo B, y los *PLENA (PLE)* y *FARINELLI (FAR)* como ejemplos del grupo C.

5.4.3. *Mutantes florales afectados en los genes ABC*

Una de las cualidades de un buen modelo teórico es que sea capaz de predecir qué pasaría si se modificara alguna de sus premisas básicas. Y esto precisamente es lo que sucede con el modelo ABC. Teniendo presentes sus reglas básicas, este modelo permite predecir qué fenotipo tendría una flor si se mutaran, eliminando su función, los genes de alguno de los grupos A, B o C de desarrollo floral. Es fácil suponer que si se desactiva la expresión de uno de estos genes homeóticos, aparecerán combinaciones "raras" de órganos florales. Pero ¿cuáles?

Por ejemplo, si desactiváramos el gen *APETALA2* (*AP2*, tipo A), según las reglas establecidas en el modelo ABC tendríamos una predicción como la que se muestra en la Figura 5.5. En ella podemos observar como la expresión de los genes B se da donde debe, pero al no haber expresión de los A, y teniendo en cuenta que los A y los C son mutuamente excluyentes (la no expresión de uno en un verticilo dado permite la del otro), no hay inconveniente ya en que los C se expresen también en el primer y segundo verticilo, además de en los suyos propios (tercero y cuarto). Por tanto tendremos las siguientes combinaciones:

- Verticilo 1: carpelos
- Verticilo 2: estambres
- Verticilo 3: estambres
- Verticilo 4: carpelos

ACTIVIDAD		carpelo	estambre	estambre	carpelo
	A				
	B				
	C				
VERTICILIO		1	2	3	4

Figura 5.5: Modelo ABC de desarrollo floral para un mutante en genes del grupo A. Imagen de Seguí Simarro.

Es decir, carpelos en vez de sépalos y estambres en vez de pétalos, con el siguiente orden: carpelo-estambre-estambre-carpelo. Esta sería el fenotipo predicho por el modelo ABC, y este también ha sido el fenotipo observado experimentalmente por aquellos investigadores que han conseguido mutar genes del grupo A, como los *APETALA2*.

Pongamos otro ejemplo. Si desactiváramos el gen *AGAMOUS* (*AG*, tipo C), tendríamos una predicción como la que se muestra en la Figura 5.6. En ella podemos observar como la expresión de los genes B se da donde debe, pero al no haber expresión de los C, los A se expresarían también en el tercer y cuarto verticilo. Tendríamos por tanto las siguientes combinaciones:

- Verticilo 1: sépalos
- Verticilo 2: pétalos
- Verticilo 3: pétalos
- Verticilo 4: sépalos

ACTIVIDAD		sépalo	pétalo	estambre	carpelo
	A				
	B				
	C				
VERTICILIO		1	2	3	4

Figura 5.6: Modelo ABC de desarrollo floral para un mutante en genes del grupo C. Imagen de Seguí Simarro.

De nuevo, esta predicción se ha vuelto a ver confirmada en la realidad, al mutar genes como el AGAMOUS, de tipo C. Posteriormente se obtuvieron mutantes para genes del grupo B, e incluso dobles y triples mutantes. ¿Cuál sería el fenotipo esperable de un triple mutante? Si no se expresa ningún gen de identidad de órgano floral, lo previsible sería que no se formara ningún organo floral. Y efectivamente, eso es lo que se observó en el triple mutante: ningún órgano floral, sino hojas verdes, vegetativas, saliendo de todos los verticilos. Como vemos, los fenotipos predichos por el modelo ABC se ajustan perfectamente a lo observado, lo cual no hace sino confirmar la validez de este modelo.

5.4.4. Revisiones del modelo ABC: genes D y E

Además de los genes A, B y C vistos hasta ahora, existen también otros, denominados D y E, que se añaden al modelo, proporcionándole cierta complejidad adicional, pero sobre todo ajustándolo más a lo que realmente ocurre en las flores. En 1994, el estudio de líneas de cosupresión (silenciamiento génico postranscripcional de dos genes) de petunia y tomate llevó a la identificación de una nueva función, y por tanto de un nuevo grupo de genes potencialmente implicados en el modelo de desarrollo floral. Se trataba de los genes de la familia *SEPALLATA* (*SEP1, SEP2 y SEP3*), que se denominarían genes del grupo E. Estos genes se integrarían dentro del modelo ABC expresándose en los 3 verticilos más internos. Sin embargo, la función de los genes E fue luego ligeramente modificada al demostrarse que no solo se requería su función en los tres verticilos más internos, sino también en el cuarto, es decir, en todos.

Un año más tarde que los genes del grupo E, en 1995, se identificó en petunia una nueva familia de proteínas de tipo MADS-box, con una relativa homología con las codificadas por los genes del grupo C, también con un papel en el

desarrollo floral, pero distinta a las C y a las de los otros dos grupos. A los genes que codificaban estas proteínas se les denominó genes del grupo D. Estos genes son los *FLORAL BINDING PROTEIN 7* (*FBP7*) y *FLORAL BINDING PROTEIN 1L* (*FBP1L*). En 2003 se encontraron genes equivalentes en *Arabidopsis* (por ejemplo el *SEEDSTICK, STK)*, donde también se vio que intervenían en la regulación del desarrollo del carpelo, las placentas y del óvulo, e incluso de estructuras relacionadas con la dispersión de semillas. Al parecer, los productos de los genes del grupo D interaccionan con los de los grupos A, B y C aportándoles dominios de activación transcripcional.

5.5. Genes catastrales

Los *genes catastrales* o *intermedios* (Figura 5.7) son los genes homeóticos que marcan los límites espaciales de expresión de los genes de identidad floral. Dicho de otro modo, restringen los patrones de expresión espacial de otros genes de identidad de órgano floral, estableciendo "límites" a su efecto. O más sencillo aún, son los que determinan donde se forma cada órgano floral. Estos genes no se denominan "catastrales" por casualidad. De hecho, se utiliza el término "catastral" por analogía con el catastro, que es el mapa o descripción que muestra los límites de una propiedad con finalidad fiscal. Por tanto, son estos genes los que decidirán qué ruta génica se ha de activar en cada lugar del meristemo floral. Si fallan estos genes, aparecerán flores anómalas, con órganos en lugares donde no deberían estar ellos, sino otros. Este sería por ejemplo el caso del gen *SUPERMAN (SUP)*, que reprime la expresión de los genes del grupo B en cuarto verticilo, y cuyo fenotipo mutante sería la aparición de estambres en el cuarto verticilo (por coexpresión de genes del grupo B y C), en lugar de los habituales carpelos. Otros ejemplos de genes catastrales serían *LEUNIG (LUG)* o *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)*.

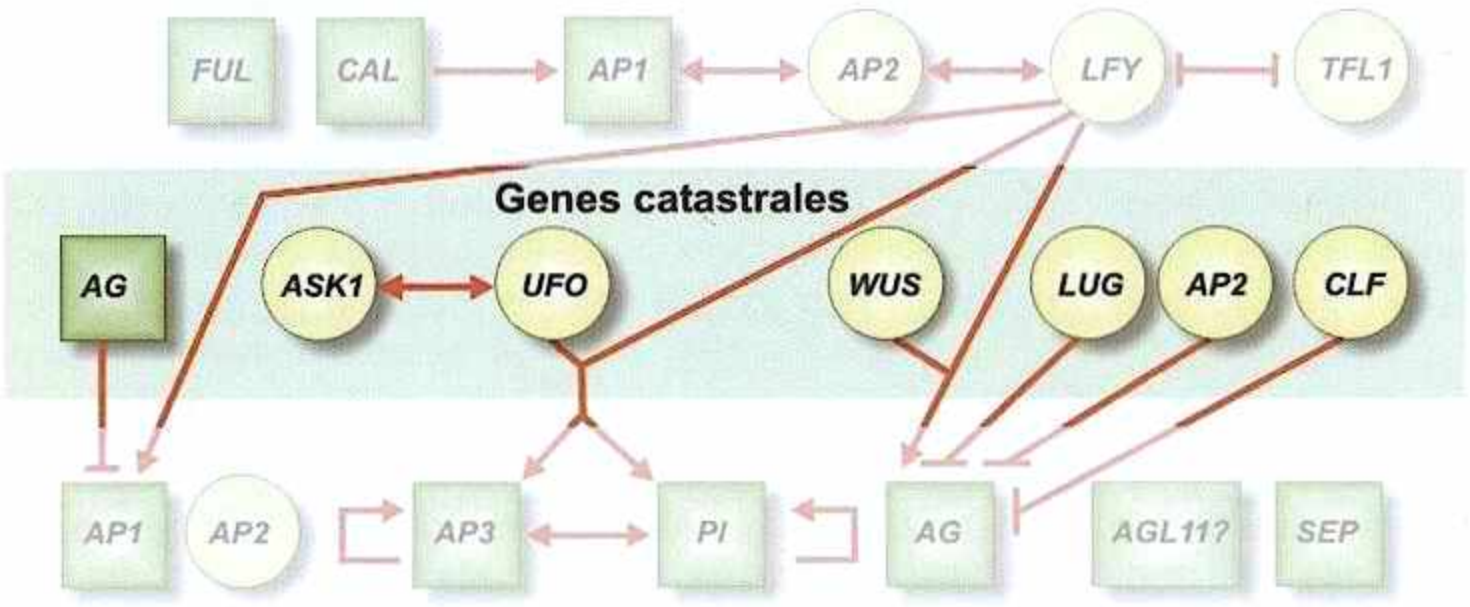


Figura 5.7: Genes catastrales. Basado en Soltis et al (2002), Trends in Plant Sciences, 7: 22-31. Imagen de Seguí Simarro.

5.6. Modelo de la inducción floral en Arabidopsis

En base a lo visto hasta ahora en cuanto a las rutas génicas que intervienen en la inducción de la floración y en el desarrollo de los distintos órganos florales, en 2002 Douglas E. Soltis y su equipo elaboraron un modelo global de integración de las distintas rutas génicas (Figura 5.8) que cubre todos los procesos desde la percepción de las señales externas por parte de la planta hasta la activación de los genes concretos implicados en la formación de cada uno de los órganos florales. En él se incluyen las distintas interacciones (tanto de activación como de represión) conocidas hasta esa fecha entre los genes de tiempo de floración, los genes de identidad de meristemo, los genes catastrales, los genes de identidad de órgano y los genes de formación de órganos florales. Para

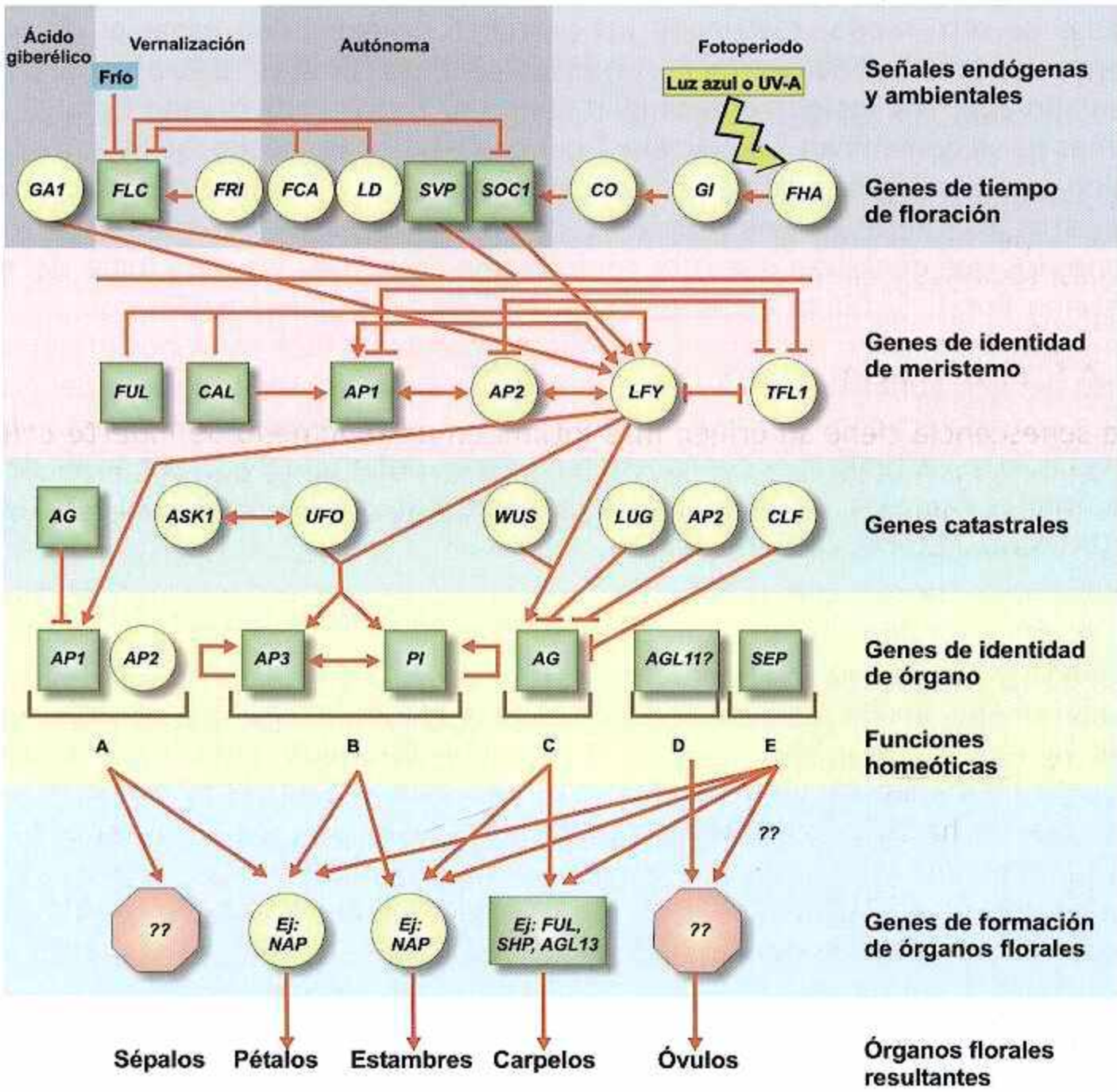


Figura 5.8: Integración de las distintas rutas génicas implicadas en la inducción de la floración en *Arabidopsis thaliana*.
Basado en Soltis et al (2002), Trends in Plant Sciences, 7: 22-31.
Imagen de Seguí Simarro.

el nivel de complejidad y detalle esperable de un libro como el presente, este es uno de los mejores modelos para ilustrar todo este complejo entramado de rutas génicas interconectadas.

5.7. Senescencia y abscisión

La planta necesita deshacerse de aquellos tejidos u órganos que han de desprenderse de la planta para realizar su función (los frutos, por ejemplo), o que han sido infectados por un patógeno (para frenar la expansión de la infección) o que sencillamente ya no le son útiles a la planta (por ejemplo las hojas en otoño). En este último caso estarían también las flores que, una vez pasado el periodo de polinización, no han sido fecundadas. En este caso, la flor no supone más que un estorbo y una fuente de consumo energético totalmente prescindible. Por ello, como etapa final en el ciclo floral, aquellas flores no fecundadas, y que por tanto no pasarán a transformarse en fruto como veremos en temas posteriores, entran en un proceso de *senescencia* (envejecimiento) y posteriormente *abscisión* (desprendimiento de la planta que las sustenta), que pondrá fin a sus días. Este proceso, además cuenta con la ventaja añadida de que la planta puede reciclar, en la mayor parte posible, los nutrientes minerales del órgano senescente y transportarlos a los tejidos funcionales o nuevos, ahorrando así recursos y energía.

5.7.1. Senescencia

La senescencia tiene su origen más íntimo en un fenómeno de *muerte celular programada*. A esto (la muerte celular programada) se le denomina *apoptosis* en células animales. Aunque la apoptosis de células animales no es exactamente comparable a la muerte programada de células vegetales, cabe mencionar como nota curiosa que el término "apoptosis" proviene del griego, donde se utilizaba para describir la caída de pétalos y hojas, fenómenos claramente relacionados con la senescencia. La senescencia floral se da tras la antesis y la polinización. En las flores polinizadas se da la fecundación, y se desarrollan por tanto semillas y frutos. Mientras tanto, los estambres, el cáliz y la corola, que ya no tienen utilidad alguna, inician su proceso de senescencia. Aquella flor que no ha sido fecundada, ya no tiene razón alguna de perdurar (siempre desde un punto de vista estrictamente biológico), y por tanto, toda ella entra en senescencia. En cualquiera de los dos casos suele ser la corola (pétalos) lo que primero entra en senescencia (Figura 5.9).

Las células senescentes permanecen metabólicamente activas durante todo el proceso, aunque sufren un cambio de metabolismo encaminado al reciclaje de nutrientes. Señales hormonales o ambientales dispararán el inicio de cascadas de transducción de señal que acabarán en la activación o represión de una serie de genes, lo que conducirá a una reorganización estructural y metabólica. Todo esto se da dentro de un contexto de fragmentacion del ADN, rápidas caidas en los niveles de proteínas, ARN y ADN, inducción de nucleasas (DNasas y RNasas)

Figura 5.9: Inicio de la senescencia en la corola de una planta de tomate (*Solanum lycopersicum*).
Imagen de Seguí Simarro.

específicas de senescencia, y producción de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) que son combatidos por los mecanismos antioxidantes propias de células intactas. Cuando los mecanismos antioxidantes son desbordados, el estrés oxidativo desorganizará irreversiblemente la arquitectura celular, provocando la **autólisis** (ruptura de los compartimentos líticos celulares), muerte celular generalizada, y por tanto la muerte de la flor como punto final de la senescencia (Figura 5.10).

Figura 5.10: Flores senescentes de una planta de tomate (*Solanum lycopersicum*).
Imagen de Seguí Simarro.

5.7.2. Control de la senescencia

La senescencia, como hemos visto, es un proceso común a hojas, frutos y flores. Es en las primeras en las que más se han estudiado los distintos mecanismos que intervienen en la entrada en senescencia. El etileno, uno de los principales factores reguladores del crecimiento vegetal (fitohormonas) está detrás de muchos de estos procesos, siendo el principal inductor hormonal de la senescencia. Por ejemplo, en clavel se ha observado la síntesis de numerosos transcritos de proteínas implicadas en la ruta biosintética del etileno cuando las flores entran en senescencia. Se sabe también que en orquídeas, la senescencia floral viene desencadenada por un aumento de la sensibilidad al etileno tras la polinización. Por el contrario, otras fitohormonas como las citoquininas inhiben la senescencia.

En los mecanismos de regulación de la senescencia están implicados una serie de genes que codifican enzimas proteolíticos, otros implicados en la movilización de nutrientes, otros relacionados con la defensa frente a patógenos y algunos otros de función todavía por determinar. En el caso concreto de la senescencia floral, se ha relacionado con ella la síntesis de RNasas en Arabidopsis, el ácido abscísico (ABA) en ciertos tipos de lirio, lipoxigenasas y otra serie de productos del metabolismo de los ácidos grasos en petunia, y en geranio una serie de proteínas homólogas a la glutation transferasa, cuyo gen se activa por etileno.

5.7.3. Abscisión

La abscisión es la pérdida programada de un órgano (hoja, flor, fruto) de la planta, que tiene lugar al disolverse las paredes de un grupo de células especialmente localizadas en el pecíolo en hojas, el pedúnculo en frutos y el pedicelo en la flor. Estas células forman parte de la denominada *zona de abscisión* (Figura 5.11) y tienen una serie de características propias como un menor tamaño, una mayor densidad en el citoplasma, y la no lignificación de sus paredes celulares. Este último es un requisito esencial para poder separarse fácilmente del resto de la planta.

La abscisión se produce en tres etapas: en primer lugar la etapa de iniciación o activación por ciertos factores ambientales. Después, la etapa de desarrollo, donde tienen lugar los cambios bioquímicos y estructurales de las células de la zona de abscisión. Dentro de la zona de abscisión se diferenciará una zona de separación en la que las células crecen y la lámina media es disuelta por la acción de pectinasas y celulasas. Esto hace que la zona de abscisión pierda consistencia al tiempo que se estrecha (Figura 5.12). Las células de la cara más próxima a la planta se suberizan y el órgano caerá por su propio peso (frutos) o por factores ambientales (viento). Por último, la etapa de separación, en la que tiene lugar la separación física del órgano. Las heridas en las células de la planta se sellan con depósitos de suberina, lignina y sustancias gomosas en los vasos.

Figura 5.11: Zona de abscisión en flores senescentes de una planta de tomate (*Solanum lycopersicum*).
Imagen de Seguí Simarro.

Figura 5.12: Crecimiento y estrechamiento de la zona de abscisión en una flor senescente de una planta de tomate (*Solanum lycopersicum*).
Imagen de Seguí Simarro.

5.7.4. Control de la abscisión

El control de la abscisión es llevado a cabo por auxinas y etileno. El transporte polar de auxinas desde el órgano a la planta, provoca un alto nivel de las mismas en la zona de abscisión y una inhibición de la síntesis de etileno. Cuando se inicia la senescencia, el nivel de auxinas disminuye y se estimula la síntesis de etileno que activará la transcripción de genes de enzimas hidrolíticos.

5.8. Resumen

De los visto en este tema podemos extraer las siguientes ideas principales:

- Para que una flor se forme, la planta ha de ser expuesta al estímulo(s) floral(es) adecuados(s). Esto dispara una serie de cascadas de señalización que acaban activando los genes de desarrollo floral.
- Hay cuatro grupos principales de genes que controlan el desarrollo floral:
  - los *genes de control del tiempo de floración*, que determinan si las condiciones internas y sobre todo externas son las adecuadas para dar el paso de meristemo vegetativo a meristemo floral.
  - los *genes de identidad de meristemo floral*: han de activarse para que se inicie el paso de meristemo (vegetativo o inflorescente) a flor. Son los que activan a los genes de identidad de órgano floral.
  - los genes *de identidad de órgano floral*: codifican proteínas que regulan la expresión de otros genes cuyos productos intervienen en la formación o la función de los distintos órganos florales.
  - los *genes catastrales*: regulan la expresión de los genes de identidad de órgano floral, estableciendo límites en su expresión

- Todos estos grupos de genes están íntimamente relacionados entre sí de manera que unos permiten (activan) la función de los siguientes en la cascada génica, o bien reprimen dicha función.
- El conocimiento de estos genes y sobre todo de su función en todo este proceso nos está permitiendo una comprensión cada vez más profunda y completa del proceso de la floración. Esto, a su vez abre las puertas a la utilización de estas propiedades con fines biotecnológicos.
- Cuando una flor ha cumplido su función biológica, entra en *senescencia*, lo cual desencadena su muerte y su *abscisión* (desprendimiento) de la planta que la originó.

5.9. Información adicional

- Blázquez M.A., Weigel D. (2000). Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. Nature, 404:889-892.
- Blázquez M.A., Green R., Nilsson O., Sussman M.R., Weigel D. 1998. Gibberellins promote flowering of Arabidopsis by activating the LEAFY promoter. The Plant Cell, 10:791-800.
- Bolaños, L. Muerte celular programada. Senescencia y abscisión (recurso online). http://web.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/FisioVegetal/TeoriaFisioVegetal/Resumenes/tema26.htm
- Bowman J.L., Smyth D.R., Meyerowitz E.M. 1989. Genes Directing Flower Development in Arabidopsis The Plant Cell, 1(1): 37-52.
- Bowman J.L., Drews G.N., Meyerowitz E.M. 1991. Expression of the Arabidopsis floral homeotic gene AGAMOUS is restricted to specific cell types late in flower development. Plant Cell, 3: 749-758.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature, 353, 31–37.
- Colombo L., Franken J., Koetje E., van Went J., Dons H.J., Angenent G.C. and van Tunen A.J. 1995. The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity. Plant Cell, 7(11): 1859-1868.
- Favaro R., Pinyopich A., Battaglia R., Kooiker M., Borghi L., Ditta G., Yanofsky M.F., Katec M.M. and Colombo L. 2003. MADS-Box Protein Complexes Control Carpel and Ovule Development in Arabidopsis. The Plant Cell, 15: 2603-2611.
- Jack T. 2004. Molecular and Genetic Mechanisms of Floral Control. The Plant Cell, 16: S1-S17.
- Orzaez D., Granell A. 1997. DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. Plant Journal, 11:137-144.

- Pelaz S., Ditta G.S., Baumann E., Wisman E., Yanofsky, M.F. 2000. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. Nature, 405: 200-203.
- Plant Biology.com (recurso online). http://www.plant-biology.com. Dentro de su apartado "*Flowering Time Menu*", son interesantes todos sus apartados, directamente relacionados con los contenidos de este tema y del anterior.
- Quesada V., Dean C., Simpson G.G. 2005. Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering. International Journal of Developmental Biology, 49: 773-780.
- Rijpkema A., Gerats T., Vandenbussche M. 2006. Genetics of floral development in Petunia. In: Advances in botanical research—Soltis D.E., Soltis P.S., Leebens-Mack J., eds. New York, Academic Press, 237-270.
- Rogers H.J. 2005. Cell death and organ development in plants. Current Opinion in Developmental Biology, 71:225-261.
- Sakai H., Medrano L.J., Meyerowitz E,M. 1995. Role of SUPERMAN in maintaining arabidopsis floral whorl boundaries. Nature, 378 (6553): 199-203.
- Simpson G.G., Quesada V., Henderson IR., Dijkwel PP., Macknight R., Dean C. 2004. RNA processing and Arabidopsis flowering time control. Biochemical Society Transactions, 32(4): 565-566.
- Soltis D.E, Soltis P.S., Albert V.A., Oppenheimer D.G., dePamphilis C.W., Mae H., Frohlichf M.W., Theißen G., Floral Genome Project Research Group (Douglas E. Soltis et al.). 2002. Missink links: the genetic architecture of flower and floral diversification. Trends in Plant Sciences 7: 22-31.
- Special issue on Plant Reproduction. The Plant Cell, Volume 16, supplement. June 2004. Este es un número especial de la revista The Plant Cell donde diversos especialistas en biología reproductiva aportan revisiones sobre algunos de los temas más relevantes de este campo, incluyendo la inducción de la floración.
- Xu Y, Hanson M.R. 2000. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. Plant Physiology, 122:1323-1333.
- Xu Y., Ishida H., Reisen D., Hanson MR. 2006. Upregulation of a tonoplast-localized cytochrome P450 during petal senescence in *Petunia inflata*. BMC Plant Biology, 6: 8.

TEMA 6. Células germinales, esporas y gametos

Una vez hemos visto los distintos tipos de reproducción posibles en plantas, y cómo es y cómo se induce el entorno anatómico y funcional (la flor) donde se da la reproducción sexual en las plantas, en los siguientes temas vamos a ver cómo y dónde se generan las células directamente implicadas en la reproducción: los gametos. Un gameto no se forma directamente sin más a partir de cualquier célula. Para que se llegue a diferenciar un gameto hacen falta una serie de transformaciones especiales, que se dan únicamente en células específicas. En este tema veremos los distintos tipos de células intermedias que se forman, antes de llegar a generar un gameto. Este es un tema fundamentalmente conceptual, en el que se tratarán de fijar o refrescar una serie de conceptos necesarios para comprender las bases celulares y genéticas de la reproducción sexual.

6.1. Células somáticas y germinales

En todos los eucariotas superiores que se reproducen sexualmente, podemos encontrar dos tipos de células, en función precisamente de si están implicadas o no en dicha reproducción sexual. Por un lado, están las *células somáticas*: Estas células constituyen la inmensa mayoría del organismo, y forman todos los tejidos y órganos del individuo no relacionados con la reproducción sexual (raíz, tallo, hojas, meristemos, haces vasculares,...), y gran parte de aquellos relacionados con dicha reproducción (pétalos, sépalos, y gran parte del androceo y gineceo). En todos los casos, los órganos formados por células somáticas se renuevan mediante la división (somática) de dichas células, de tal manera que a partir de una célula original, se producen dos nuevas células genéticamente idénticas (clones). Es decir, las células somáticas legan a las células hijas copias exactas de su contenido genético, sin lugar a la generación de ningún tipo de variación. A este proceso de división somática se le denomina ***mitosis***.

Las células germinales son aquellos tipos celulares implicados directa o indirectamente en la formación de los gametos. Directamente, como ocurre en animales, o indirectamente, como en el caso de las plantas, en las que las líneas germinales dan lugar a los precursores de los gametos. Concretamente a los esporófitos, que a su vez dan lugar a los gametofitos, que son los que en definitiva darán lugar a los gametos y los portarán en su interior. Las células germinales derivan del *tejido esporógeno*.

El tejido espórógeno es en origen somático también, pero en un momento dado del ciclo vital del individuo, cuando alcanza su madurez reproductiva, comienza a expresar un programa específico de desarrollo que hará que las células de este tejido esporógeno dejen de comportarse como somáticas y pasen a ser germinales, esto es, precursoras de los gametos. Así, estas células se diferenciarán del tejido somático para dar lugar a las células madre de la microspora (esporófito masculino) y de la megaspora (esporófito femenino).

Tanto en el caso de los animales como en las plantas, y en general en todos los organismos que se reproducen por vía sexual, la formación de gametos implica que una vez la célula somática se ha transformado en germinal, antes o después va a sufrir un tipo de división celular especial, denominada ***meiosis*** (o *división reduccional*), que determinará su destino final como gameto, y sin la cual esto jamás sería posible. Dado el estrecho vínculo que tienen las células somáticas con la mitosis y las germinales con la meiosis, y la trascendencia de estos procesos de división celular *per se*, a continuación se verán por separado y con más detalle en los puntos 6.3 y 6.4 de este tema.

6.2. Células madre de microspora y megaspora

Las células madre de la microspora y las de la megaspora son los precursores de la generación gametofítica. Son, en definitiva, las células que contienen el material genético que se va a transmitir a la descendencia. Surgen a partir de las células de las líneas germinales, como ya hemos visto, y están en el interior de las anteras (las células madre de la microspora, Figura 6.1) y los ovarios (las células madre de la megaspora).

Las células madre de la microspora y la megaspora son las últimas células de la generación esporofítica (son todavía diploides), pero en lugar de dividirse por mitosis lo harán por meiosis. Son, por tanto, los únicos tipos celulares de todo el organismo en los que se activarán los genes que controlan la división

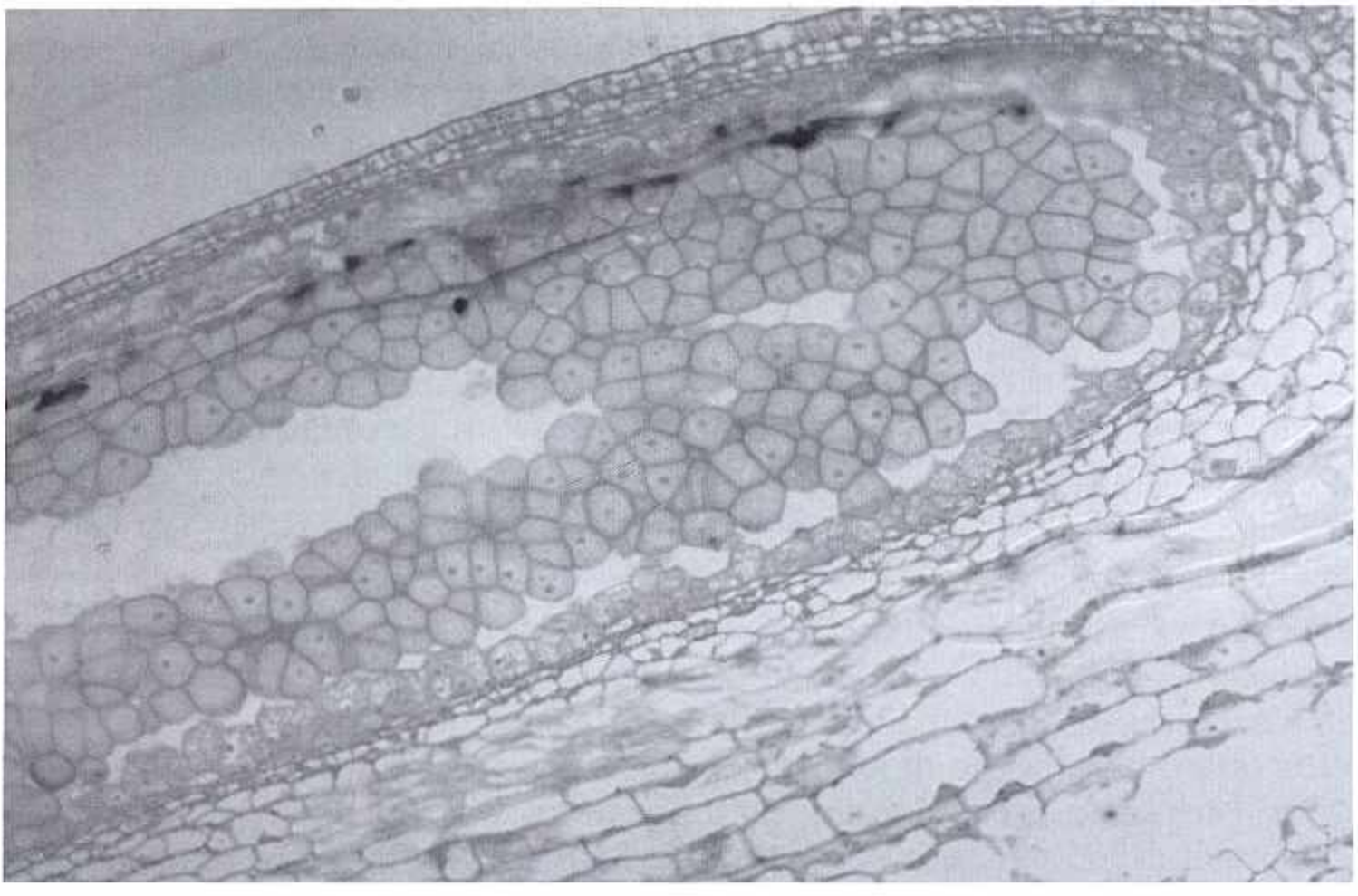


Figura 6.1: Células madre de la microspora en tomate (*Solanum lycopersicum*).
Imagen de Seguí Simarro.

meiótica, para comenzar el proceso de diferenciación del gametofito. Además, y también como consecuencia de la meiosis que sufrirán, en lugar de generar dos células hijas diploides, como en el caso de las células somáticas, generarán cuatro células haploides, que serán las primeras de la generación gametofítica.

6.3. Mitosis

La mitosis es la división celular. Es la última etapa de cada ciclo celular, y se da por tanto tras la interfase. La mitosis (Figura 6.2) comprende dos momentos principales, la división primero del núcleo celular (*cariocinesis*), en la que las cromátidas de sus cromosomas se separan para pasar a formar parte de los nuevos núcleos de las células hijas, y después la división del citoplasma y de los orgánulos que en él se encuentran (*citocinesis*). Es decir, la mitosis consta de cariocinesis y citocinesis. Como resultado, se forman dos células hijas genéticamente idénticas. Cada una de ellas entrará de forma independiente en la interfase de un nuevo ciclo celular (fases G1, S y G2).

Durante la interfase, las células activas en división se preparan para la mitosis, sintetizando y acumulando todo aquello que van a necesitar, puesto que durante la división, todos los recursos de la célula van a estar destinados precisamente a eso, a dividirse, y no habrá mucha energía disponible para otros fines como la síntesis proteica u otro tipo de procesos metabólicos. Durante la interfase, los cromosomas del núcleo no son claramente distinguibles, pues están en gran medida descondensados, para favorecer su transcripción. Únicamente el nucleolo, la fábrica de ribosomas, suele ser claramente visible en células interfásicas. Mientras tanto, y ya al final de la fase G2 de la interfase, concretamente en la interfase G2-M (entre G2 y mitosis), se forma una banda de microtúbulos en el plano ecuatorial de la célula, llamada banda preprofásica (ppb, *pre-prophasic band*, Figura 6.2A). Esta banda desaparecerá tan pronto la célula entre en mitosis, y aunque su papel no está a día de hoy totalmente claro, sí se sabe que al desaparecer deja una señal, una especie de impronta que señalizará por donde ha de dividirse la célula. Es decir, cual va a ser el plano en el que se va a ensamblar la placa celular que dividirá ambas células hijas. Una vez la célula ya está preparada para entrar en división, se suceden las cinco etapas en las que se divide la cariocinesis: *profase*, *prometafase*, *metafase*, *anafase* y *telofase*.

Profase (Figura 6.2B): Los cromosomas, cuando llegan a la profase, están ya previamente replicados en la fase S del ciclo celular. Constará, pues, de dos cromátidas hermanas unidas por el centrómero. La cromatina (el ADN de los cromosomas) comienza a condensarse todavía dentro del núcleo y se vuelve visible en forma de cromosomas si se observa la célula bajo un microscopio óptico. Al tiempo, el nucleolo desaparece. Comienzan a surgir los primeros microtúbulos de lo que será el huso mitótico, sintetizados desde los *centros organizadores de microtúbulos* (MTOCs) de la cara citoplásmica de la envoltura nuclear, todavía persistente.

Prometafase (Figura 6.2C): la envoltura nuclear se desmantela, pasando a integrarse en el sistema de retículo endoplásmico de la célula. Esto marca el comienzo de la prometafase. Los cromosomas se acaban de condensar completamente y comienzan a moverse a lo largo de de las fibras de microtúbulos del huso mitótico, que ya llegan al interior de lo que era el núcleo interfásico, y buscan el plano ecuatorial de la célula.

Metafase (Figura 6.2D): Los cromosomas acaban de desplazarse por las fibras del huso para alinearse todos en un mismo plano, el plano medio, ecuatorial, de la célula. A esta alineación se la denomina la placa metafásica, y es la que define esta etapa. Sirve para que los cromosomas queden orientados de forma que a las dos cromátidas hermanas les sea más fácil separarse, como veremos en las siguientes etapas.

Anafase (Figuras 6.2E y 6.3): Cada una de las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma se separan por el centrómero y se desplazan a lo largo de los microtúbulos del huso cada una a un polo opuesto de dicho huso, donde se congregan.

Telofase (Figuras 6.2F-H): Las cromátidas llegan a los polos opuestos de la célula. Al tiempo, las envolturas nucleares vuelven a formarse alrededor de los cromosomas, mientras éstos comienzan a descondensarse. El nucleolo se reensambla de nuevo. Al final de la telofase, los núcleos quedan listos para iniciar un nuevo ciclo celular en G1.

Citocinesis (Figuras 6.2F-H): En paralelo a la reformación de los núcleos durante la telofase, se inicia la citocinesis, de tal manera que cariocinesis y citocinesis terminan más o menos al mismo tiempo, aunque la cariocinesis comience mucho antes. Durante la citocinesis, se forma una nueva pared celular que separa físicamente el citoplasma de la célula original en dos partes aproximadamente iguales, finalizando el proceso de formación de dos nuevas células hijas. Además del citoplasma, también se reparten los diferentes orgánulos celulares, y también se hace de forma equitativa entre las dos hijas. Por tanto, existen una serie de mecanismos celulares y de controles para asegurar que el reparto va a ser equilibrado, y que ninguna hija va a quedar menos dotada de orgánulos que la otra. Para la formación de la nueva pared celular interviene una gran y compleja maquinaria celular. En primer lugar, se forma un complejo entramado de microtúbulos, proteínas y filamentos de actina denominado *fragmoplasto*, que funcionará como andamio para sustentar la formación de la nueva pared celular. En segundo lugar, interviene la gran factoría de membrana de la célula, el *aparato de Golgi*, suministrando membrana en forma de vesículas que viajan a lo largo de los microtúbulos del fragmoplasto, y se acumulan en el plano de la división (Figuras 6.2E, y 6.3). Una vez allí, las vesículas se funden, formando un complejo entramado membranoso denominado *placa celular*. La placa celular crecerá y se expandirá de forma centrífuga gracias al aporte de nuevas vesículas provenientes de aparato de Golgi (Figura 6.2F), al tiempo que en su interior comenzarán a sintetizarse los polisacáridos de pared celular típicos de las paredes de las células vegetales. Una vez la placa celular en formación alcance

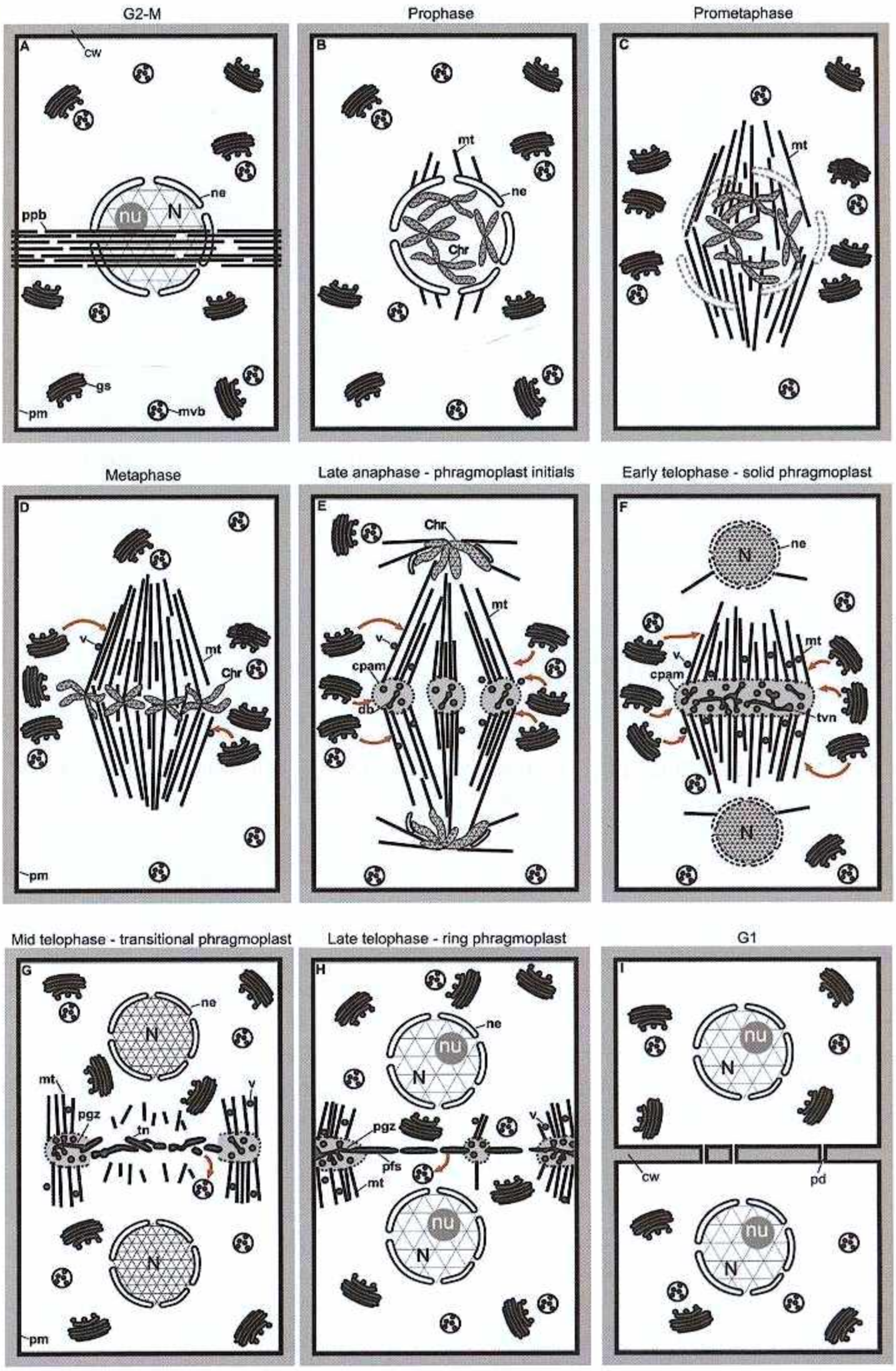


Figura 6.2: Las distintas etapas de la mitosis en células vegetales.
Basado en Seguí-Simarro and Staehelin 2006.
Imagen de Seguí Simarro.

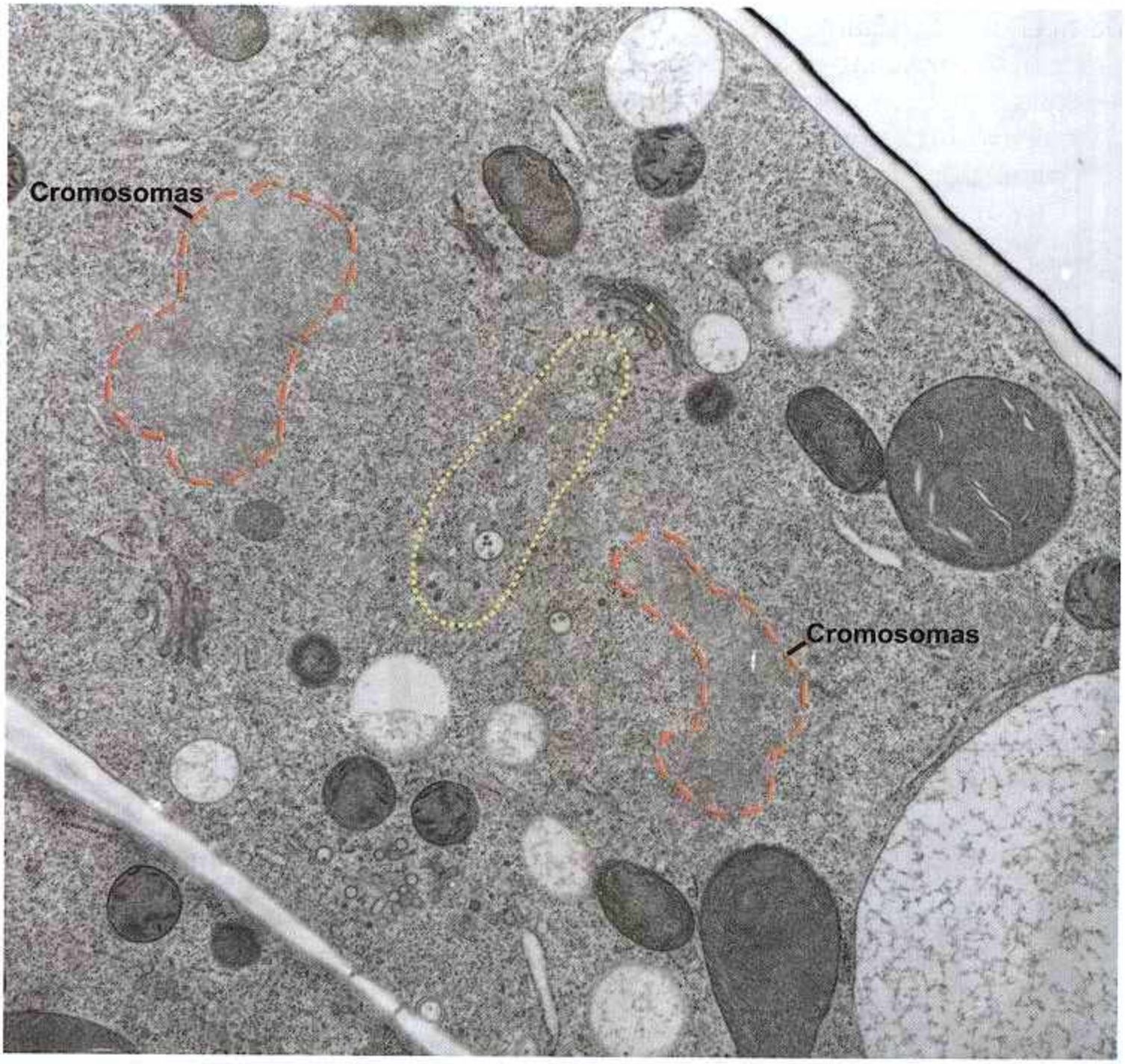


Figura 6.3: Imagen del final de una anafase mitótica en una célula meristemática de *Arabidopsis thaliana*. Los cromosomas están marcados con una línea discontinua roja, el plano ecuatorial de división con una línea azul claro, y la zona de formación de la placa celular inicial con una línea amarilla. Imagen de Seguí Simarro.

las paredes de la célula original y se funda con ellas (Figuras 6.2G y 6.2H), quedarán separadas las dos nuevas células hijas, se dará por finalizada la división celular, y comenzará un nuevo ciclo celular en cada una de ellas (Figura 6.2I).

6.4. Meiosis

La *meiosis* (Figura 6.4) es un proceso de división celular exclusivo de las células de la línea germinal, por el cual una célula inicialmente diploide (2n) acaba generando cuatro células haploides (n), a través de dos rondas de división celular (cariocinesis y citocinesis) sucesivas y acopladas, denominadas *meiosis I* y *meiosis II*. Cada una de estas dos rondas engloba unas etapas de profase, prometafase, metafase, anafase y telofase como en las divisiones mitóticas.

De hecho, los mecanismos que operan en todas las etapas de la meiosis II son prácticamente idénticos a los de la mitosis. Sin embargo, las etapas de la meiosis I, y en especial la profase I sí presenta diferencias notables frente a las correspondientes etapas de la mitosis. De hecho, esta etapa y los procesos que se dan en ella son los responsables de la mayor duración de la meiosis comparada con la mitosis. No obstante, esta duración es muy variable, habiéndose medido meiosis de duraciones dentro de un rango que abarca desde las 18 horas a los 17 días. Por ejemplo, en *Petunia hybrida* dura 18 horas, 24 en *Beta vulgaris*, 30 en *Pisum sativum*, 51 en *Secale cereale*, 3 días en *Vicia faba*, 4 días en *Allium cepa*, o algo más de 7 días en *Lilium henrii* u *Olea europaea* (olivo). No se sabe muy bien a qué se debe este rango tan amplio de duraciones, pero sí se sabe que la meiosis es un proceso muy sensible, que puede verse afectado muy fácilmente por las condiciones ambientales, y en concreto por la temperatura, que puede acelerar o ralentizar en gran medida este proceso y sus diferentes etapas. Veremos a continuación las etapas de la meiosis.

Meiosis I Durante la fase de meiosis I (Figuras 6.4A-F) es cuando se suceden las particularidades de la meiosis, que conducen a la formación de células haploides, y a la creación de nuevas combinaciones genéticas por medio de la recombinación.

Profase I (Figuras 6.4A-B): Al igual que en la mitosis, las dos cromátidas hermanas de los cromosomas llegan a la profase I ya replicadas en la fase S del ciclo celular. El primer evento de la profase I es la recombinación meiótica. Este proceso a su vez consta de cinco etapas, *leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno* y *diacinesis*. Durante estas etapas, que no veremos en detalle por exceder de los contenidos de este capítulo, los cromosomas homólogos se aparean y forman unas uniones específicas denominadas *sinapsis*. A estos cromosomas apareados se les denomina *bivalentes*. Los bivalentes, formados por dos cromosomas unidos y por tanto por cuatro cromátidas, sufren una serie de transformaciones, basadas en entrecruzamientos (*quiasmas*) entre cromátidas no hermanas, que tienen como resultado final el intercambio de fragmentos homólogos entre cromosomas homólogos, de manera que se crean combinaciones de genes diferentes a las originales, es decir, al resto de células (las somáticas) del individuo. Cuando los cromosomas y las cromátidas del bivalente se separen y vaya cada una a una célula distinta, se dará lugar a cuatro gametos genéticamente distintos por cada célula germinal que entra en meiosis. Las combinaciones genéticas generadas por la recombinación no tienen por que ser las mismas en cada célula en meiosis, por lo que de cada *meiocito* (célula en meiosis) pueden en principio generarse cuatro gametos genéticamente distintos entre sí, y también distintos a los provenientes de otro meiocito. Esta es la base de la variabilidad genética que genera la recombinación, y el fundamento de las ventajas evolutivas, en cuanto a ensanchamiento de la base genética de las especies, que proporciona la reproducción sexual. Conforme avanza la profase I y se acerca a su fin, la condensación de los cromosomas es cada vez mayor, llegando un punto en que es posible su observación en el microscopio óptico, al igual que sucedía en la mitosis.

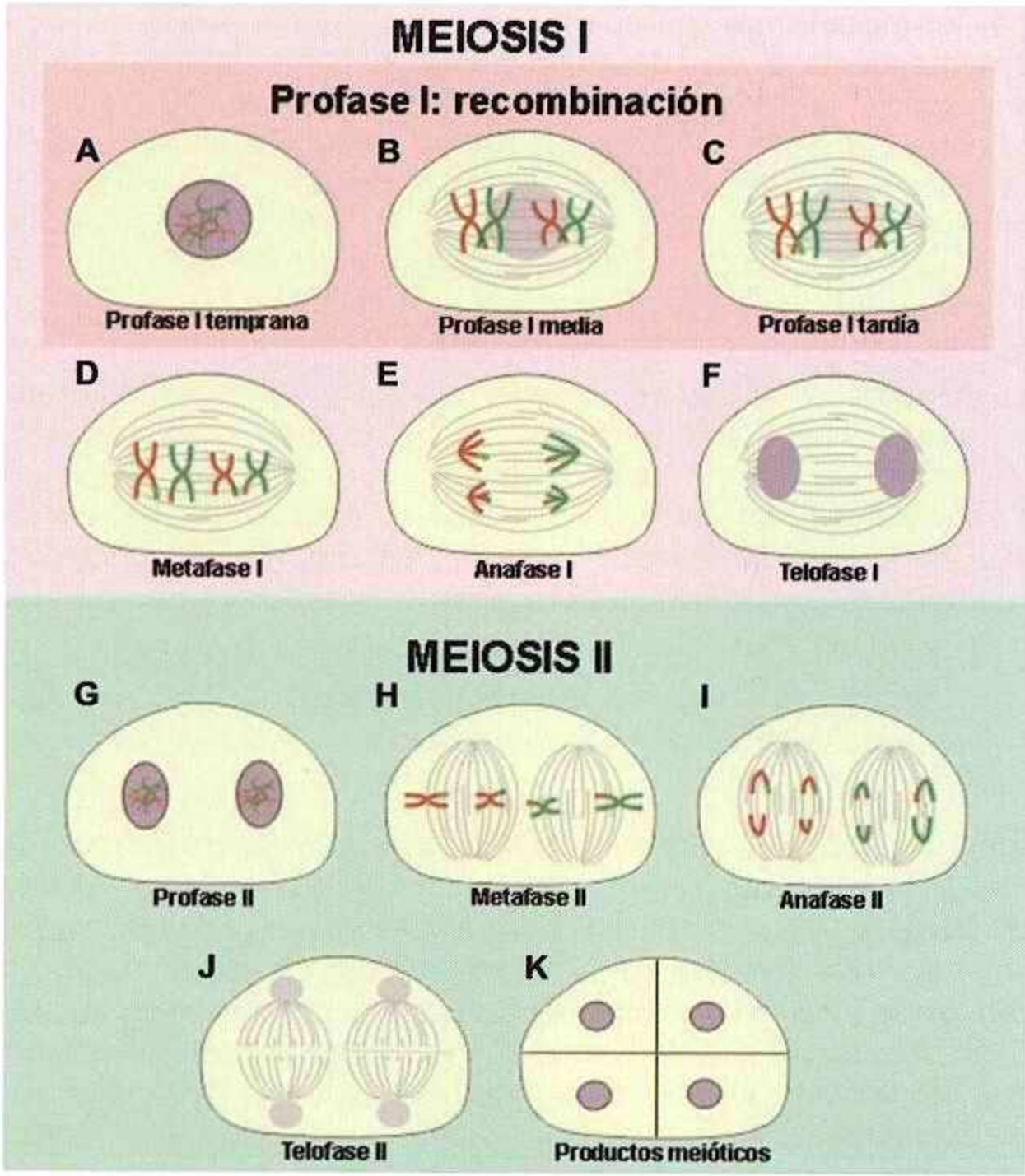


Figura 6.4: Las distintas etapas de la meiosis en células vegetales.
Imagen de Seguí Simarro.

Prometafase I (Figura 6.4C): La envoltura nuclear desaparece, y los cromosomas asociados a las fibras del huso comienzan a desplazarse hacia el plano ecuatorial de la célula.

Metafase I (Figura 6.4D): Los bivalentes, que en esta etapa se encuentran unidos tan solo por los quiasmas, se alinean en un mismo plano, el plano medio, formando la placa metafásica (Figura 6.5A'). La orientación de los cromosomas en la placa metafásica es al azar, con cada cromosoma homólogo paterno en un lado. Esto quiere decir que existe la misma probabilidad de que un cromosoma procedente del parental masculino vaya hacia un polo que de que vaya hacia el otro, yendo el cromosoma del parental femenino al polo opuesto. Y esto para todos y cada uno de los cromosomas.

Anafase I (Figura 6.4E): Los quiasmas se separan, y los cromosomas ya son libres para migrar. Cada cromosoma de la pareja de homólogos migra a polos opuestos, llevando juntas las dos cromátidas hermanas unidas por el centrómero. Es decir, cada una de las células hijas es ahora haploide, pero cada cromosoma mantiene sus dos cromátidas. Esta es la gran diferencia de la metafase I con la metafase mitótica, en la que lo que migran son las cromátidas hermanas de cada cromosoma.

Telofase I (Figura 6.4F): Una vez los cromosomas están en los polos del huso, las envolturas nucleares pueden reensamblarse, o puede que no. Esto depende de las especies. Hay especies en las que la meiosis transcurre de forma más parecida a la mitosis, reformándose los núcleos tras la meiosis I, y dividiéndose el citoplasma (citocinesis) de modo que se forma un intermediario celular denominado diada (dos células). En muchas otras especies, el meiocito entra directamente en la meiosis II, sin acoplar esta primera cariocinesis a una citocinesis intermedia. En este caso, al final del proceso total, las cuatro células resultantes serán tabicadas a la vez.

Meiosis II

La meiosis II es muy similar a la mitosis (Figuras 6.4G-K), y transcurre en paralelo para los dos núcleos que vienen ya separados de la meiosis I (Figura 6.6). Las únicas diferencias es que no hay un ciclo celular previo, y por tanto no hay fase S previa. Pero hay que recordar que los cromosomas mantienen sus dos cromátidas, con lo que están en la misma situación que los cromosomas que inician la mitosis. Solo que hay la mitad de cromosomas, un juego haploide. El otro juego está en el otro núcleo. Además, las cromátidas de cada cromosoma ya no son idénticas, debido a la recombinación. La meiosis II separará estas cromátidas a través de las mismas cinco etapas vistas en la mitosis, denominadas en este caso profase II, prometafase II, metafase II, anafase II y telofase II. Se forman dos núcleos hijos por cada uno de los dos que entran en la meiosis II. Cuatro núcleos genéticamente distintos en total, y cada uno de ellos con un juego haploide de cromosomas con una sola cromátida.

En paralelo a la telofase II, y al igual que ocurre en la mitosis, se da la citocinesis. Si el meiocito ha pasado previamente por la fase de diada, se volverá a dar una citocinesis como la vista para la mitosis, con lo cual se acabarán de formar las cuatro células haploides independientes. A esta estructura de cuatro células, que quedan encerradas por una cubierta de calosa que las mantiene cohesionadas, se le denomina *tetrada* (Figuras 6.5 y 6.7). Si no pasa por fase de diada, en la telofase II coexistirán cuatro núcleos en el mismo citoplasma. Estos cuatro núcleos serán tabicados mediante un proceso especial de citocinesis, distinto al visto en la mitosis, y sincrónico para los cuatro núcleos. Sin embargo, el resultado final será el mismo, una tetrada de productos meióticos (Figura 6.7), precursores de las microsporas.

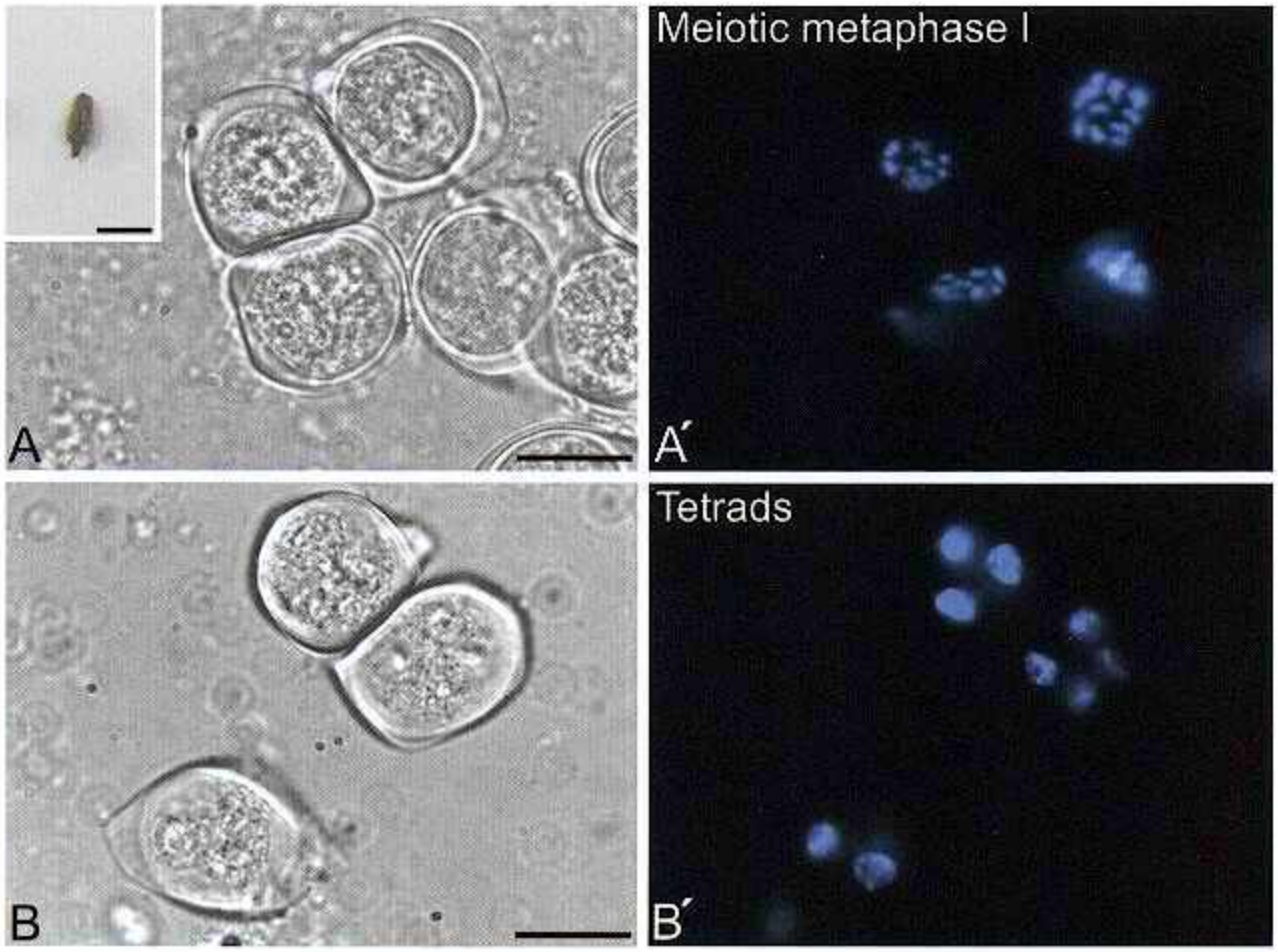


Figura 6.5: Meiosis en tomate. A y A': metafase. B y B': tétradas.
Imagen de Seguí Simarro.

Figura 6.6: Metafase II en un meiocito de tomate (*Solanum lycopersicum*). Se forman dos placas metafásicas de cromosomas alineados separadas por una banda de orgánulos, que se concentran en el plano medio de la célula.
Imagen de Seguí Simarro.

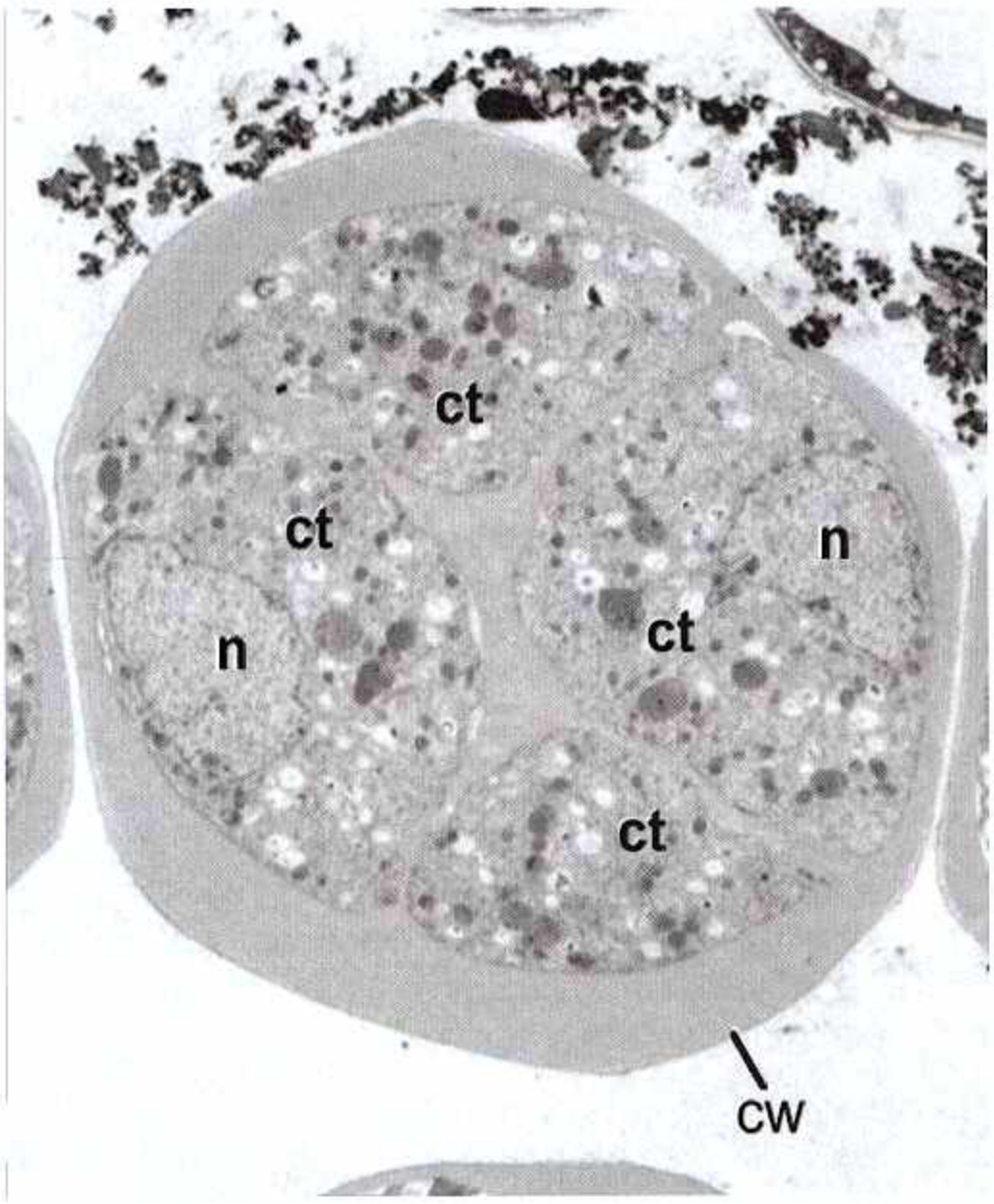


Figura 6.7: Tetrada en tomate (*S. lycopersicum*).
ct: citoplasma; cw: pared de calosa; n: núcleo.
Imagen de Seguí Simarro.

6.5. Esporas y gametos

El término *espora* suele designar un mecanismo reproductivo, generalmente unicelular y haploide. Para llegar a la espora, es por tanto necesaria una meiosis. A la formación de esporas se le denomina *esporogénesis*. La espora (Figura 6.8) a su vez se divide mediante mitosis para producir un nuevo organismo haploide, el gametófito. El gametófito puede seguir dividiéndose mitóticamente y producir un gametofito multicelular (fase gametofítica), del cual se derivarán en último término los gametos, o diferenciarse directamente para dar lugar a dichos gametos. En la Figura 6.8 podemos ver el caso particular de los gametos masculinos, con los distintos intermediarios en forma de espora y gametófito que tienen lugar para llegar finalmente a la formación de los gametos.

Podemos definir los gametos como cada una de las células sexuales reproductivas, masculinas y femeninas, producidas en el gametofito (polen u óvulo

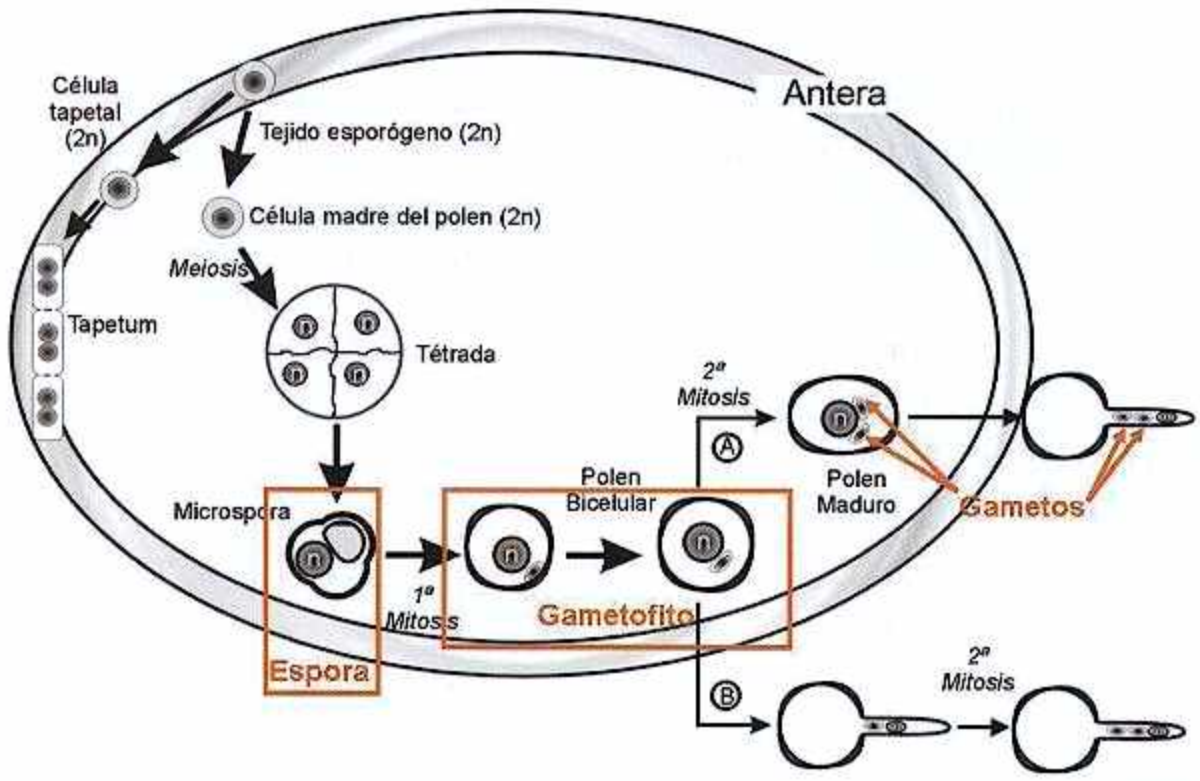


Figura 6.8: Esporas, gametófitos y gametos masculinos.
Imagen de Seguí Simarro.

respectivamente) por mitosis de células ya haploides, y que al unirse en la fecundación formarán el zigoto. Por analogía con la esporogénesis, a la formación de gametos se le denomina *gametogénesis*.

En definitiva, la meiospora es el producto de la meiosis, y en la ruta hacia el gameto masculino se le denomina microspora, que dará lugar al gametofito masculino (polen), que a su vez generará los gametos masculinos o espermátidas (Figuras 6.8 y 6.9). Por su parte, en la ruta hacia el gameto femenino a la meiospora se le denomina megaspora, que dará lugar al gametofito femenino (saco embrionario) y finalmente al gameto femenino o célula huevo (Figura 6.9).

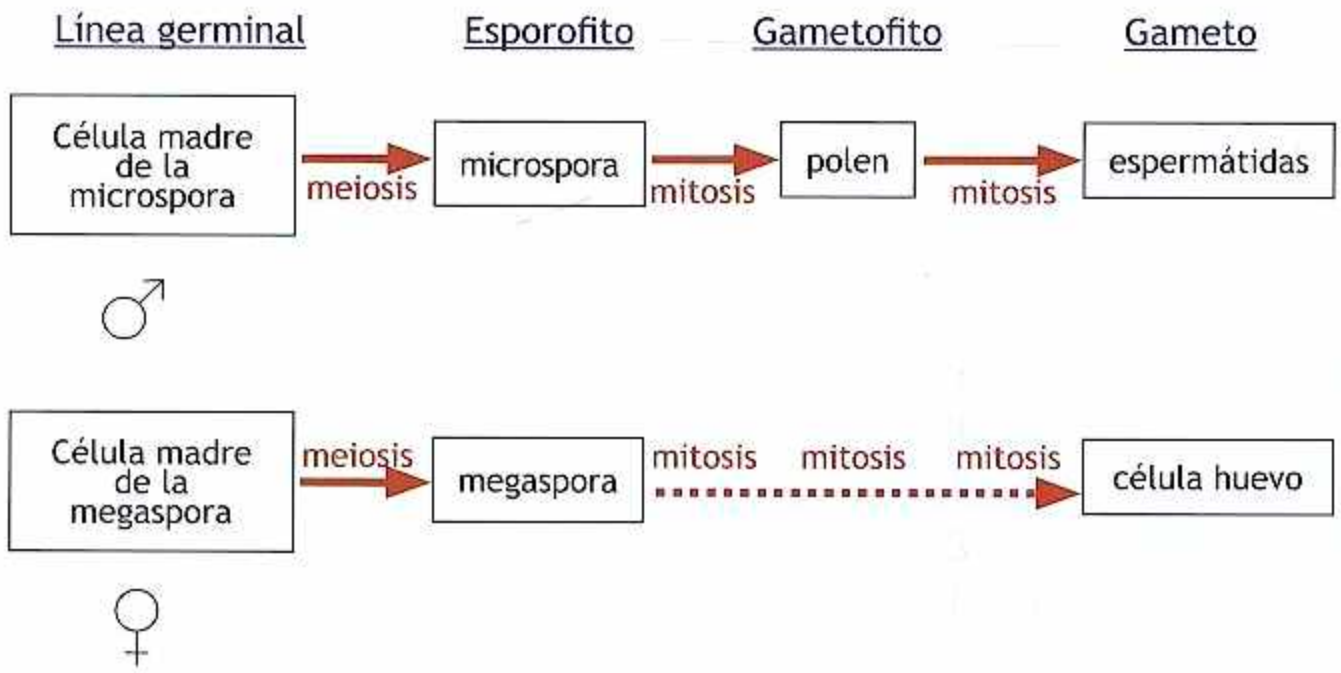


Figura 6.9: Transformaciones de la línea germinal para llegar a la formación de gametos en los casos masculino y femenino.
Imagen de Seguí Simarro.

6.6. Resumen

En este tema hemos definido cuales son las diferencias funcionales entre las células somáticas y las de la línea germinal También hemos visto que de entre todas las diferencias, la principal es el modo de división que las germinales adoptan en un momento determinado de su desarrollo, la meiosis. Como consecuencia de la meiosis, el número de cromosomas de la célula se reduce a la mitad, lo cual no sucede en la mitosis, que mantiene constante el número de cromosomas entre generaciones celulares. La meiosis permite la formación de gametos, y que no varíe el número de cromosomas de una especie al fusionarse dos gametos de sexo opuesto.

En los órganos sexuales masculinos (los estambres), la meiosis se da en las células madre de la microspora, lo cual origina cuatro esporas haploides masculinas (microsporas). Estas son a su vez las precursoras del polen, el gametófito masculino. Dentro de ellos se generarán los gametos masculinos, denominados espermátidas. Dentro de los órganos sexuales femeninos, en los óvulos la meiosis se da en las células madre de la megaspora, lo cual acaba originando esporas haploides femeninas (megasporas). Estas son a su vez las precursoras de saco embrionario, el gametófito femenino. Dentro de él se generará el gameto femenino, denominado célula huevo.

6.7. Información adicional

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M.,-Roberts K., Walter P. 2002. Biología molecular de la célula. 4ª edición. Editorial Omega S.A.
- Raven P., Johnson G. 1999. Biology, Fifth Edition. Ed. McGraw-Hill.
- Seguí-Simarro, J.M., Austin J.R., White E.A., Staehelin L.A. 2004. Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of Arabidopsis preserved by high pressure freezing. The Plant Cell, 16: 836-856.
- Seguí-Simarro, J.M., Staehelin L.A. 2006. Mechanisms of cytokinesis in flowering plants: new pieces for an old puzzle. In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st Edition), Vol. 1. Jaime A Teixeira da Silva (Ed). Global Science Books, London, UK, pp. 185-196.
- Seguí-Simarro, J.M., Otegui M.S., Austin J.R., Staehelin L.A. 2008. Plant cytokinesis - Insights gained from electron tomography studies. In: Cell Division Control in Plants. D.P.S. Verma and Z. Hong (eds.) Springer Berlin/ Heidelberg, Germany. pp: 251-287. ISBN: 978-3-540-73486-4.
- Verma D.P.S., Hong Z. 2008. Cell Division Control in Plants. Springer Berlin/ Heidelberg, Germany.

TEMA 7. Androceo y formación del gameto masculino

En este tema vamos a ver cómo y donde se forman los gametos masculinos. Veremos cómo un producto meiótico, una vez ha sufrido la recombinación y ha visto reducido su genoma a un número gamético de cromosomas (haploide en la mayoría de las especies silvestres), se transforma finalmente en el gameto masculino. Para que esto ocurra, se han de dar sucesivamente dos procesos, denominados *microsporogénesis* y *microgametogénesis* (Figura 7.1).

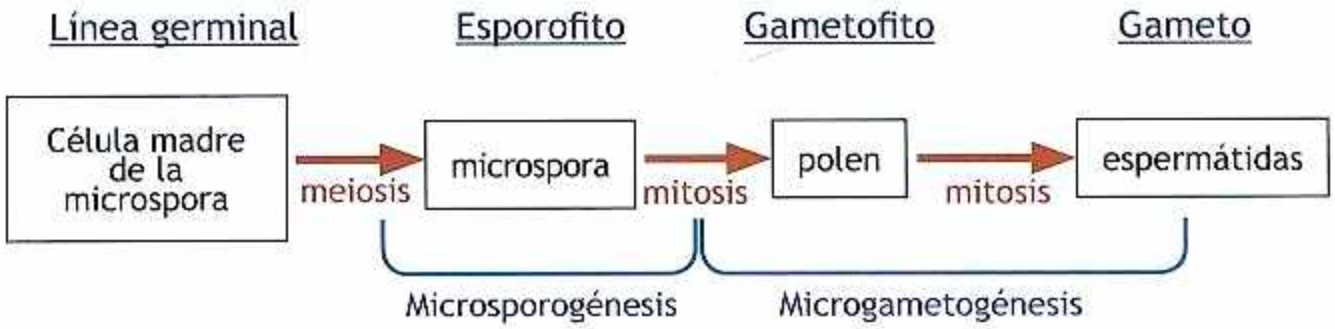


Figura 7.1: Microsporogénesis y microgametogénesis: las etapas por las que ha de pasar un producto meiótico para convertirse en gameto masculino.
Imagen de Seguí Simarro.

La microsporogénesis es el proceso de formación y desarrollo de las microsporas. A lo largo de este proceso, los productos provenientes de la meiosis se convierten en microsporas (el esporófito masculino). Estas, a su vez, alcanzan su madurez y quedan listas para convertirse en gametófitos (microgametófito). Esta conversión viene mediada por una mitosis que marca el fin de la microsporogénesis y el comienzo de la microgametogénesis.

La microgametogénesis es el proceso de formación de los microgametos. Durante este proceso, el microgametófito masculino (denominado *polen*) se desarrolla y se prepara para la formación de los gametos (los microgametos o *espermátidas*). Muchas especies completan este proceso en el interior de la antera. Otras, en cambio, lo completarán tras la polinización, durante el desarrollo del tubo polínico. Pero en general, todos estos procesos, que veremos con más detalle en las próximas páginas, suceden dentro de los estambres.

7.1. Estambres

Los estambres son las estructuras florales típicas de las flores masculinas portadoras de los sacos polínicos (microsporangios) donde se originan y desarrollan los granos de polen. El conjunto de todos los estambres de una flor es lo que constituye el *androceo*.

Cada estambre consta por lo general (Figuras 7.2 y 3.6) de un *filamento*, en el extremo del cual se sitúa la *antera*. El filamento es la parte estéril del estambre, cuya función únicamente es la de sostener y transportar nutrientes a la

antera, es decir a la microspora y al polen en desarrollo, y alargarse en cuanto abra la yema floral. Generalmente es filiforme, como su propio nombre indica, pero en algunos casos puede ser grueso, o incluso tener el aspecto de un pétalo (*petaloide*), y estar provisto de apéndices. En ocasiones, en la base del filamento se desarrollan los *nectarios*, órganos florales responsables de la creación y almacenamiento del *néctar*. El néctar es una sustancia azucarada que, como veremos con más detalle en el tema 10, tiene un papel muy relevante en la polinización.

Partiendo de la base del esquema típico del estambre de angiospermas, es decir una antera colocada en el extremo del filamento, podemos encontrar muy diversas adaptaciones y derivaciones de este patrón. Por ejemplo, los filamentos pueden ser muy largos, incluso mucho más que la propia flor (*protuberantes*), como en el caso de *Crateva religiosa* (Figura 7.3). Pueden ser también muy cortos, como en el caso del tomate, o incluso faltar, como en el caso de las anteras sésiles del género *Piperia* de orquídeas.

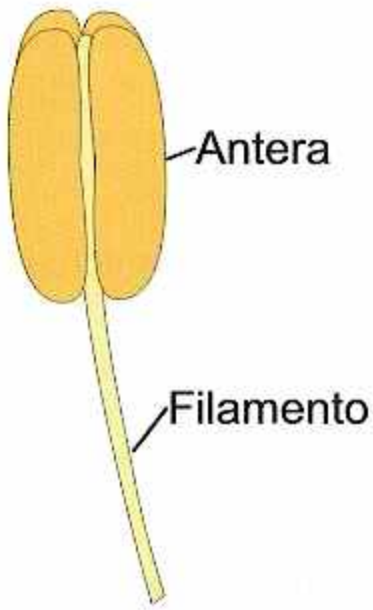


Figura 7.2: Estambre típico de angiospermas. Imagen de Seguí Simarro.

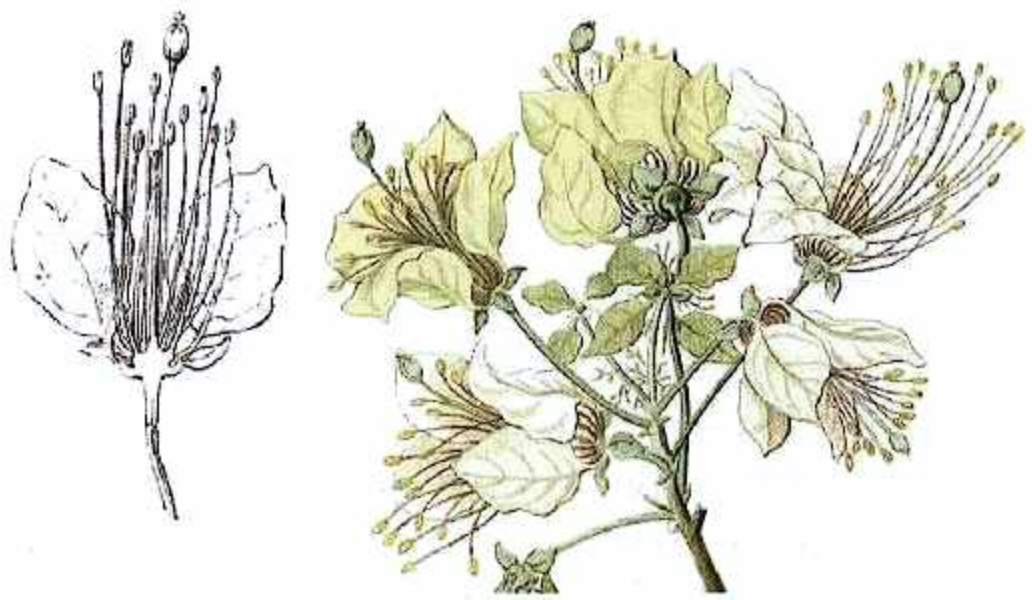


Figura 7.3: Estambres protuberantes de *Crateva religiosa*. Imagen adaptada de ilustración de F.M. Blanco, de dominio público, del libro Flora de Filipinas, Gran edición, Atlas I. 1883.

La antera es la parte fértil del estambre, donde se albergan todos los procesos relativos a la formación del gameto masculino (Figura 6.8). Generalmente, las anteras son *bitecadas*, es decir, está formada por dos *tecas* (Figura 7.4), aunque en algunas familias las hay también de una (Malvaceae) o de tres tecas (*Megatritheca)*. Las tecas están unidas entre sí por el tejido conectivo, en el que se encuentran también los haces vasculares. Cada teca lleva dos sacos polínicos o microsporangios. La antera puede estar unida al filamento por uno de sus extremos, o bien a través del punto medio de la antera. El primer caso es típico de flores con estambres que presentan filamentos muy cortos y anteras fusionadas formando una estructura cerrada (denominada *cono estaminal*) en torno al estilo. Como ejemplo de este tipo podemos citar el tomate (*Solanum*

lycopersicum, Figuras 5.9 y 5.11). En estos casos la antera queda en la flor en posición vertical. El segundo caso es típico de estambres con filamentos largos y anteras independientes, y la antera queda dispuesta en posición horizontal. Es el caso, por ejemplo, de los estambres de *Amaryllis* (Figura 7.5)

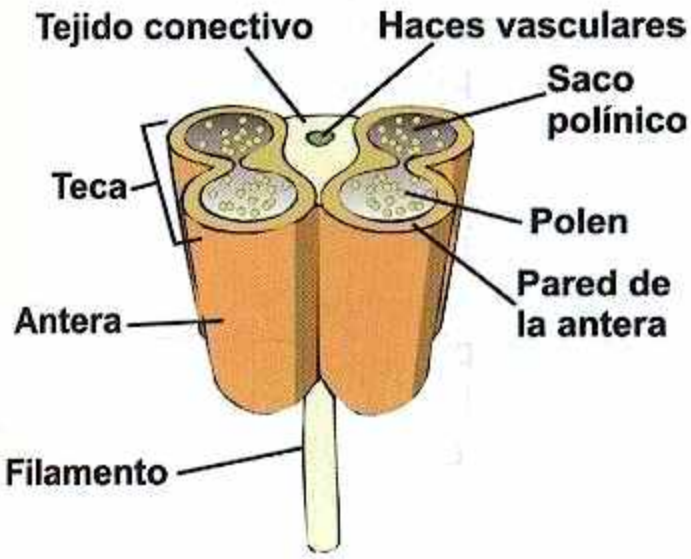


Figura 7.4: Partes de una antera.
Imagen de Seguí Simarro.

Figura 7.5: Estambres de *Amaryllis*.
Imagen de André Karwath en Wikimedia Commons, bajo licencia Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5. (http://creativecommons.org).

7.1.1. Evolución de los estambres

En los años 50, James E. Canright observó que existía una gran diferencia en cuanto a la morfología externa entre los estambres de angiospermas primitivas como *Austrobaileya*, con estambres en forma de hoja, y los estambres de las angiospermas más evolucionadas como el lirio, o como muchas de las especies actuales más comunes. En base a esto, desarrolló una serie evolutiva desde las angiospermas más primitivas hasta las actuales (Figura 7.6), y con esto propuso un modelo hipotético de evolución del androceo. Se cree que los estambres, tal como los conocemos en las angiospermas actuales, representan esporófilos modificados, con esporángios en su superficie, que han ido evolucionando hasta adoptar su morfología actual.

Al parecer, los microsporangios primitivos, que en la actualidad han derivado en las anteras, en las angiospermas primitivas estaban situados en el centro de una hoja verde, aplanada, incluso con actividad fotosintética. Es decir, estaban colocados sobre una hoja modificada. A lo largo de la evolución, esta estructura primitiva sufriría una serie de transformaciones que acabarían con el aspecto actual de la mayoría de estambres. En primer lugar, la evolución conllevaría una reducción de la anchura de la hoja modificada, mientras que los microsporangios se irían desplazando hacia los bordes de la hoja. El tamaño total de la hoja también se iría viendo reducido. Una vez las anteras alcanzaran los bordes laterales

de la hoja, se desplazarían hacia el extremo superior, mientras que la hoja, enormemente reducida en su anchura principalmente, se enrrollaría formando un filamento, adoptando la estructura que hoy día se conoce en la gran mayoría de las angiospermas.

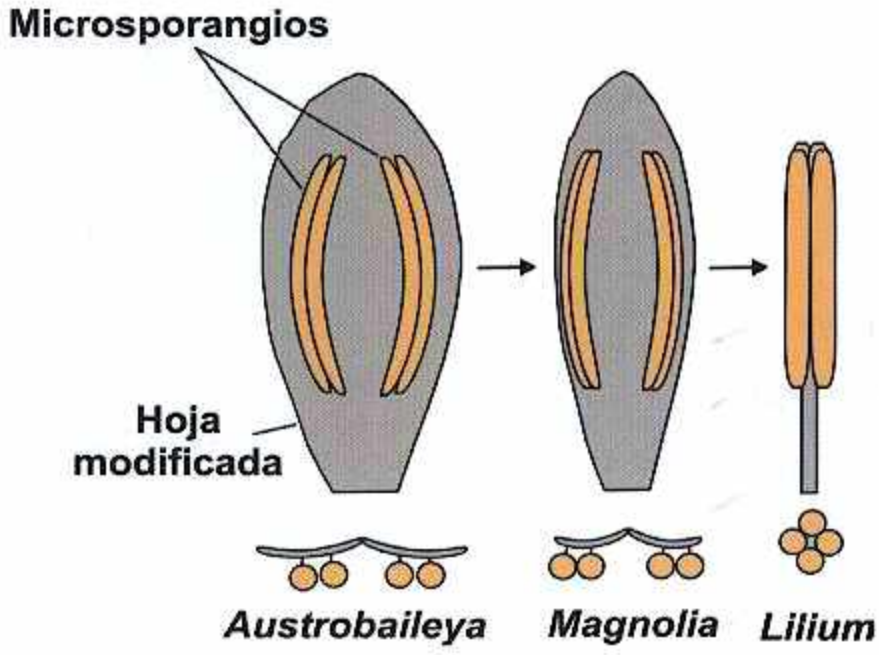


Figura 7.6: Evolución de los estambres.
Basado en Purves et al., Life: The Science of Biology, 4th Edition, Sinauer Associates.
Imagen de Seguí Simarro.

7.1.2. Histología de la antera

Ya hemos visto que la antera es un conjunto de dos tecas, unidas por un tejido conectivo dentro del cual se encuentran los haces vasculares encargados del aporte de nutrientes a la antera. En cada una de las tecas hay dos sacos polínicos, portadores de las microsporas y el polen, y rodeados de una serie de capas de tejido con distintas funciones cada una. De fuera hacia adentro podemos distinguir las siguientes capas (Figura 7.7):

- una capa externa denominada *epidermis* o *exotecio*. El exotecio es delgado y continuo. Tiene una función principalmente protectora del resto de tejidos. A veces puede romperse, colapsarse o interrumpirse.
- una capa de tejido mecánico o *endotecio*. Se trata de una capa fibrosa que en ocasiones se continúa en el tejido conectivo.
- entre dos y cuatro *estratos parietales* de células parenquimáticas. Son las que dan grosor y consistencia a la antera en sus estadios iniciales. Sin embargo, pronto desaparecen aplastadas o degeneran rápido conforme maduran las microsporas y posteriormente el polen, lo que resta consistencia y turgencia a la antera durante la antesis.
- *tapete, tapetum* o tejido nutricio. Se trata de la capa celular más interna, que delimita el contorno del saco polínico. Su función es nutrir y ayudar al desarrollo de las microsporas y los granos de polen. Por su vital importancia para el desarrollo de los gametos, lo veremos por separado en el apartado 7.1.3.

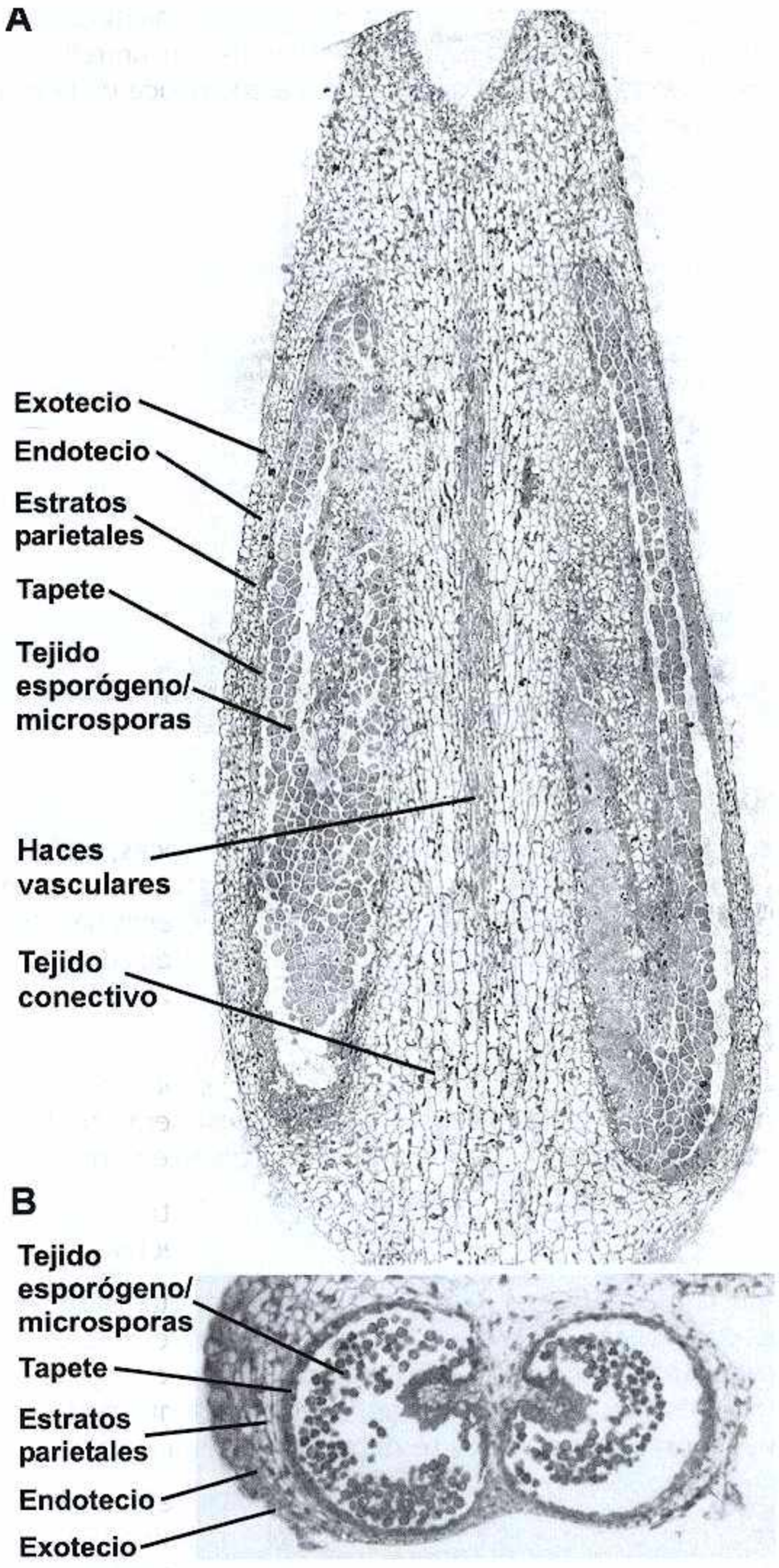


Figura 7.7: Corte longitudinal (A) y transversal (B) de una antera de tomate (*Solanum lycopersicum*).
Imágenes de Seguí Simarro.

- el *tejido esporógeno* o arquesporio. Constituye cada saco polínico. Inicialmente el tejido esporógeno está formado por las células madre de la microspora. Posteriormente, se transformarán en los meiocitos, las microsporas y finalmente el polen. Lo veremos en el apartado 7.2.

7.1.3. El tapetum

El *tapetum* o *tapete* (Figura 7.8) es el tejido más próximo al saco polínico. Se encarga de la nutrición de las microsporas, de la formación de la exina, la cubierta especial del polen (ver apartado 7.6.1), y de la síntesis y liberación de las sustancias que formarán la trifina y el cemento polínico. Estas sustancias, una vez liberadas por el tapete, se depositan sobre la microspora y polimerizan sobre su superficie. Las células del tapete tienen un citoplasma muy denso, y en muchas especies son multinucleadas o con núcleos poliploides.

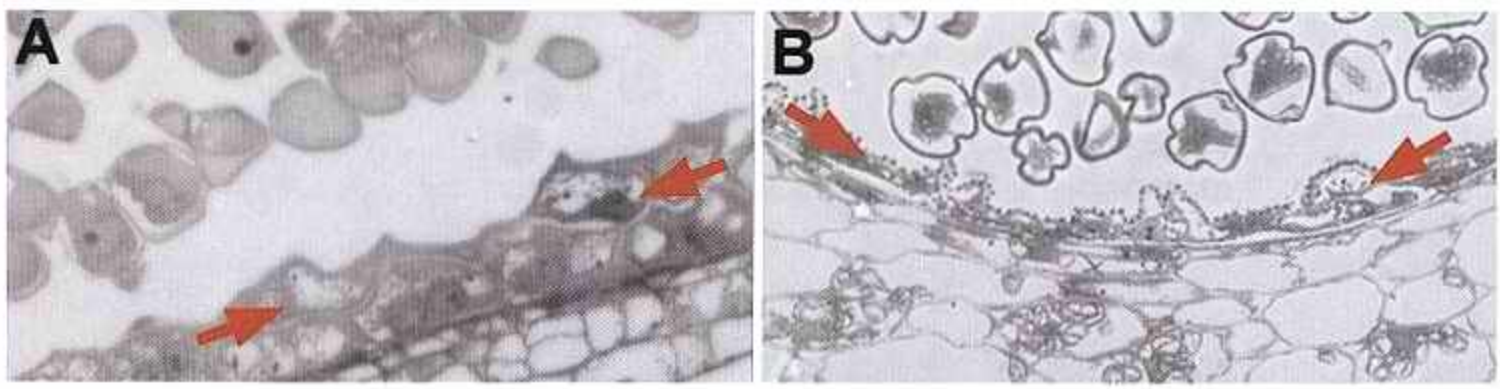


Figura 7.8: Tapete secretor (flechas) de anteras de tomate en la etapa de meiocitos (A) y de microsporas (B). Nótese la diferencia de grosor y de contenido, así como la elevada presencia de depósitos lipídicos (gránulos negros) en la etapa más avanzada.
Imágenes de Seguí Simarro.

El tapete proviene del tejido esporógeno (Figura 6.8), al igual que las microsporas. Sin embargo, sufre un proceso de diferenciación distinto, que no implica meiosis. Una vez direfenciadas, desarrollan su función de apoyo al desarrollo de las microsporas y el polen. Durante esta etapa, algunas células pueden sufrir divisiones de sus núcleos sin que se divida su citoplasma, lo que originará las células multinucleadas. Algunos de estos núcleos pueden acabar fundiéndose, lo que a su vez dará lugar a los núcleos poliploides. Cuando la mitosis de la microspora está próxima y comienza la deshidratación de la antera, una vez cumplida su función nutritiva de la microspora unicelular, el tapetum se seca, sus células degeneran y mueren, y sus restos se depositan sobre los granos de polen como trifina, *cemento polínico* o "*pollen kit*": sustancias lipídicas viscosas, amarillas o rojas que tienen un papel importante en la polinización. La misión nutritiva ejercida hasta entonces por el tapete será asumida después por el citoplasma de la célula vegetativa, durante la maduración del polen.

Hay dos clases de tapete según su funcionamiento: el *tapete secretor* y el *tapete invasor*.

- El tapete secretor o *glandular* permanece rodeando el saco polínico pero sin adentrarse en él. Desarrolla una actividad fundamentalmente secretora. Una vez ha cumplido su función, el contenido de las células del tapete glandular se va desorganizando progresivamente y sufren autolisis. Este es el tipo de tapete típico de la mayor parte de las angiospermas.
- El tapete invasor, *plasmodial* o *ameboide* se caracteriza por la fusión de sus células, formando una masa de protoplasma llamada periplasmodio, que invade el lóculo y envuelve las microsporas para nutrirlas. Este tipo de tapete se da en algunas Pteridophyta, y en algunas angiospermas (*Tradescantia*).

7.2. Microsporogénesis

El proceso de la microsporogénesis (Figuras 7.9 y 7.10) comprende la formación y el desarrollo de la microspora. La célula madre de las microsporas, tras la meiosis, da lugar a tétradas de microsporas haploides, inicialmente mantenidas unidas por una pared de calosa, (1-3) ß-glucano. La pared de calosa se degrada por acción de una enzima (1-3) ß-glucanasa denominada calasa, producida por el tapete. Tras la disolución de la pared de calosa, las microsporas están en su estadio joven (Figuras 7.9. y 7.10C y C'). Cuando es liberada, la microspora suele conservar la morfología tetrahédrica que la tétrada impone. Pero conforme avanza en su desarrollo, va adoptando su morfología típica, característica de cada especie. Por ejemplo, en crucíferas o solanáceas (Figuras 7.10C-E), son trilobuladas, al igual que el polen que de ellas derivará.

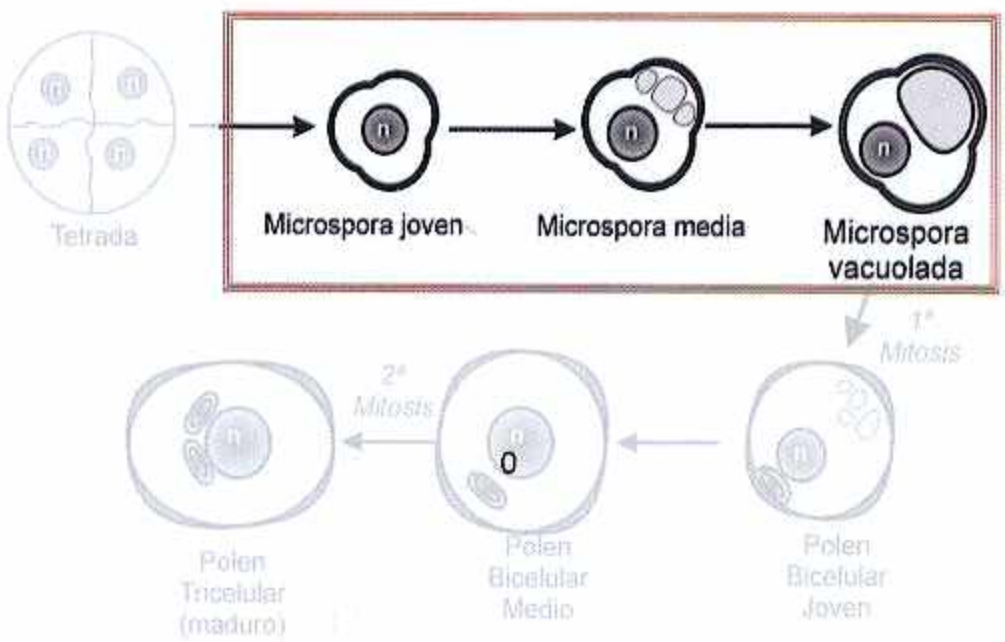


Figura 7.9: Etapas de la microsporogénesis.
Imagen de Seguí Simarro.

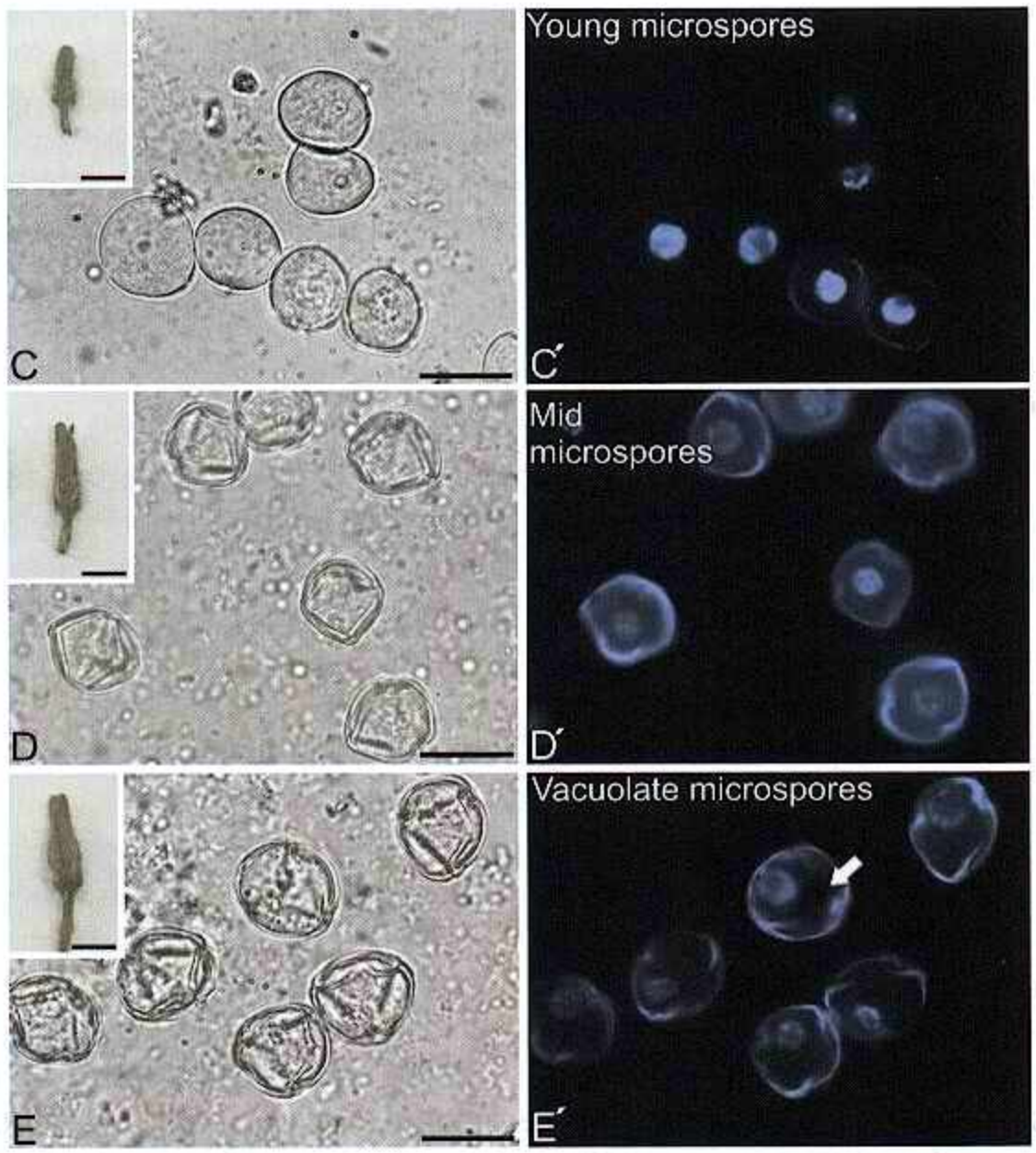


Figura 7.10: Microsporogénesis en tomate (*S. lycopersicum*). C y C': microsporas jóvenes. D y D': Microsporas medias. E y E': Microsporas vacuoladas. Las figuras C-E están tomadas con microscopía óptica de contraste de fase, y las figuras C'-E' con microscopía de fluorescencia sobre muestras teñidas con DAPI. Adaptado de Seguí-Simarro y Nuez, Acta Physyologia Plantarum 2005. 27 (4B): 675-685. Imágenes de Seguí Simarro.

Las microsporas jóvenes (Figuras 7.10C y C') entran en una larga interfase que puede durar varios días según la especie. Presentan un periodo G1 muy corto, un largo periodo S con dos picos de replicación del ADN y un periodo G2 que solapa con la última parte del S. En este periodo, la microspora sufre una serie de cambios morfológicos que determinarán su desarrollo y diferenciación posterior. Experimenta un aumento de volumen y un cambio de forma, redondeándose. Después, durante su etapa media (Figuras 7.9 y 7.10D y D') comenzará a adoptar la forma poligonal, lobulada, típica de la especie. Además ocurren cambios en el núcleo y el citoplasma. El más importante es el proceso de vacuolación progresiva que culmina hacia el final de la interfase postmeiótica con la formación de una enorme vacuola que ocupa la mayor parte del volumen del citoplasma y empuja lateralmente el núcleo, creando una polaridad que condiciona el desarrollo posterior del grano de polen. Estaríamos aquí en el estadio tardío o vacuolado de la microspora (Figuras 7.9 y 7.10E y E').

La microspora está programada para culminar su desarrollo dando lugar a dos células con características y destinos diferentes, mediante una división (mitosis) asimétrica. El proceso de vacuolación crea las condiciones para que esta división asimétrica tenga lugar, posiblemente mediante el establecimiento de gradientes de determinados factores citoplásmicos, obligando a que la orientación del huso mitótico sea paralela a la membrana de la vacuola (tonoplasto), entre la vacuola y la pared del polen.

7.3. Microgametogénesis

La división asimétrica (denominada *primera mitosis del polen*) marca el final de la microsporogénesis y el punto de inicio de la microgametogénesis con la formación del denominado *polen* o *grano de polen,* el microgametófito. Tras la primera división mitótica, el grano de polen en su estadio joven (Figuras 7.11 y 7.12F y F') incrementa su tamaño en relación al de la microspora, y adquiere de nuevo una morfología típicamente redondeada u oval. Confinadas dentro del grano de polen hay presentes dos células diferenciadas, de distinto tamaño y con destinos y funciones diferentes, la *célula vegetativa* y la *célula generativa* (Figura 7.13). La célula vegetativa ocupa la mayor parte del volumen del grano de polen, mientras que la generativa es menor, y está incluida en el citoplasma de la anterior, próxima a la pared del grano de polen. Las células vegetativa y generativa no sólo son morfológicamente distintas, si no que además tienen un diferente programa de desarrollo. La célula vegetativa es muy activa biosintéticamente. Es la encargada de dirigir el desarrollo restante del grano de polen, y de la síntesis de la maquinaria necesaria para la formación de tubo polínico, que conduce los gametos masculinos a través del estilo hasta el saco embrionario o gametófito femenino para la doble fecundación. En cambio la célula generativa inicialmente permanece inactiva hasta que en el estadio de polen maduro entra en ciclo celular, y se divide mitóticamente dando lugar a las dos células *espermátidas* o gametos masculinos.

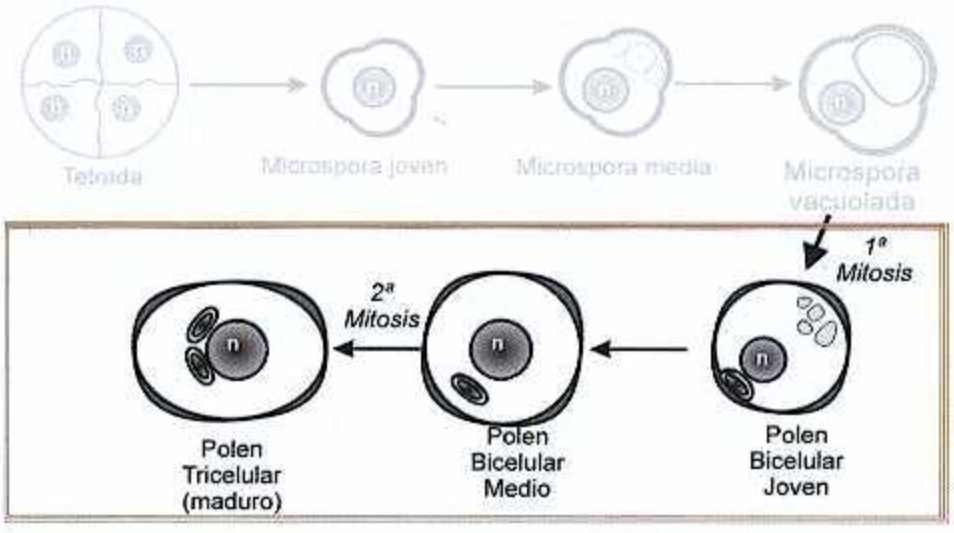


Figura 7.11: Etapas de la microgametogénesis.
Imagen de Seguí Simarro.

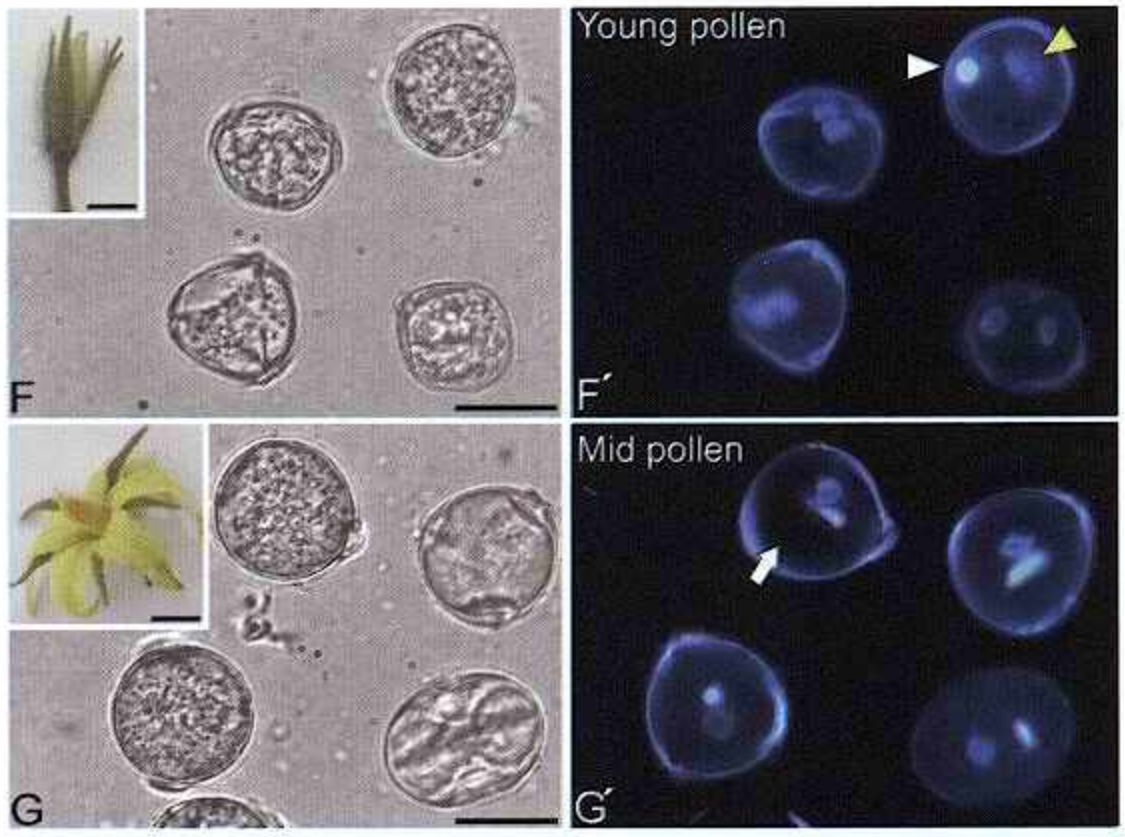


Figura 7.12: Microgametogénesis en tomate (*S. lycopersicum*). F y F': Polen joven. G y G': Polen medio. Las figuras F y G están tomadas con microscopía óptica de contraste de fase, y las figuras F' y G' con microscopía de fluorescencia sobre muestras teñidas con DAPI.
Adaptado de Seguí-Simarro y Nuez, Acta Physyologia Plantarum 2005. 27 (4B): 675-685. Imágenes de Seguí Simarro.

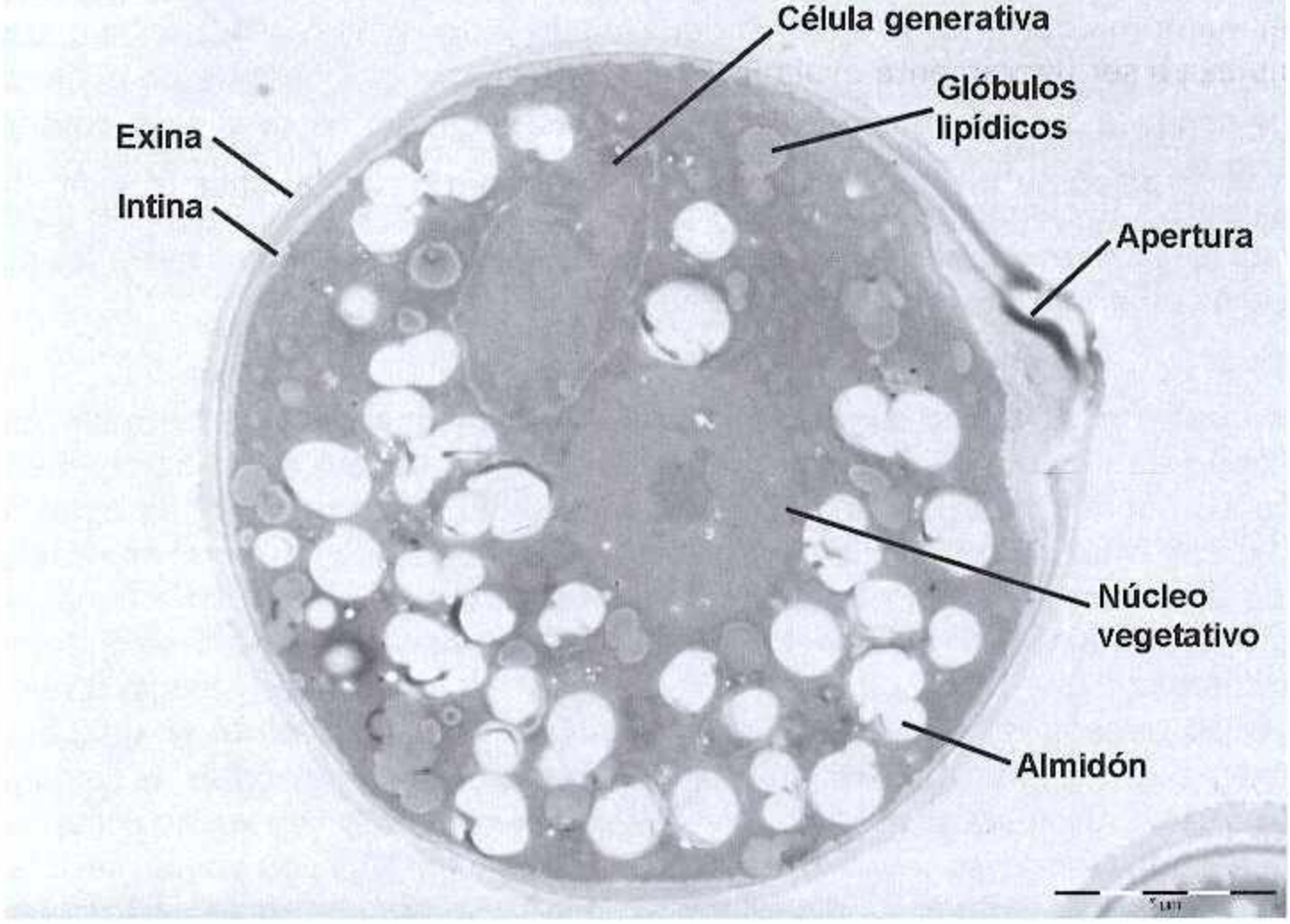


Figura 7.13: Polen bicelular medio de tomate (S. Lycopersicum) observado en el microscopio electrónico de transmisión.
Imagen de Seguí Simarro.

El citoplasma de la célula vegetativa es rico en orgánulos, que van aumentando en número durante la maduración del grano de polen, al tiempo que se reabsorbe la vacuola que ocupaba gran parte de ese citoplasma. Aparecen entonces numerosas cisternas de retículo endoplásmico y gran número de plastidios que se van llenando de almidón y otras estructuras de reserva como gotas de lípidos (Figura 7.13). La célula generativa, en cambio, presenta un citoplasma reducido a una fina capa, con escasas mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico disperso, cisternas de Golgi y plastidios, si bien están ausentes en algunas especies, posiblemente debido a la distribución polar de los orgánulos previa a la mitosis.

Pese a sus funciones y destinos claramente diferenciados, diversos trabajos han documentado una estrecha asociación entre las células vegetativa y generativa. Por ejemplo, se ha descrito una mayor densidad de poros nucleares en la superficie del núcleo vegetativo próxima a la célula generativa que en la superficie del polo opuesto. Sin embargo no hay experimentos que caractericen qué transcritos o proteínas específicas son transportados desde la célula vegetativa a la generativa.

En el estadio medio del grano de polen (Figuras 7.11, 7.12G, G' y 7.13) se siguen observando las células vegetativa y generativa, pero la generativa adquiere una morfología fusiforme, migra desde su posición inicial periférica, cercana a la pared del polen, hacia el interior del grano de polen, pasando a ocupar una posición más central próxima al núcleo vegetativo. Esta maduración va acompañada de un aumento progresivo del tamaño y de un cambio de forma, que empieza a ser ligeramente ovalada.

En el estadio de polen maduro (Figura 7.11), en la mayoría de las especies el grano de polen permanece bicelular, y las espermátidas se originan durante la emisión del tubo polínico. Es el caso del grano de polen de tabaco o pimiento. En otras especies, como maíz, gramíneas o colza, la segunda mitosis del polen ocurre antes de la dehiscencia de la antera, y por tanto de la germinación del tubo polínico, dando lugar un grano de polen tricelular (Figura 7.11). En las etapas finales de la maduración se da una drástica deshidratación en la antera que reduce el contenido de agua tanto en la antera como en el polen que contiene, desde un 90% hasta un 45-50% en el momento de la *antesis* (apertura de la flor) o dehiscencia (apertura) de la antera. Una vez la antera dehisce, el grano de polen es transportado por el viento, insectos u otros agentes al estigma de un pistilo adecuado. Entonces tendrá lugar la germinación, que veremos en el Tema 11.

Todo lo explicado hasta ahora sobre la morfología del polen ha sido basado en un polen típico de angiospermas. Aunque la función del polen en gimnospermas es básicamente la misma, su morfología es sustancialmente distinta. Así, el grano de polen maduro en una gimnosperma típica como *Pinus* (Figura 7.14) contiene cuatro células formadas por divisiones mitóticas de la microspora: dos células protálicas, una célula anteridial o generativa, y una célula del tubo polínico. En este estado es liberado de las anteras para polinizar. Además, el

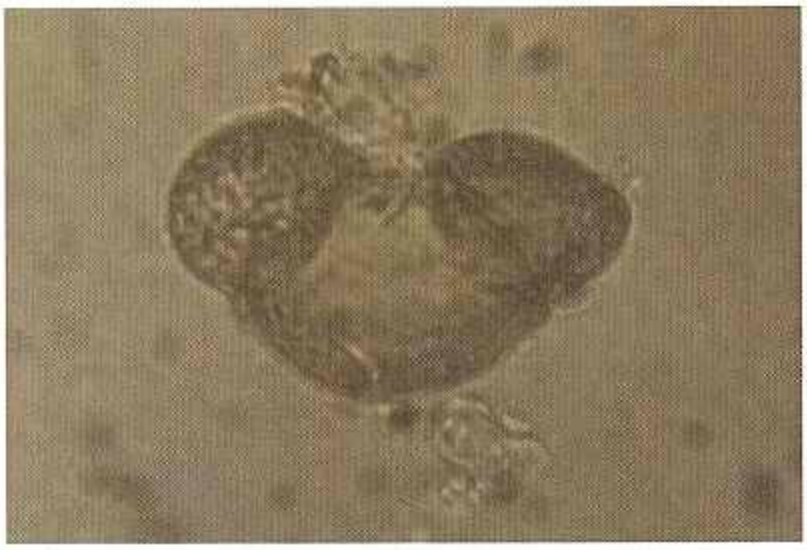


Figura 7.14: Grano de polen de *Pinus* (gimnospermas).
Imagen de Piotr Panek en Wikimedia Commons,
bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 generic
(http://creativecommons.org).

polen de *Pinus* es alado (vesiculado). Las gimnospermas suelen ser especies anemófilas (dispersan su polen mediante el viento). Para ello, han adaptado su polen para favorecer dicha dispersión, creando unos *sacos aéreos* laterales. Estos sacos se originan por la separación de las capas de ectexina y endexina de la cubierta del polen, y gracias a ellos el polen aumenta su superficie sin aumentar su peso, y por tanto aumenta su flotabilidad en el aire. Pero además, estos sacos permiten al polen flotar en el entorno del óvulo, facilitando en gran medida su introducción para la fecundación. Como la mayoría de las gimnospermas, el polen de *Pinus* posee una única apertura (es monotremo) que se sitúa en la cara distal del grano, entre los sacos laterales.

7.4. Expresión génica durante la microsporogénesis y la microgametogénesis

Durante la microsporogénesis y la microgametogénesis, las células de los microesporófitos y los microgametófitos se preparan para la generación de un tipo muy especial de células, los gametos. Y no solo eso. Además, estos gametos han de ir contenidos en un recipiente, el grano de polen, que puede viajar, transportado por el vector de polinización, durante mucho tiempo y a muy largas distancias. Por último, una vez llegue a su destino, el polen tendrá que sintetizar un tubo polínico que puede llegar a ser cientos de veces más largo que el propio grano de polen. Para todo esto se necesita fabricar un buen sistema de protección del grano de polen que le permita perdurar hasta llegar a su destino, y fabricar y almacenar todos los componentes del tubo polínico. Y no menos importante es el hecho de acumular una cantidad de reservas energéticas suficientes como para poder abastecer a toda la maquinaria celular encargada de la síntesis de los componentes de las estructuras antes mencionadas. En definitiva, para hacer posible la diferenciación y transporte de los gametos hasta el saco embrionario, se ha de poner en marcha un complejo entramado de expresión génica, en el que intervienen numerosos genes. Por ejemplo, en

polen se ha detectado la expresión de alrededor de 24.000 ARNs mensajeros. De ellos, aproximadamente unos 10.000 parecen expresarse sólo o predominantemente en polen. El resto tienen una expresión constitutiva. Es decir, se expresan también en otros tejidos de la planta, pues muy probablemente sean los encargados de la síntesis de proteínas estructurales y enzimas esenciales para el metabolismo general de las células de la planta.

La expresión de los genes implicados en todos estos procesos está regulada tanto espacialmente como temporalmente. Así, existen genes específicos tanto de tejido (tapetum, endotecio, polen, etc.), como específicos de determinados momentos del desarrollo. De hecho, en el desarrollo de la microspora y el polen hay dos picos de expresión génica (Figura 7.15). Desde la meiosis hasta la primera mitosis del polen se expresan un grupo de genes denominados *tempranos,* que tienen un papel relacionado con el desarrollo. En esta etapa, se observa el primer pico de expresión génica en torno a las etapas de microspora media y tardía (vacuolada). Es decir, la máxima actividad de expresión génica en esta etapa se concentra cerca de su final. También se ha observado una elevada tasa de síntesis de ARN ribosómico durante la interfase de la microspora, y un posterior descenso con la maduración del grano de polen. De hecho, los genes ribosómicos permanecen inactivos tras la primera mitosis del polen, y continúan así durante la maduración del polen. Estudios de la evolución de la arquitectura del nucleolo durante la interfase de la microspora han evidencia-
do una progresiva activación de la síntesis ribosómica, alcanzando su máxima actividad en el periodo G2. La biosíntesis de ribosomas durante estas fases es necesaria para la traducción de los ARN mensajeros que se sintetizarán durante el programa gametofítico.

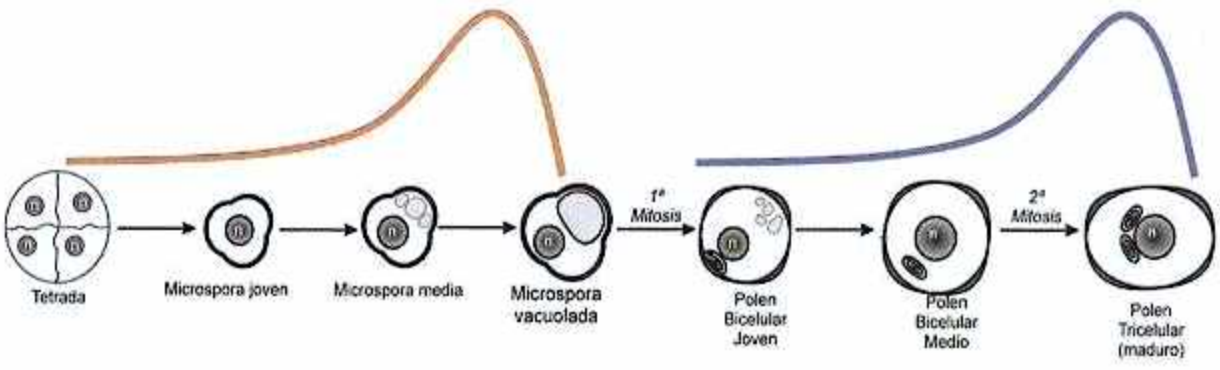


Figura 7.15: Picos de expresión génica durante la microesporogénesis y la microgametogénesis. Imagen de Seguí Simarro.

Tras la primera mitosis del polen, desde la etapa de polen bicelular joven hasta la de polen maduro, se expresan otro grupo de genes denominados *tardíos,*y que tienen un papel relacionado con la maduración, la germinación, y la síntesis de todas las sustancias necesarias para la germinación y emisión del tubo polínico. De todos los genes implicados en el desarrollo de la microspora y el polen, es de este tipo de genes de los que más se conocen. En esta etapa, se observa el segundo pico de expresión génica en torno a las etapas de polen bicelular medio y maduro (Figura 7.15). Es decir, la máxima actividad de expresión

génica en esta etapa también se concentra cerca de su final. Se sabe también que en las etapas finales de la maduración del polen, durante la deshidratación previa a la antesis, tiene lugar la expresión de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins,* HSP) de bajo peso molecular. Aunque su función biológica es desconocida, se especula con que podrían estar implicadas en la protección de estructuras celulares durante la deshidratación.

7.5. Dehiscencia de la antera

La dehiscencia en el caso de las anteras es el proceso por el cual los sacos polínicos de las tecas de las anteras se abren (Figura 7.16), de forma natural y programada, para dejar salir el polen al exterior, y así poder ser diseminado para que alcance el estigma receptor. Este hecho puede darse mientras la flor está cerrada o al producirse la antesis. El primer caso es típico de especies *cleistógamas*, o de polinización cerrada (ver Tema 9), que de esta manera se aseguran no ser polinizadas por polen proveniente de otro individuo. El segundo caso es propio de especies *casmógamas* (el resto), en las que sus anteras esperan a la antesis para entrar en dehiscencia, y así asegurarse de que su polen puede salir de la flor para ir a parar a otras flores distintas, y favorecer la *hibridación* (ver Tema 9).

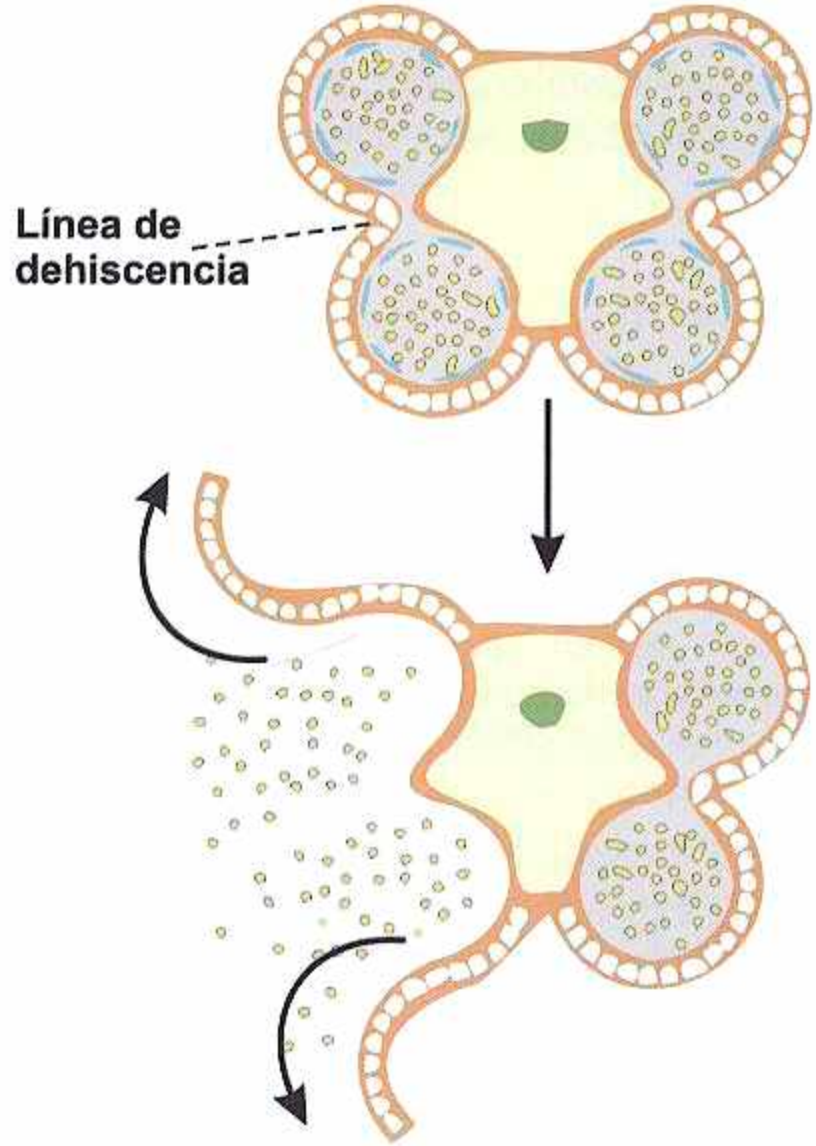


Figura 7.16: Dehiscencia de la antera.
Imagen de Seguí Simarro.

La dehiscencia se produce como consecuencia de la combinación de dos factores. Por un lado, el aire y el sol provocan la desecación y compactación de los delicados tejidos de la antera, lo cual los hace más propicios para acabar colapsando y abrirse. Pero en paralelo, en los tejidos de las paredes de la antera, se da también un proceso de muerte celular programada, por el cual una serie de células concretas de la zona por donde la antera se va a abrir (zona de dehiscencia), comienzan a morir, adelgazando la zona progresivamente hasta que junto con la acción de los agentes atmosféricos se acaba por abrir la antera.

La zona de la antera por donde se da esta apertura no es casual. Cada especie tiene un tipo de dehiscencia específica, en muchos casos dada por los mecanismos reproductivos que utilice la especie. Así, la dehiscencia (Figura 7.17) puede ser:

- **Longitudinal** (Figura 7.17A). Es el tipo más frecuente. La dehiscenciase produce a lo largo de una fisura (*línea de dehiscencia*) que recorre el eje longitudinal de cada uno de los sacos polínicos de cada teca.
- **Transversal** (Figura 7.17B). La fisura es en sentido horizontal en este caso. Aquí, la dehiscencia se produce en ambas tecas a la vez.

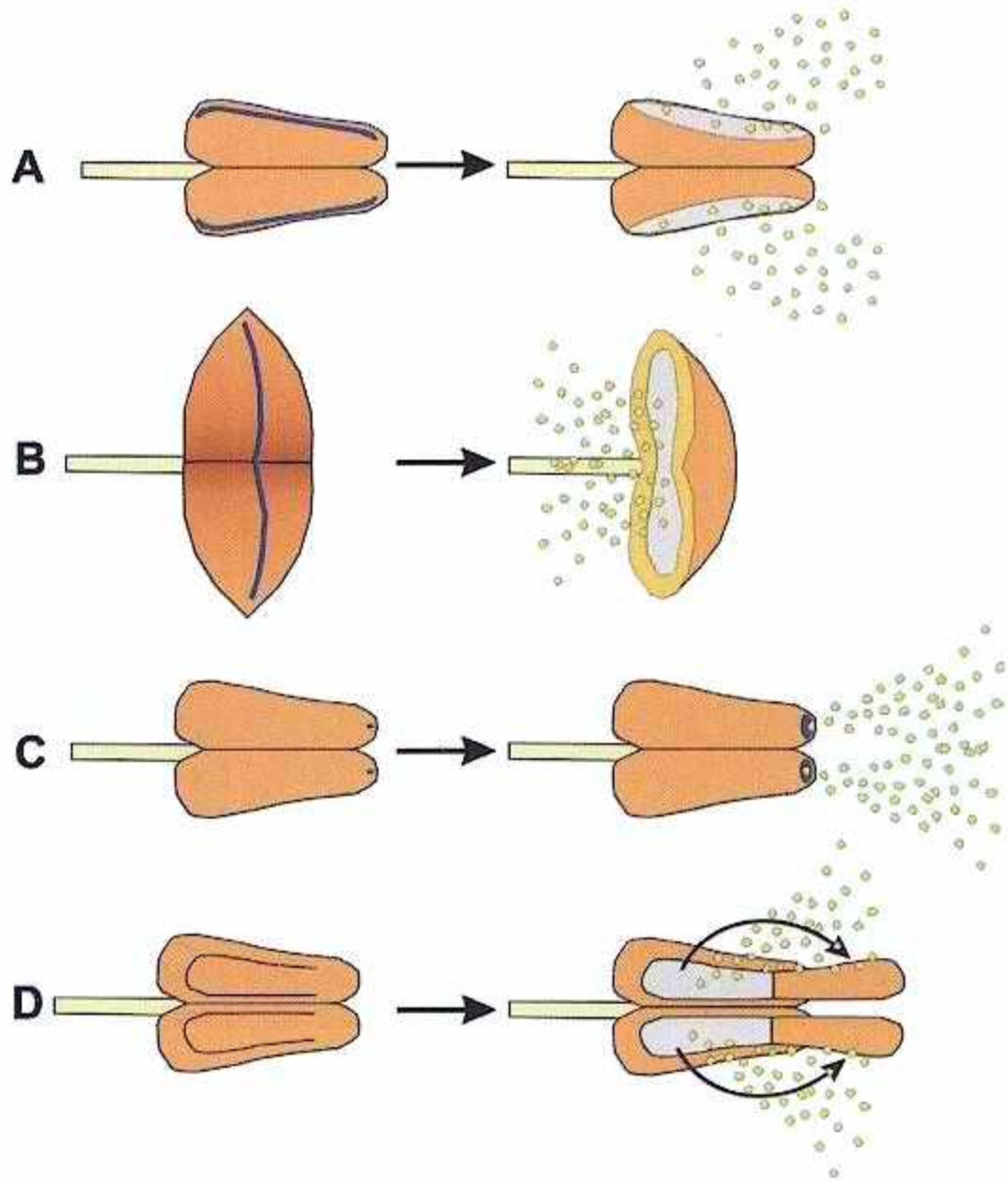


Figura 7.17: Tipos de dehiscencia de la antera.
Imagen de Seguí Simarro.

- **Foraminal** o poricida (Figura 7.17C). En este caso, la salida del polen se produce a través de un poro que se forma en el extremo distal de cada una de las dos tecas.
- **Valvar** (Figura 7.17D). En este mecanismo, la salida del polen se produce al levantarse una pequeña "tapa" en forma de valva (*lígula*) situada en la parte superior de la teca.

7.6. Palinología

Una de las características más notables de un grano de polen maduro es su aspecto externo, visible bajo un microscopio. Y además de notable, esta característica es también muy útil. La morfología external del grano de polen es un carácter muy especial y específico. Las infinitas combinaciones que se pueden formar con los distintos elementos que conforman la cubierta externa del grano de polen hacen que ésta adopte un sinfín de formas y sobre todo texturas, lo cual lo hace un carácter distintivo con el que identificar claramente cada género (Figura 7.18), y en algunos casos también incluso especies dentro de un género. En torno a esto ha surgido una disciplina botánica, denominada *palinología*, que se encarga del análisis de la morfología externa del polen, mediante el estudio y análisis microscópico de los granos de polen, y más en concreto de la estructura de su pared, sus dimensiones, forma, tamaño, simetría, contorno, aperturas, etc.

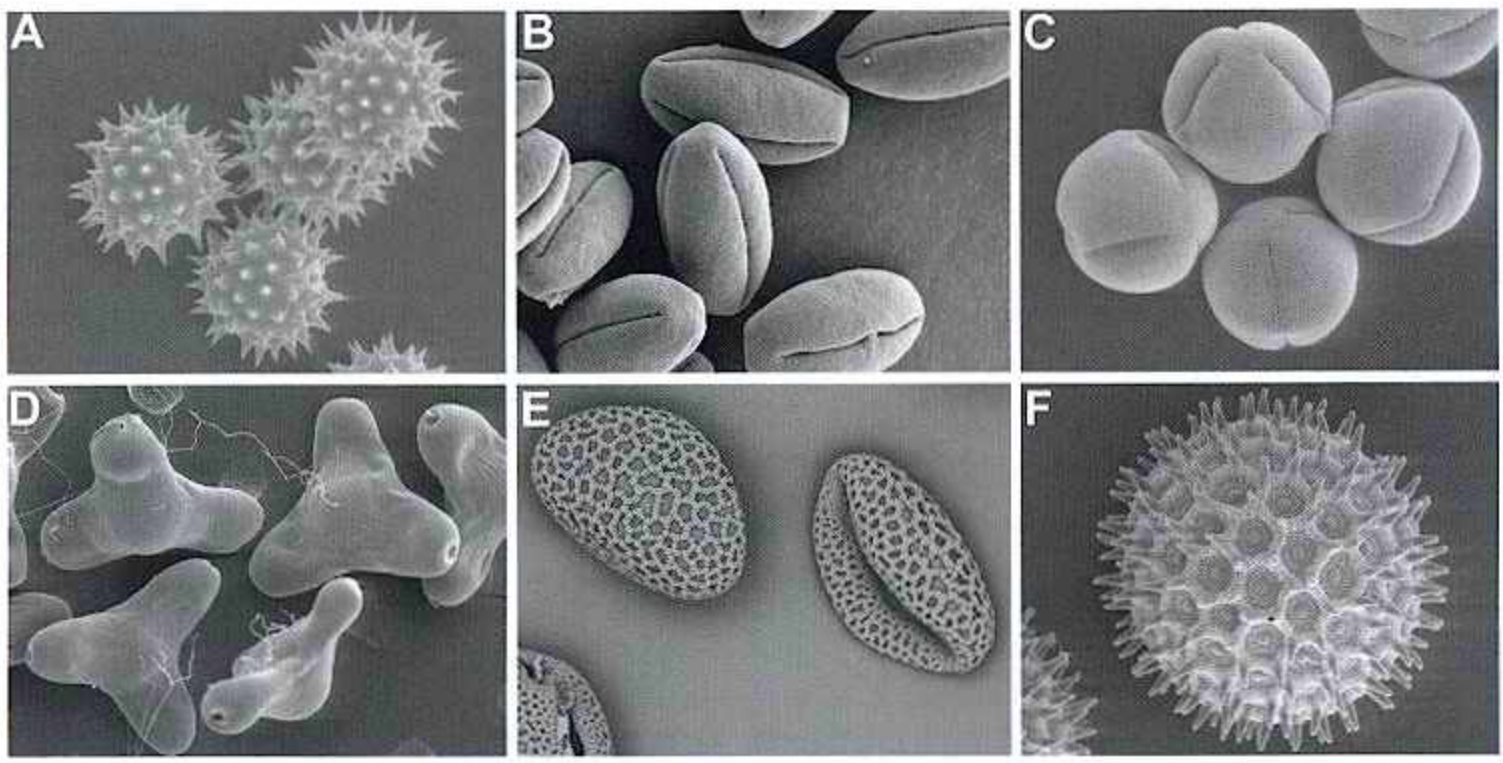


Figura 7.18: Morfología externa, observada bajo el microscopio electrónico de barrido, de granos de polen de *Helianthus annuus* (girasol, A), *Solanum lycopersicum* (tomate, B), *Ricinus communis* (C), *Oenothera fruticosa* (D), *Lilium auratum* (E) e *Ipomoea purpurea* (F).
Salvo B (imagen propia del autor), el resto de imágenes son del Dartmouth Electron Microscope Facility, de dominio público, en Wikimedia Commons.

7.6.1. Estructura y composición de la cubierta del grano de polen

Los granos de polen, una vez liberados de las anteras, están expuestos a una serie de condiciones extremas y a menudo durante largo tiempo. Una de las formas de conseguir no morir durante todo este tiempo es la deshidratación que, como vimos en el apartado 7.3, sufre el polen antes de su dispersión. Perdiendo agua, disminuye su metabolismo a un nivel basal que le permite seguir vivo consumiendo apenas recursos. Pero aparte de esto, el grano de polen necesita también resistir a altas o bajas temperaturas, sequedad, humedades excesivas, o ataques de patógenos. La protección de su contenido frente a estos agentes externos está asegurada por la presencia de una pared muy resistente, también llamada *esporodermis*. Se trata de un complejo conglomerado de proteínas, carbohidratos y lípidos que proporcionan una barrera gruesa, resistente, impermeable y muy difícil de alterar. Además, esta pared contiene proteínas y enzimas responsables de las reacciones de autoincompatibilidad que ocurren entre el polen y el estigma de algunas especies como mecanismos para prevenir la autogamia, y que veremos en el tema 9.

Cuando observamos el aspecto externo de un grano de polen, lo primero que llama la atención son las *aperturas*. Las aperturas son unas zonas concretas de la cubierta que se caracterizan por estar adelgazadas y ser flexibles (Figuras 7.18B, C y E). Esto se debe a que es por estas zonas por donde saldrá el tubo polínico cuando el grano de polen germine. Hay dos básicos tipos de aperturas, las de tipo *poro* (*poradas*) y las de tipo *colpo* (*colpadas*). Las poradas consisten en un pequeño orificio, como un poro. Las colpadas consisten en un surco longitudinal que se extiende de polo a polo del grano de polen. Además, puede haber combinaciones de poros y colpos, dando lugar a aperturas *colporadas*. También puede haber otros tipos de aperturas, menos frecuentes, de tipo *fenestrado*, entre otros.

Además de variar en forma, las aperturas varían en número. Puede haber granos sin aperturas (inaperturados), o con una apertura, o con tres, seis, o más. Si combinamos los tipos y el número de aperturas posibles, podemos encontrarnos con distintos tipos de granos de polen (Figura 7.19) en función de cuales y cuantas aperturas tengan. Por ejemplo, el polen de *Turnera* es tricolporado. Es decir, tiene tres aperturas de tipo colporado (colpo + poro). El polen de las amarantáceas es pantoporado (8 aperturas de tipo poro), y el de arroz es monoporado (una sola apertura de tipo poro).

En cuanto a la estructura de la cubierta del polen (Figura 7.20), de dentro hacia fuera se pueden distinguir dos capas principales: la *intina* y la *exina*. La intina estaría por tanto inmediatamente por encima de la membrana plasmática de la célula vegetativa del polen. La intina, responsable de la formación del tubo polínico, está presente en todos los granos de polen cubriéndolos en su totalidad. Su grosor suele ser uniforme en todo el grano de polen salvo en las zonas de las aperturas, en las que está más engrosada. Se trata de una capa delicada y poco resistente, de composición química muy similar a la de la pared primaria de una

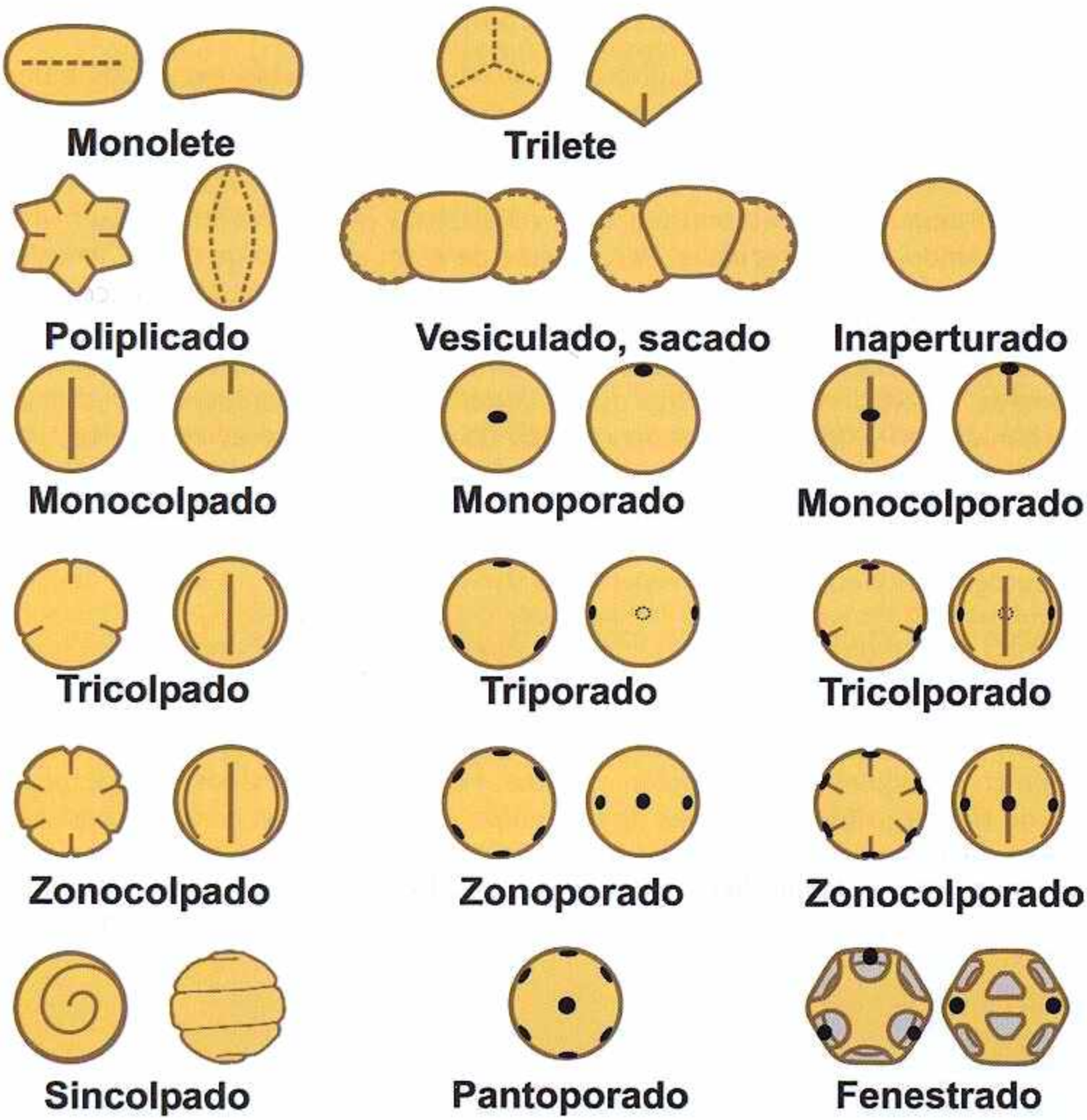


Figura 7.19: Tipos de granos de polen en función del número y tipo de aperturas que presenten.
Basado en Faegri K. y Iversen J. 1964. Textbook of pollen analysis. Hafner Pub. New York.
Imagen de Seguí Simarro.

Figura 7.20: Estructura de la cubierta del polen de *Brassica napus*.
Imagen de Seguí Simarro.

célula somática, estando constituida fundamentalmente por polisacáridos de tipo celulósico y pequeñas cantidades de pectina y proteínas.

La exina es la capa más externa (Figura 7.20). Recubre a la intina excepto en las zonas de las aperturas donde está ausente o adelgazada, precisamente para permitir la salida del tubo polínico. Es una capa gruesa y rígida, responsable de la forma y ornamentación específica de los granos de polen y además, de toda su resistencia, estanqueidad e impermeabilidad. Sus funciones serán por tanto la protección del gametofito frente a posibles daños físicos durante su transporte desde la antera al estigma de una flor, la prevención de la desecación del interior del grano, y además, la acumulación y presentación de las proteínas responsables de las reacciones de autoincompatibilidad. Algunas especies se han descrito como portadoras de polen "sin exina". Es el caso de la subfamilia *Orchidoideae* de las orquídeas, o de algunas especies del orden de las Zingiberales. Aunque aparentemente sea así, un examen más detallado de las cubiertas de estas especies revela que en realidad sí poseen una cubierta de exina, aunque bastante adelgazada. Suelen ser plantas naturales de ambientes muy húmedos, tropicales en muchos casos, donde el polen no sufre estrés hídrico y por tanto no hace falta desarrollar una cubierta gruesa, rígida e impermeable.

Aunque la composición completa y detallada de la exina todavía no se conoce, sí se sabe que está constituída fundamentalmente por *esporopolenina*, una matriz inerte, químicamente muy resistente. De hecho, se sabe que resiste a la mayoría de los tratamientos químico-enzimáticos de degradación y despolimerización (acetolisis, ácido fluorhídrico en medio acuoso). De momento, solo se conoce que sea degradable por oxidación. Esta también es la razón de que se conserve tan bien en los fósiles. Algunos autores creen que la matriz de la esporopolenina está formada por polímeros de carotenos y ésteres de carotenos. Otros, en cambio, apuestan por una composición alifática a base de ácidos carboxílicos y alcanos de cadena larga con un dominio molecular aromático. Sea como fuere, dentro de esta matriz se encuentran incluidas también proteínas, compuestos aromáticos y polisacáridos.

La exina muestra un mayor grado de diferenciación estructural en angiospermas. En las especies más evolucionadas se pueden distinguir dos partes claramente diferenciadas, la *nexina* y la *sexina*. La nexina es la zona más interna y homogénea. En algunos casos puede no estar presente. La sexina es la zona externa, la porción esculturada. Consta de una *zona* (estrato) *basal*, y una serie de *bastones* o *báculos* que pueden (o no) unirse entre sí por los extremos formando una estructura superficial continua o discontinua denominada *tectum*.

El distinto número, distribución y grado de fusión de báculos y tectos formados generará una enorme diversidad de formas y texturas en la superficie del polen. Esta variabilidad, junto con la generada por la distinta forma y tamaño del grano, y el distinto número, presencia, posición y clase de las aperturas, son las responsables de la elevada especificidad morfológica del polen de cada género, y tienen por tanto un elevadísimo valor como carácter taxonómico.

7.6.2. Unidades polínicas

Hasta ahora hemos visto las diferencias entre granos de polen individuales de distintas especies. En la mayoría de las especies, el polen es liberado así, en forma de granos individuales. Pero hay algunas especies en las que esto no sucede así, sino que los granos se agrupan formando *unidades polínicas*. Las unidades polínicas son las distintas formas en que se libera el polen. En función del número de granos de polen que se agrupen para formar una unidad polínica, ésta recibirá un nombre específico. Según esto, los granos que se dispersan en forma individual se denominan *mónadas*. Si se agrupan de dos en dos, díadas. Si forman unidades polínicas de cuatro elementos, se llaman tétradas. Este es el caso de las ericaceas, o de algunas especies de *Ludwigia*. Las tétradas suelen ser consecuencia de la no separación física de las cuatro microsporas que se generan de cada célula madre de la microspora. Durante toda la microsporogénesis y la microgametogénesis, las cuatro microsporas permanecen unidas y acaban convirtiendose en una única unidad polínica de cuatro granos de polen. Puede haber unidades polínicas de más de cuatro granos, hasta 32 (*políadas*). Esto ocurre en leguminosas y anonáceas. En algunos casos, los granos se disponen de una manera anárquica, sin seguir un orden concreto, y sin permitir por tanto identificar el número de elementos que componen la unidad polínica. En estos casos a la unidad se le denomina *másulas*. Es el caso de las orquídeas. Estas másulas tienen su máxima expresión en los *polinios*, que son masas constituidas por todo el polen de uno o varios sacos polínicos formando una única unidad polínica. Sucede en algunas orquídeas y asclepias.

7.7. Resumen

En este tema hemos profundizado en la anatomía de los estambres (cuyo conjunto es el androceo) como órganos productores de gametos masculinos. Hemos repasado las distintas partes de una antera, y nos hemos centrado en el proceso de formación de las microsporas (microsporogénesis) y del grano de polen (microgametogénesis). Durante ambos procesos se dan una serie de cambios celulares y en la expresión de algunos grupos de genes que determinan la formación de las esporas, gametófitos y gametos masculinos. Una vez los gametos (espermátidas) están formados, estos han de ser dispersados como inicio de la polinización. Para ello, la antera ha de entrar en dehiscencia. La dehiscencia es un proceso fisiológico natural que sufre la antera y por el cual sus distintos tejidos se van degradando hasta el punto que acaba abriéndose el saco polínico, lo cual a su vez permite la dispersión del polen.

Por último se ha tratado el estudio de las características morfológicas y estructurales de la cubierta externa del polen, y de cómo se agrupan los granos en unidades polínicas. Esta disciplina, conocida como palinología tiene una gran utilidad práctica, como veremos en el tema 17.

7.8. Información adicional.

- Burjachs i Casas F. 2006. Palinología y restitución paleoecológica. Ecosistemas, 15(1): 7-16.
- Canright J.E. 1952. The comparative morphology and relationships of the Magnoliaceae. I. Trends of specialization in the stamens. American Journal of Botany, 39: 484-497.
- Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology. An Introduction to the Study pollen grains and spores. Munksgaard, Copenhagen.
- Faegri K., Iversen J. 1964. Textbook of pollen analysis. Hafner Publishers. New York.
- Gola G., Negri G., Cappeletti C. 1965. Tratado de Botánica. 2ª. edición. Editorial Labor S.A., Barcelona.
- Heslop-Harrison J. 1971. The pollen wall: structure and development. En: Heslop-Harrison J. (eds.). Pollen: development and physiology. London, Butterfield and Co, 75-98.
- Hesse M., Pacini E., Willemse M.T. 1993. The tapetum: cytology, function, biochemistry and evolution. Springer-Verlag. Wien, New York.
- Hipertextos del Área de la Biología (recurso online). www.biologia.edu.ar/reproduccion/sexual.htm
- Mascarenhas J.P., Bell E. 1970. RNA synthesis during development of the male gametophyte of Tradescantia. Developmental Biology, 21; 475-490.
- Mascarenhas J.P. 1989. The male gametophyte of flowering plants. The Plant Cell. 1; 657-664.
- Mascarenhas J.P. 1990. Gene activity during pollen development. Plant Molecular Biology. 41; 317-338.
- Mascarenhas J.P. 1992. Pollen gene expression: molecular evidence. En: Russell S.C., Dumas, C. (eds.). Sexual reproduction in flowering plants, 18-30.
- McCormick S. 2004. Control of Male Gametophyte Development. The Plant Cell 2004 16: S142-153.
- Purves K.P., Sadava D., Orians, G.H., Heller H.C. 2004. Life, The Science of Biology, 7th Edition, Sinauer Associates, USA.
- Ronse De Craene L.P., Soltis P.S., Soltis D.E. 2003. Evolution of floral structures in basal angiosperms. International Journal of Plant Sciences, 164 (Supplement 5): S329-S363.
- Scott R.J., Spielman M., Dickinson H.G. 2004. Stamen Structure and Function. The Plant Cell, 16: S46-60.

- Shaw G., Apperley D.C. 1996. 13C-NMR spectra of *Lycopodium clavatum* sporopollenin and oxidatively polymerised ß-carotene. Grana, 35 (2): 125-127.
- Shivanna K.R. 2003. Pollen biology and biotecnology. Science Publishers, Inc. Enfield (USA).
- Strassburger E. 1994. Tratado de Botánica. 8ª edición. Omega, Barcelona.

TEMA 8. Gineceo y formación del gameto femenino

En este tema vamos a ver cómo y donde se forman los gametos femeninos. Al igual que vimos en el tema 7 para los gametos masculinos, veremos cómo un producto meiótico, una vez ha sufrido la recombinación y ha visto reducido su genoma a un número gamético de cromosomas (normalmente haploide), se transforma finalmente en el gameto femenino, a lo largo de dos procesos secuenciales denominados *megasporogénesis* y *megagametogénesis*. Veremos dónde y cómo transcurren estos procesos en la flor, y cómo ésta queda tras ellos preparada para ser polinizada y fecundada, aspectos éstos que por su profundidad veremos en los dos siguientes temas. Dado el papel central que tiene el aparato reproductor femenino (*gineceo*) en la formación del gameto femenino (como veremos en este tema), en la polinización (que veremos en el tema 9) y en la fecundación (tema 11), dedicaremos gran parte del presente tema al estudio de su anatomía y de la estructura de sus distintas partes.

8.1. El gineceo

De acuerdo con la Figura 3.5, el gineceo es el verticilo más interior, ocupando la posición central de la flor. Del mismo modo que otros verticilos están formados por distintas piezas (cáliz formado por sépalos, o corola formada por pétalos), el gineceo está formado por *carpelos*. Los carpelos son hojas modificadas, como el resto de piezas florales, pero en este caso especializadas en la formación de los gametos femeninos. Dicha especialización los lleva a adoptar una estructura característica en forma de botella, facilitadora de su función, denominada *pistilo* (Figura 8.1).

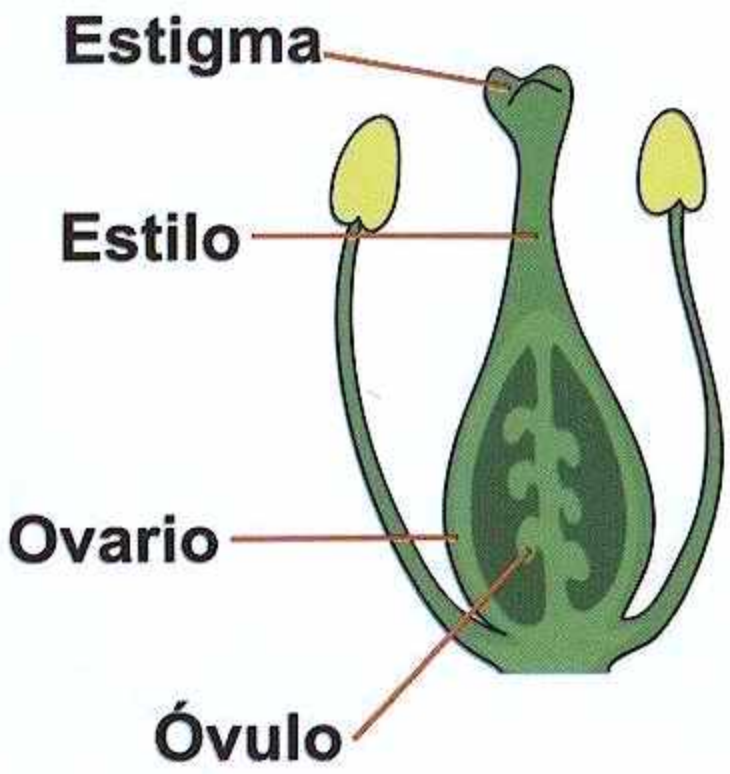


Figura 8.1: Partes del pistilo.
Imagen de Seguí Simarro.

8.1.1. Anatomía del pistilo

El pistilo es el órgano en forma de botella que presentan en su interior las flores hermafroditas y las femeninas. En ocasiones, en función de su tamaño y del de los verticilos que lo rodean, puede pasar inadvertido. Básicamente, el pistilo consta de tres partes (Figura 8.1), el estigma, el estilo y el ovario.

El estigma define la parte superior del pistilo, justo encima del estilo. En el estigma se depositarán los granos de polen para su germinación.

El estilo es, siguiendo con el símil de la botella, su cuello. Es la zona, más o menos larga, situada entre el ovario y el estigma.

El ovario es la parte inferior abultada que forma la cavidad ovárica o lóculo en cuyo interior se forman los óvulos, dentro de los cuales se generará el gameto femenino. Es, pues, la parte fértil del gineceo.

El pistilo puede estar constituido por un único carpelo. En ese caso, los carpelos de la flor están separados, libres entre sí, y la flor tendrá tantos pistilos como carpelos tenga, en función de su fórmula floral. En estos casos, el gineceo se denomina *dialicarpelar, coricárpico* o *apocárpico*. Es el caso de *Sedum* (Figura 8.2), *Kalanchoe* o *Paeonia*.

Figura 8.2: Gineceo apocárpico de *Sedum*.
Imagen de Segui Simarro.

Puede pasar también que todos los carpelos se fundan, igual que lo hacen las piezas de otros verticilos, formando en este caso un pistilo único, como en *Tulipa* (Figura 8.3), *Passiflora, Brachychiton, Solanum,* y muchos otros géneros. En estos casos, gineceo y pistilo son términos equivalentes, pues el conjunto de todos los carpelos forma un único pistilo. A este tipo de gineceo se le denomina *gamocarpelar* o *cenocárpico*.

Pueden haber casos intermedios, en los que haya fusión de carpelos, pero parcial en lugar de total. Así, la soldadura puede afectar sólo al ovario, quedando libres estilos y estigmas, como en el caso de *Turnera*. O bien puede afectar a ovarios y estilos, quedando libres solo los estigmas, como en *Hibiscus* (Figura 8.4). O bien puede afectar a todo el carpelo, quedando una única estructura en la que el número de carpelos se marca en los lóbulos del estigma, como en bignoniaceas o nogal, entre otras muchas especies.

Figura 8.3: Gineceo sincarpico en *Tulipa*.
Imagen de techny57 en Stock.xchng (www.sxc.hu), bajo licencia sxc.

Figura 8.4: Estilo y estigmas de *Hibiscus*.
Imagen de dominio público, en Wikimedia Commons.org.

En la mayoría de las gimnospermas, los carpelos son abiertos, libres, y se limitan a soportar los óvulos. No se diferencia ni el estilo ni el estigma, ni se forma una cavidad ovárica. Es decir, los óvulos están expuestos, desnudos.

Por ejemplo, en una gimnosperma típica como las del género *Pinus* (Figura 8.5), las flores femeninas carecen de perianto y están reunidas en una inflorescencia llamada *cono femenino* o *estróbilo*.

Figura 8.5: Inflorescencia o cono femenino de *Pinus*.
Imagen de contenido libre de www.morguefile.com.

Cada flor consiste en un carpelo o *escama ovulífera*. Cada escama ovulífera generalmente consta de dos óvulos. Las flores de gimnospermas suelen estar en las axilas de las brácteas tectrices que conforman el estróbilo o cono femenino.

8.1.2. Evolución del gineceo

El hecho de que algunos pistilos estén formados por carpelos fundidos y otros no tiene una explicación basada en la evolución de esta estructura a lo largo de la historia evolutiva de las angiospermas. Los carpelos de las angiospermas suponen una innovación respecto a los de sus antecesores, pues forman estructuras selladas, encerrando completamente a los óvulos. Como acabamos de ver en el punto anterior, en las gimnospermas el óvulo está expuesto, lo cual supone una serie de amenazas a su integridad. En angiospermas, el óvulo está protegido dentro de un receptáculo, el ovario ("angiosperma" viene del griego *angios*, vaso, recipiente, en alusión a la cavidad ovárica), formado por el o los carpelos, y por tanto el polen no puede acceder directamente al óvulo. Para ello se desarrollan otra serie de estructuras (como el estigma) que recibe al polen, lo "selecciona", y le ayuda a emitir el tubo polínico para el transporte de gametos al saco embrionario, como veremos en el tema 12.

Si vamos más abajo de las gimnospermas en la escala evolutiva, veremos que la tendencia a presentar los óvulos, y en general los esporangios expuestos es habitual. Algo parecido a lo que vimos con la evolución de los estambres en el tema 7. En base a esto, se elaboró un modelo semejante para explicar la evolución del gineceo (Figura 8.6), a partir de una hola fértil primitiva portadora de los esporangios en sus bordes. A lo largo de la evolución, estas hojas fértiles irían modificándose hacia los carpelos tal como se conocen en las angiospermas, curvándose hacia dentro de modo que dejan los esporangios (óvulos), en su interior. Un paso más en la evolución sería su cierre y soldadura, formando

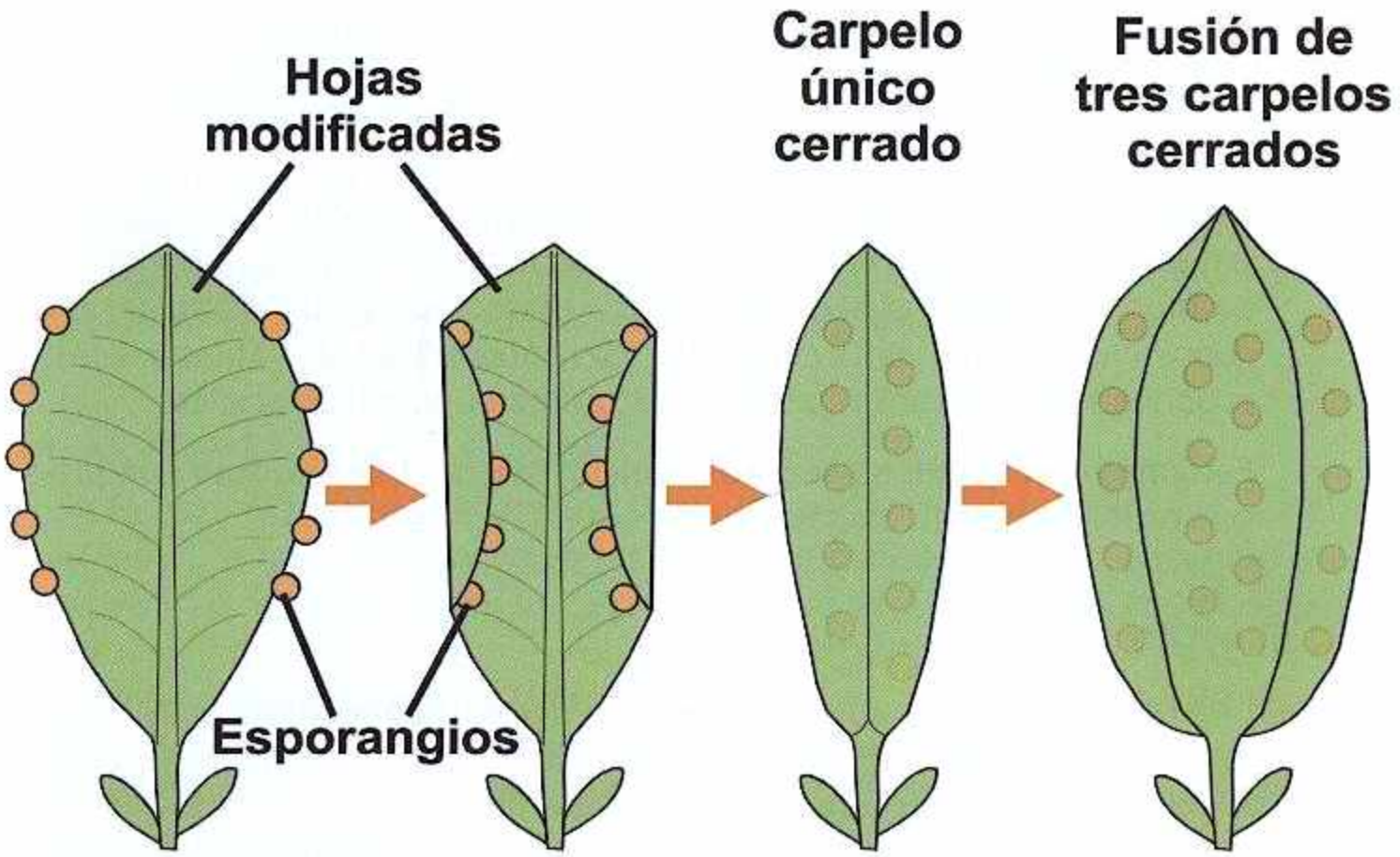


Figura 8.6: Evolución del gineceo desde hojas fértiles primitivas hasta los ovarios pluricarpelares de las gimnospermas actuales.
Imagen de Seguí Simarro.

una cavidad cerrada precursora del pistilo apocárpico. El último paso sería la fusión de varios de estos carpelos cerrados, para formar pistilos compuestos por varios de ellos, de tipo cenocárpico.

8.2. El estigma

El estigma es la parte más alta del pistilo. Se trata de un tejido glandular especializado para la recepción de los granos de polen que intervienen en la fecundación. En el estigma se depositarán los granos de polen para su germinación, siempre y cuando sean compatibles. Porque además, el estilo es la parte del gineceo encargada de determinar si un polen es compatible o no con dicha flor, en base a la expresión de una serie de determinantes de autoincompatibilidad, como veremos en el tema 9. Estos determinantes suelen ser proteínas hidrofílicas situadas en la pared externa, y que actúan tanto en el reconocimiento del polen adecuado, como el el desencadenamiento de las reacciones

de incompatibilidad, en cuyo caso a veces se deposita calosa para detener la germinación del polen extraño.

Los estigmas se dividen en 2 grandes grupos:

- *Estigmas húmedos*, que secretan durante su período de receptividad del polen un exudado de contenido esencialmente de tipo polisacárido en monocotiledóneas y de naturaleza lipídica en dicotiledóneas. En algunos casos (familias *Orchidaceae*, *Scrophulariaceae* y *Solanaceae)*, se producen secreciones mixtas de naturaleza lipopolisacarídica.
- *Estigmas secos*, que no secretan ningún tipo de líquido, sino que producen proteínas o sustancias de tipo céreo.

8.3. El estilo

El estilo es la parte estéril que soporta el estigma. Puede tener una longitud sumamente variable, desde menos de 0,5 mm (con lo que el estigma correspondiente se denomina *estigma subsésil*), hasta más de 30 cm en ciertas variedades de maíz, que forman las barbas características del ápice de las inflorescencias

Figura 8.7: *Gloriosa rotschildiana*. La flecha blanca señala el estilo geniculado.
Imagen de Forest y Kim Starr, en Wikimedia Commons, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported

femeninas (mazorcas). Su longitud variable está también relacionada, al igual que los determinantes de autoincompatibilidad del estigma, con el modo de reproducción (alógama o autógama) de la especie. Lo veremos en el tema 9.

Generalmente nace en el ápice del ovario, pero puede también nacer desde un lateral del ovario, o nacer aparentemente en la base (estilo *ginobásico*). Aunque normalmente son rectos, pueden en algunos casos estar doblados (estilo *geniculado*), como en *Gloriosa rotschildiana* (Figura 8.7).

8.4. El ovario

El ovario es la estructura central de la reproducción sexual de las plantas, pues en él tienen lugar la mayoría de los procesos conducentes a la formación de un nuevo individuo por esta vía. En el ovario se encuentran los óvulos (Figuras 8.8 y 8.9), como ahora veremos. En ellos se forman los gametófitos femeninos (*saco embrionario*). El ovario tiene, por tanto, una primera función protectora, frente a la desecación y contra el ataque de insectos polinizadores, de todas las delicadas estructuras que se van a formar en su interior. Esta es una de las grandes diferencias entre angiospermas y gimnospermas, que como hemos

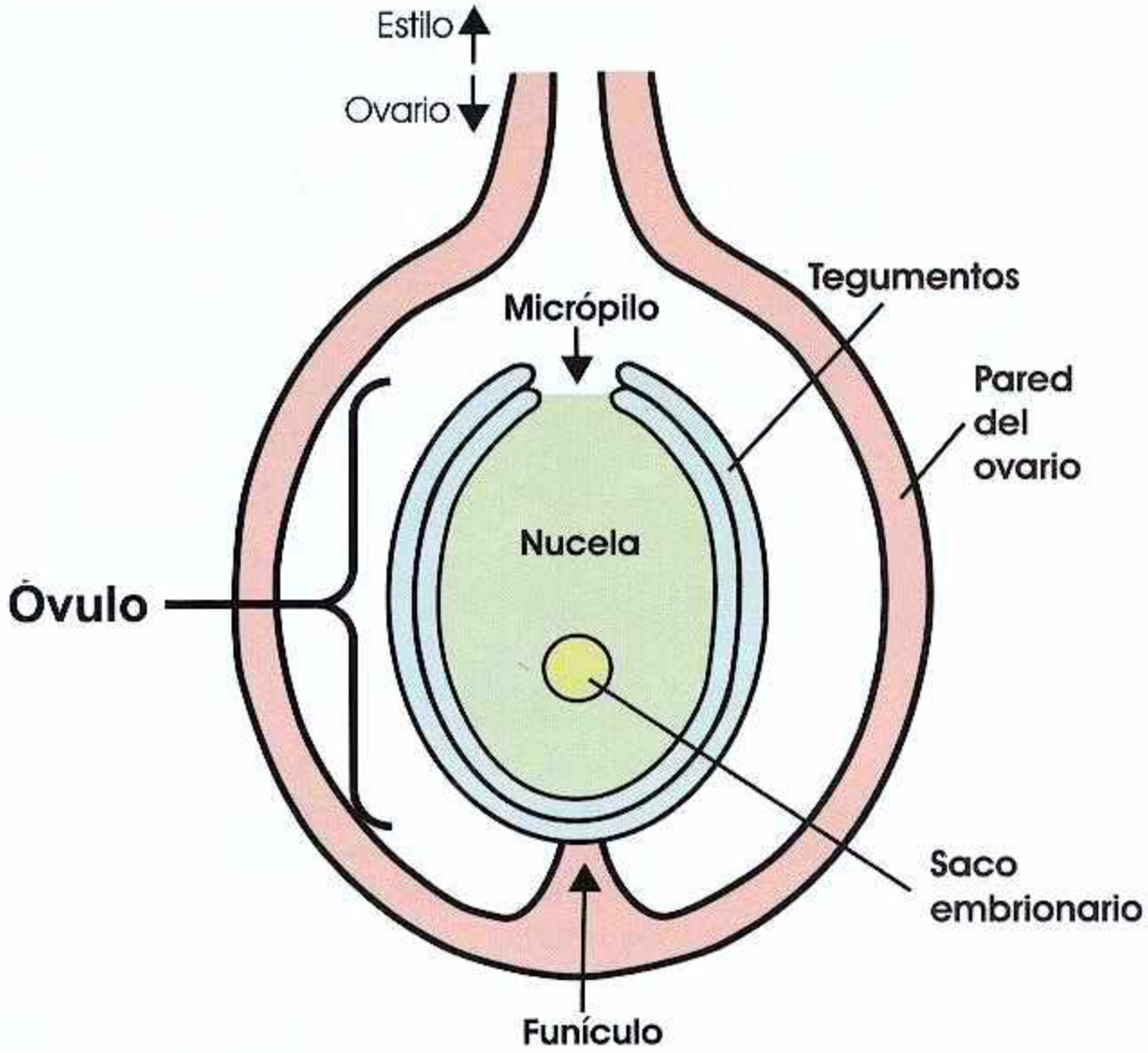


Figura 8.8: Esquema de un ovario típico de angiospermas. Imagen de dominio público en Wikimedia Commons

mencionado antes, carecen de cavidad ovárica. También dentro del ovario se dará la fecundación y el desarrollo del nuevo embrión, rodeado de la semilla. Mientras todo esto sucede, será el propio embrión el que sufra una serie de transformaciones para convertirse en el fruto característico de cada especie. Esto último lo veremos en el Tema 12.

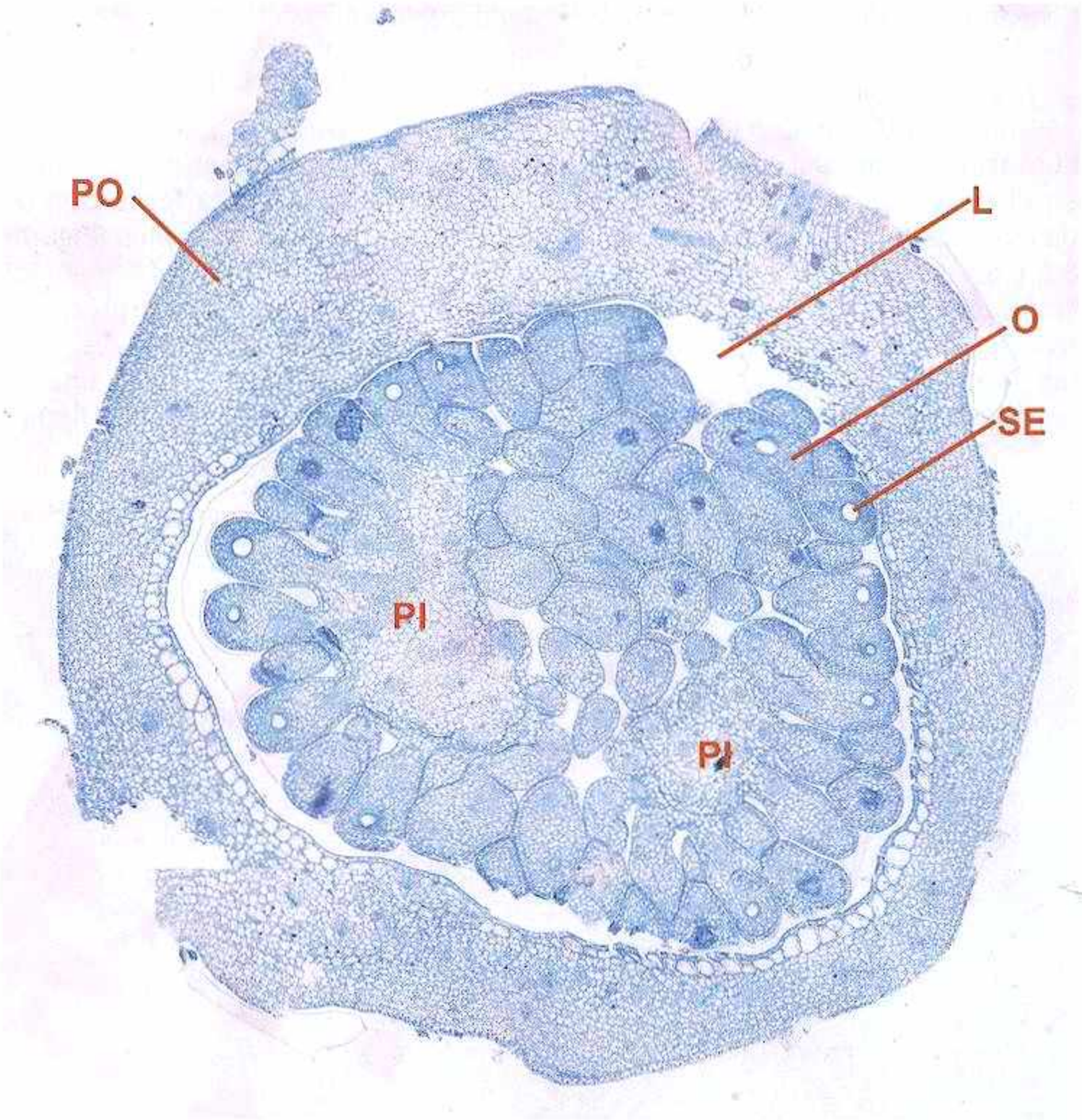


Figura 8.9: Sección transversal de un ovario de pimiento (*Capsicum annuum*). L: lóculo; O: óvulo; Pl: placenta; PO: Pared del ovario; SE: saco embrionario.
Imagen de Segui Simarro.

El ovario puede situarse a distintas alturas respecto al resto de estructuras de la flor. Esta disposición del ovario tendrá relevancia cuando se transforme en fruto. Así, podemos distinguir tres tipos de ovarios según su posición (Figura 8.10):

- *ovario súpero*: el ovario se encuentra sobre el receptáculo, insertado al mismo nivel que las otras piezas florales. Por tanto, los sépalos, pétalos y los estambres emergerán desde la base del ovario, que quedará en la parte alta de la flor, frecuentemente visible. Los receptáculos que albergan este tipo de ovarios suelen ser cónicos o convexos. Las flores con este tipo de ovarios se denominan *hipóginas*. Como ejemplos de frutos derivados de ovarios súperos podríamos citar las drupas.
- *ovario semiínfero*: el ovario se sitúa en una posición intermedia, a medio camino entre la que adopta un ovario súpero y uno ínfero. Sépalos, pétalos y estambres estarán insertados a la altura del plano ecuatorial de ovario.
- *ovario ínfero*: el ovario se sitúa completamente por debajo de los otros verticilos, sobre un receptáculo que suele ser cóncavo, y sépalos, pétalos y estambres quedan insertados en la parte superior del ovario, a la altura del inicio del estilo. Las flores con este tipo de ovarios se denominan *epiginas*. Como ejemplos de frutos derivados de ovarios súperos podríamos citar las balaustas (las granadas, por ejemplo), o los pomos (manzanas, por ejemplo). Suelen ser frutos donde el receptáculo forma también parte del fruto.

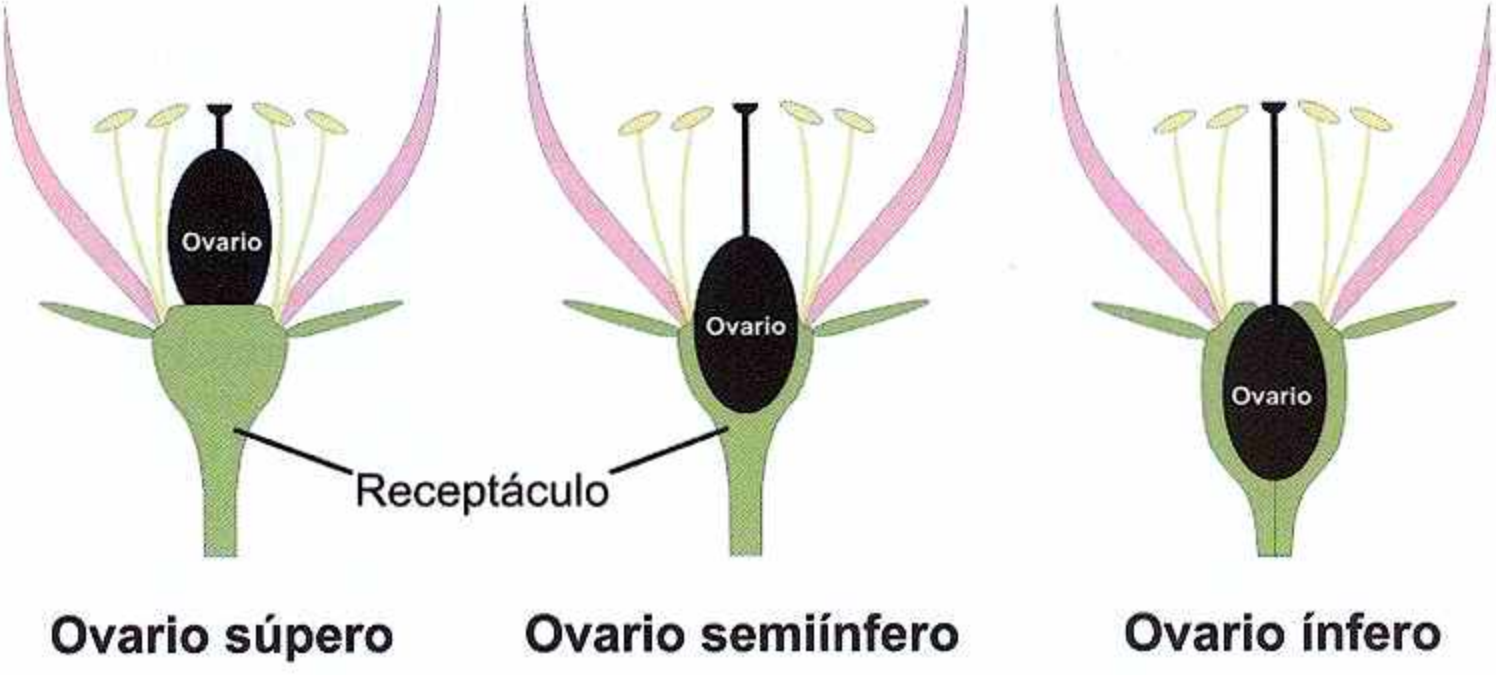


Figura 8.10: Tipos de ovarios según su posición en la flor.
Imagen de Seguí Simarro.

Cuando es un solo carpelo el que forma el ovario (apocárpico), obviamente solo habrá una única cavidad ovárica o *lóculo*. Pero esto ya no será tan obvio si son más de uno los carpelos que se funden para conformar el ovario cenocárpico. Por ejemplo, puede pasar que cada lóculo proveniente de cada carpelo se mantenga físicamente separado de los demás por medio de tabiques o *septos*, derivados también de la propia hoja carpelar. Así, podrán aparecer ovarios biloculares, triloculares, y pluriloculares en general (Figura 8.11). Dentro de la

cenocarpia, a esta variante con presencia de septos se le denomina *sincarpia*. Puede también pasar que todos los carpelos se fusionen sin tabicar, formando un lóculo único (Figura 8.11). A esta variante unilocular de la cenocarpia se le denominara *paracarpia*.

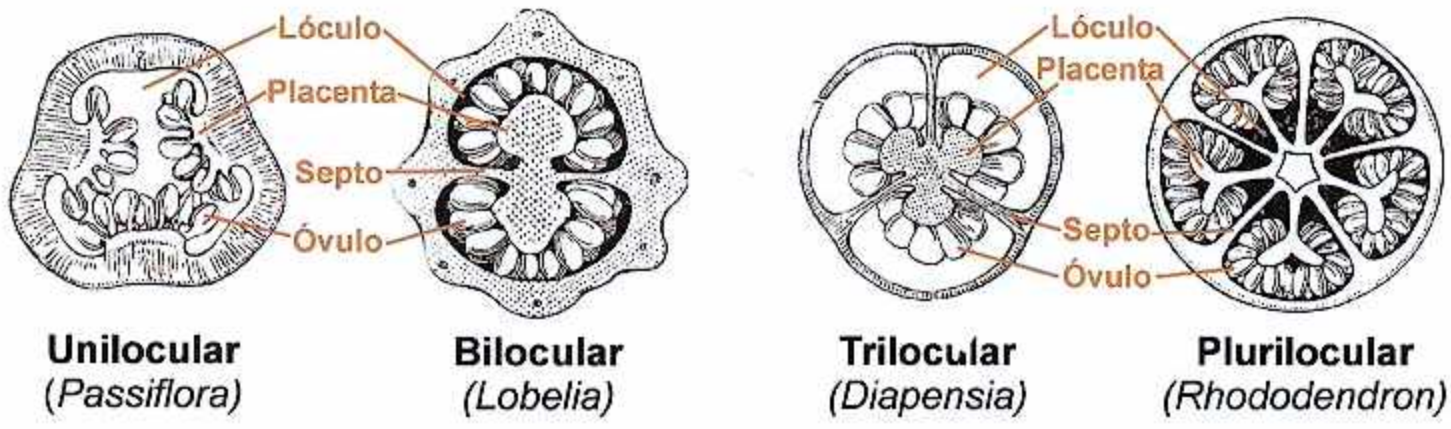
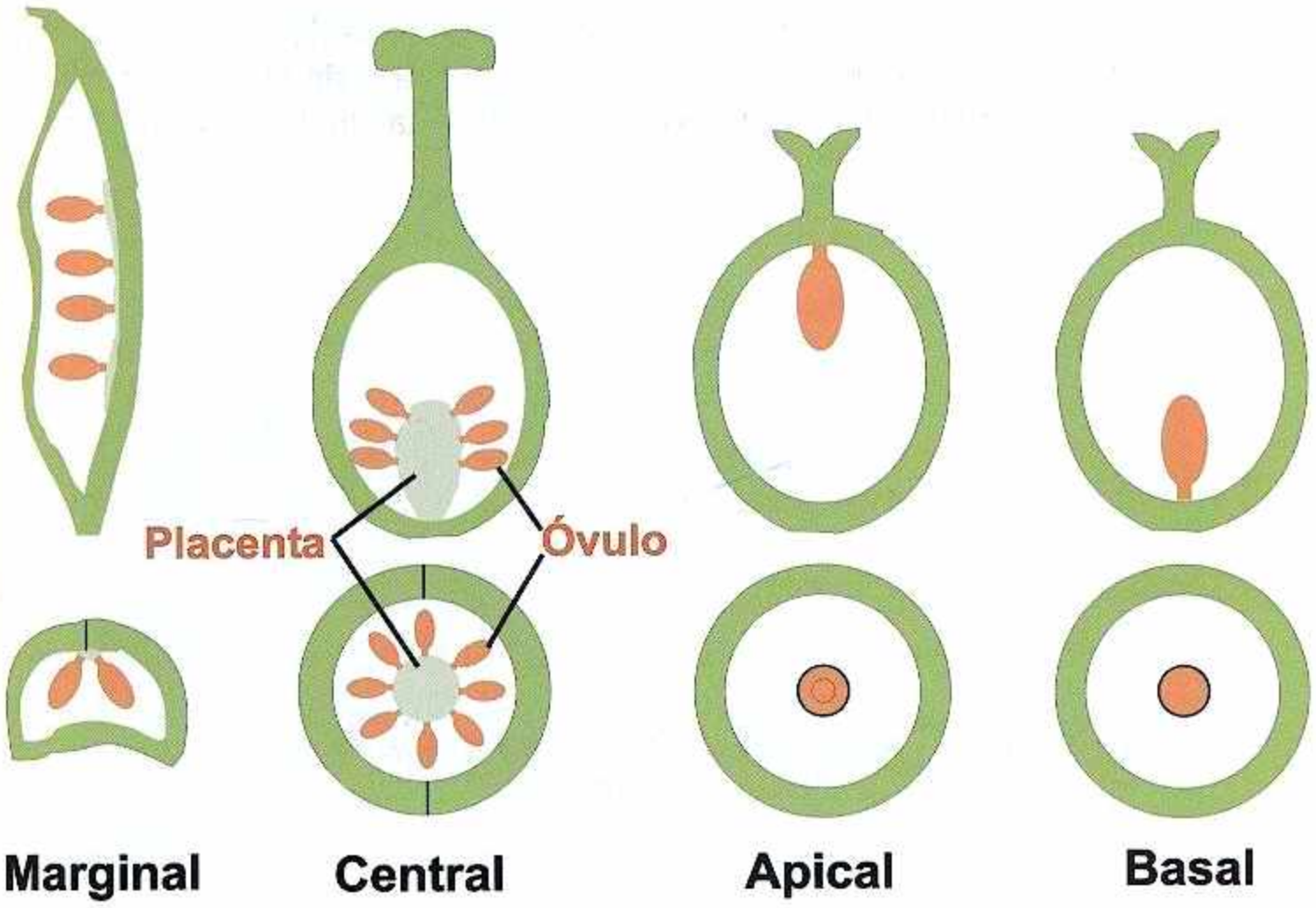


Figura 8.11: Tipos de ovarios en función del número de lóculos formados. Imagen de E. Strasburger (Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. G.Fischer, Jena, 1900), de dominio público, en Wikimedia Commons.

El tejido de la cara interna del carpelo sobre el cual se forman y sustentan los óvulos, recibe el nombre de *placenta*. Cada carpelo tiene dos placentas, generalmente situadas en los bordes engrosados de la hoja carpelar. En algunos casos el engrosamiento puede adquirir un volumen relevante. La placenta es el tejido que sustenta los óvulos (Figura 8.9), responsable del aporte de nutrientes a los óvulos y en definitiva a los sacos embrionarios, embriones y semillas en formación. Tendrá también un papel importante en la estructura del fruto, pues como el resto del ovario, se transformará para formar parte del fruto (ver tema 13). En ovarios sincárpicos, suele haber una placenta por cada lóculo que se forma. En ovarios paracárpicos, el número de placentas dependerá del número de carpelos que se hayan fundido.

La *placentación* es la disposición de las placentas y por ende de los óvulos en la cavidad ovárica de las angiospermas. Aunque el número de placentas suele coincidir con el número de carpelos, pueden haber excepciones como en el caso de las gramíneas (*Poaceae*), en las que un ovario pluricarpelar acaba con un único óvulo por atrofiarse alguna de las placentas. Puede haber distintos tipos de placentación (Figura 8.12), en función del tipo de ovario de que se trate, y de los lóculos de los que conste, lo cual a su vez, suele venir dado por el número de carpelos que se funden para formar el pistilo.

- *Placentación marginal*: Cuando solo es un carpelo el que forma el pistilo, las placentas, que se encuentran en los bordes del carpelo, se unen en la zona de la sutura formando una única placenta. Esta placentación es típica de gineceos unicarpelares como los de las leguminosas o dialicarpelares (apocárpicos) como los de las magnoliáceas o las ranunculáceas.



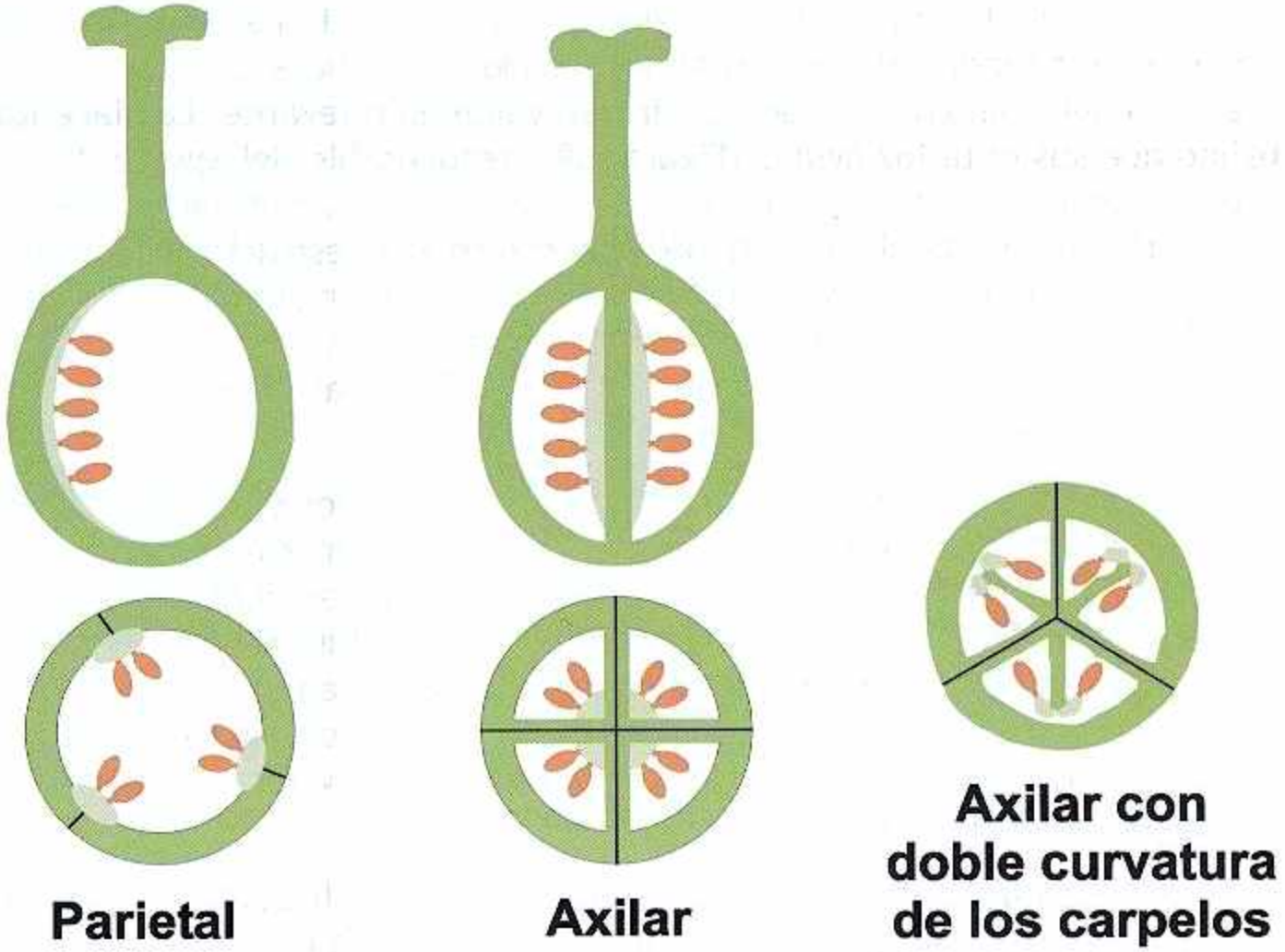


Figura 8.12: Tipos de placentación. Las imágenes superiores representan cortes longitudinales, y las inferiores cortes transversales del mismo ovario.
Imágenes de Seguí Simarro.

- *Placentación central*: En un ovario unilocular de un pistilo que puede ser di o pluricarpelar, se forma una columna placental central, sin tabiques que la conecten con las paredes del ovario. Esta columna puede estar formada por una única placenta basal que se prolonga en la columna (ej.: primuláceas), o por varias placentas que se funden en la columna y que persisten tras disolverse los tabiques (ej.: cariofiláceas).
- *Placentación apical*: La o las placentas se disponen en la parte superior del eje central de un gineceo pluricarpelar que puede ser unilocular o plurilocular (sincárpico).
- *Placentación basal o basilar*: La placenta y el ovulo se disponen en el centro de la base del ovario pluricarpelar que puede ser unilocular o plurilocular. Es típico de las familias de las poligonáceas, quenopodiáceas y asteráceas.
- *Placentación parietal*: Ocurre en ovarios pluricarpelares y uniloculares. Las placentas se disponen de manera que cada placenta y los ovarios sobre ella, aparecen en los laterales sobre la sutura de dos hojas carpelares contiguas. Es típica de familias como las orquídeas, pasifloráceas, cucurbitáceas o violáceas.
- *Placentación laminar* (o parietal difusa): Es una variante de la placentación parietal que sucede cuando se forman falsos tabiques en el ovario, cuya función es incrementar la superficie de la placenta. Es típica de *Papaver*, o de las crucíferas, en las que el ovario es dicarpelar y unilocular, pero entre las dos suturas aparece un tabique membranoso delgado (*peplum*), que separa físicamente el ovario en dos lóculos.
- *Placentación axilar*. Ocurre en ovarios bi o pluricarpelares sincárpicos cuando las placentas se disponen en el eje central. Las placentas se disponen en el ángulo central de cada uno de los lóculos formados, emergiendo de la columna central formada por la unión de todos los septos. Es típica de géneros como *Solanum*, *Citrus* o *Iris*, entre otros.
- *Placentación axilar con doble curvatura de los carpelos* (o placentas intrusivas): En algunos casos los septos formados por la curvatura (pliegue) de los carpelos, se extienden de nuevo hacia el interior de cada lóculo debido a un segundo pliegue del carpelo. En este caso las placentas aparecerán en la zona central del lóculo, o cerca de la pared externa del ovario.

8.5. El óvulo

El óvulo es el lugar donde se desarrollará el gameto femenino, dentro del saco embrionario. Tras la fecundación, será por tanto el portador del embrión. Con el paso de flor a fruto, el óvulo se transformará en semilla. Los óvulos nacen sobre las placentas (Figura 8.13), situadas en la cara interna del carpelo. Son de tamaño reducido, de pocos milímetros, y generalmente de forma ovoide, de allí

su nombre. A veces se confunde el óvulo con el gameto femenino, puesto que en animales se utiliza esta misma palabra para designar al gameto femenino. Conviene dejar claro que en plantas, el óvulo no es el gameto femenino, que como acabamos de mencionar es la célula huevo, que se desarrolla dentro del óvulo.

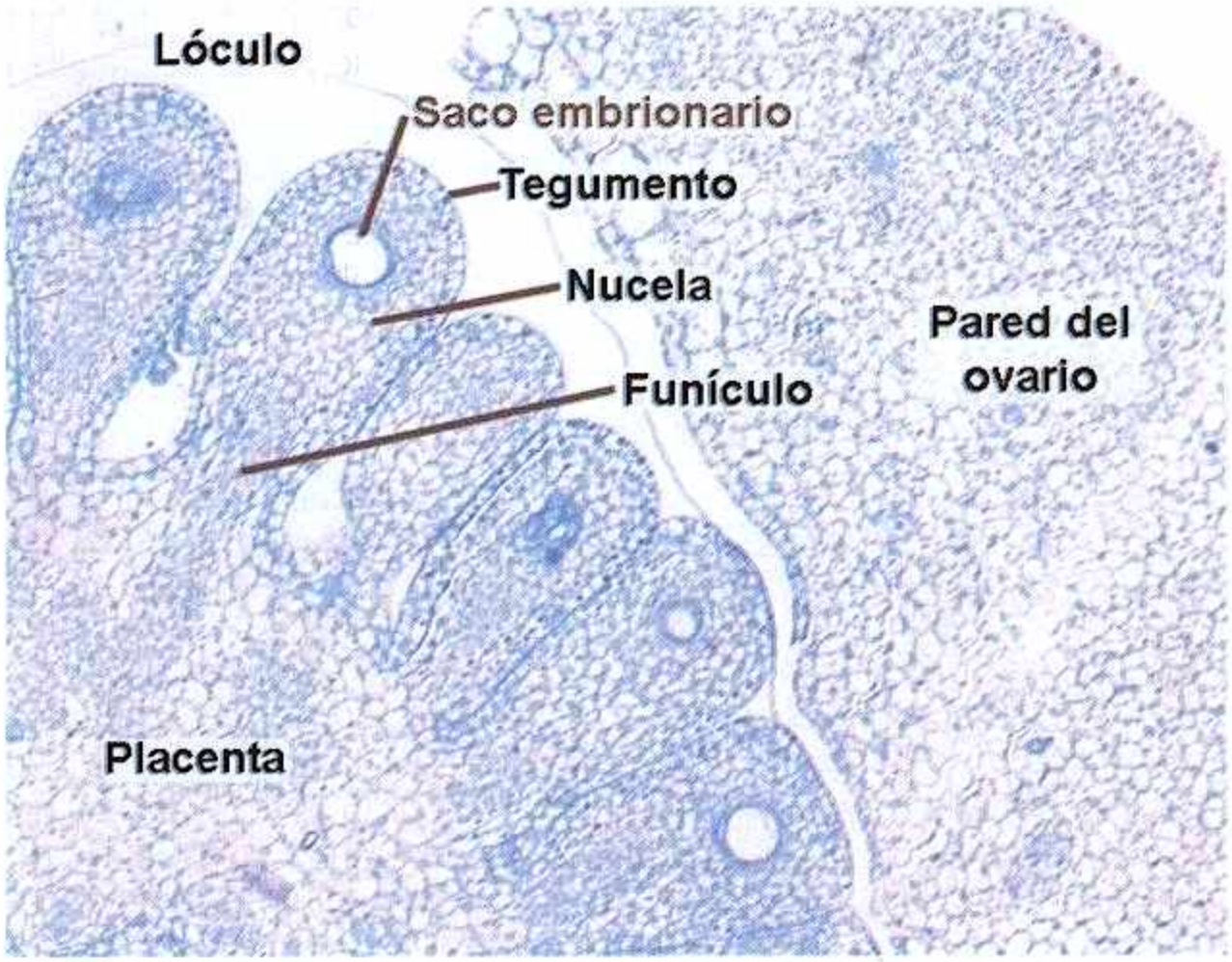


Figura 8.13: Sección transversal de un ovario de pimiento (*Capsicum annuum*) en el que se observan óvulos no fecundados sobre la placenta.
Imagen de Seguí Simarro.

Dentro de un mismo ovario puede haber desde un único óvulo hasta cientos de ellos, dependiendo de la especie. Anatómicamente, cada óvulo consta (Figura 8.13) de:

- un cuerpo de tejido compacto, la *nucela*
- un pie, el *funículo*, que lo une a la placenta, y por el cual recibe los nutrientes de ella.
- una región basal, donde se unen el funículo y la nucela, que se denomina *cálaza* o *chalaza*.
- una serie de capas (una o dos) de tejido que parten de la chalaza y que rodean la nucela. Se denominan *tegumentos*.
- un orificio llamado *micrópilo* que permitirá el paso del tubo polínico al saco embrionario para la fecundación.

Según la posición relativa del micrópilo, la chalaza y el funículo, podemos distinguir tres tipos de morfologías del óvulo (Figura 8.14)

- *Ortótropo* (también llamado *átropo* o recto): el funículo, la chalaza y el micrópilo se alinean a lo largo de una misma línea recta.
- *Anátropo*: el óvulo se curva de modo que el micrópilo está próximo al funículo, y la chalaza al lado opuesto. El funículo está soldado al tegumento formando un engrosamiento (*rafe*).
- *Campilótropo* o encorvado: el óvulo se curva de modo que queda perpendicular al eje del funículo, con lo que la chalaza queda próxima al funículo.

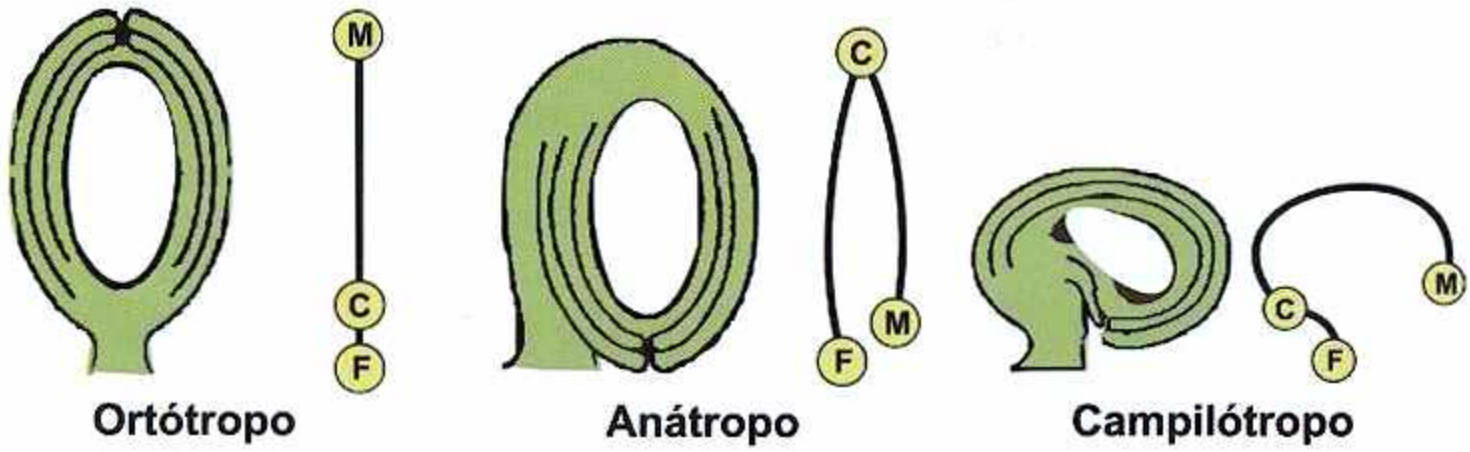


Figura 8.14: Tipos de óvulo según la posición relativa del funículo (F), la chalaza (C) y el micrópilo (M).
Imágenes de Seguí Simarro.

8.6. Megasporogénesis y megagametogénesis

La megasporogénesis es el proceso de formación y desarrollo de la megaspora. A lo largo de este proceso, el producto proveniente de la meiosis se convierte en la megaspora (el esporófito femenino). Esta, a su vez, alcanza su madurez y queda listo para convertirse en el gametófito (megagametófito). Esta conversión viene mediada por una mitosis que marca el fin de la megasporogénesis y el comienzo de la megagametogénesis (Figura 8.15). La megagametogénesis es el proceso de formación del gameto femenino, o megagameto. Durante este proceso, el gametófito femenino (denominado *saco embrionario*) se desarrolla y se prepara para la formación del megagameto (la *célula huevo, ovocélula* u *oosfera*).

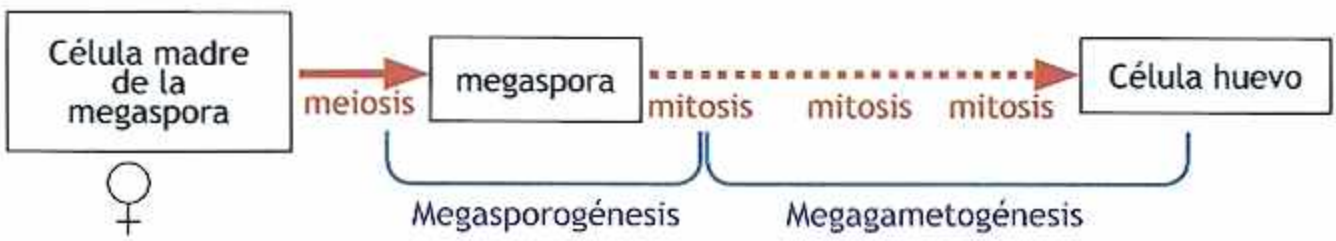


Figura 8.15: Megasporogénesis y megagametogénesis.
Imagen de Seguí Simarro.

La nucela del óvulo es el megasporangio. La megasporogénesis comienza con la diferenciación de una célula madre de las megasporas o megasporocito. Esta entra en meiosis y al igual que vimos para el caso de la célula madre de la microspora, da lugar a cuatro productos meióticos haploides (Figura 8.16). Sin embargo, a diferencia de la microsporogénesis, en la megasporogénesis tres de estos cuatro productos meióticos degeneran, mueren y desaparecen. Queda por tanto solo uno, que será finalmente la megaspora.

Durante la megagametogénesis, la única megaspora existente experimenta tres rondas de divisiones mitóticas (Figura 8.16), en cada una de las cuales se duplica el número de células, con lo que finalmente aparecerán 8 células, que son las que conformarán el saco embrionario como veremos a continuación. De estas ocho células, siete células tendrán funciones accesorias, y solo una de ellas será el gameto femenino.

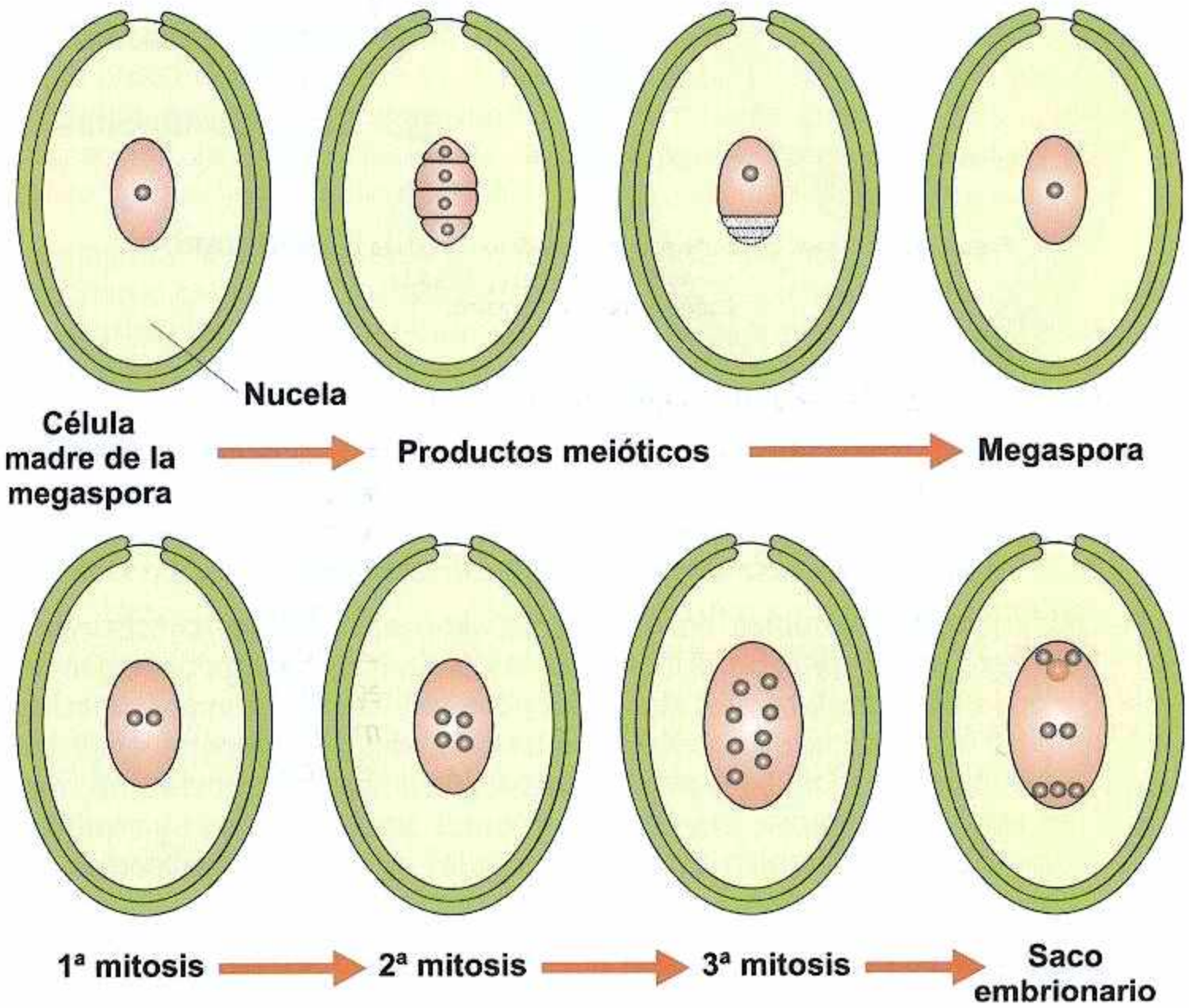


Figura 8.16: Megasporogénesis y megagametogénesis: las etapas por las que pasa un producto meiótico para convertirse en gametófito femenino.
Imágenes de Seguí Simarro.

8.7. El saco embrionario

Para formar el saco embrionario (Figura 8.17) o gametófito femenino, se forman 8 núcleos que se distribuyen en 7 células. Dos grupos de 3 células se ubican cada uno en un polo, rodeados de pared celular, y los dos núcleos restantes se ubican en el ecuador de la célula central:

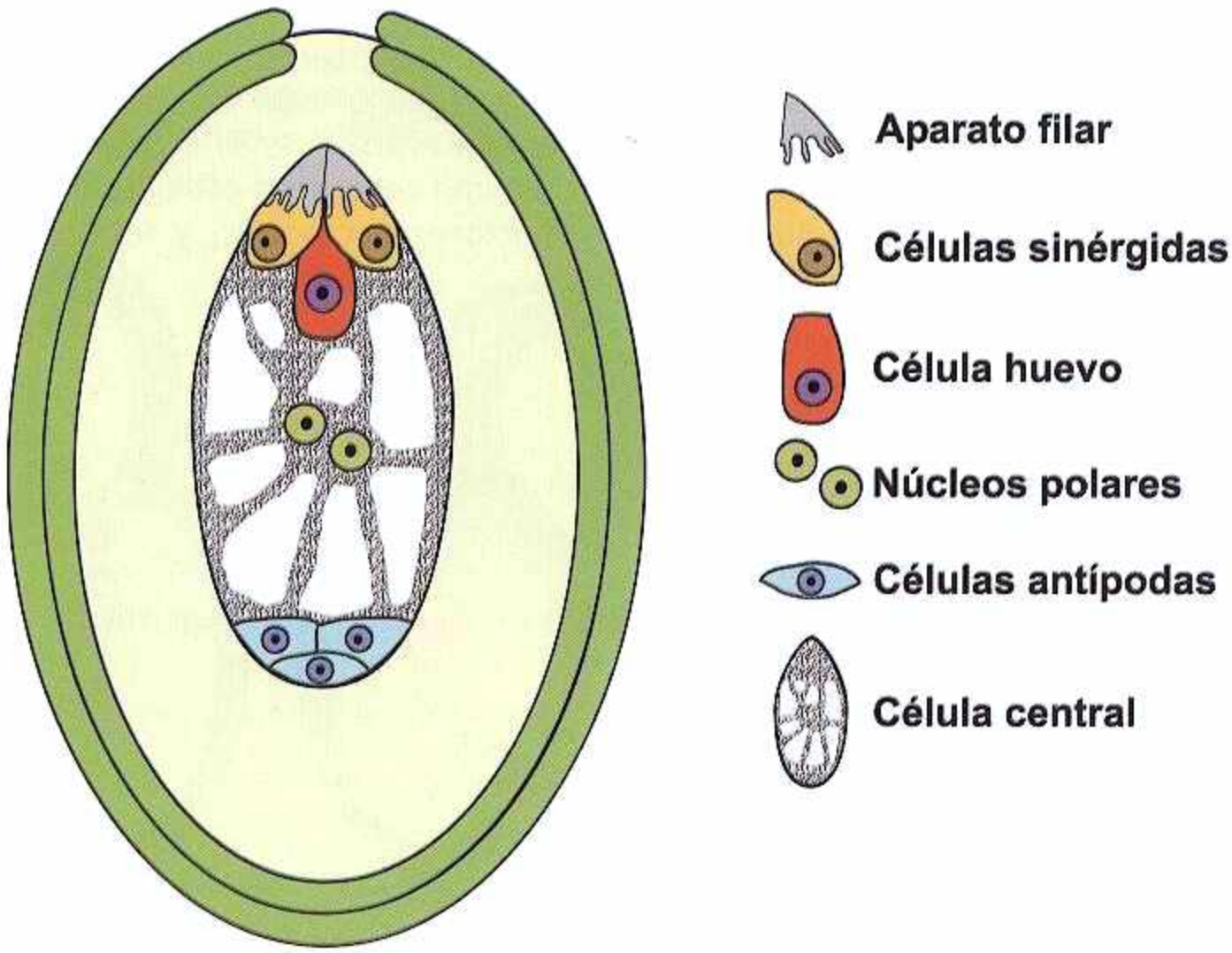


Figura 8.17: Estructura del saco embrionario.
Imagen de Seguí Simarro.

- El grupo que se ubica en el polo próximo al micrópilo constituye el *aparato ovular*, y está formado por la célula huevo (gameto femenino) y dos *sinérgidas* laterales. Las sinérgidas son las células más llamativas por su organización. Son células de transferencia, y presentan en el ápice el *aparato filar*. Se trata de una pared con protuberancias internas, de apariencia fibrosa, cuya función parece ser la de atraer y recibir al tubo polínico. También están involucradas a menudo en absorber nutrientes de la nucela y en hacerlos llegar a la célula huevo.
- El grupo que se ubica hacia el polo de la chalaza son las *antípodas*. Se cree que participan en la nutrición del saco embrionario. En los sacos embrionarios de gramíneas habitualmente se pueden observar antípodas en un elevado número, hasta 300 en cada saco de bambú (*Sasa senanensis*).

- Los dos núcleos restantes, denominados *núcleos polares*, se ubican en la zona media de la célula central. Frecuentemente se fusionan antes de la penetración del tubo polínico, constituyendo el *núcleo secundario*, que por tanto no será haploide como el resto, sino diploide (2n). Los núcleos polares o el secundario tienen una gran importancia en la doble fecundación de las angiospermas, pues estarán involucradas en la formación del endospermo, como veremos en el tema 11.

8.8. Megasporogénesis y megagametogénesis en gimnospermas

En gimnospermas, cada *escama ovulífera* (carpelo) porta dos óvulos sobre su cara superior. Cada óvulo está formado por una nucela rodeada de un tegumento, de forma similar al óvulo de las angiospermas, y con el micrópilo orientado hacia el eje de la inflorescencia. En gimnospermas, la nucela también es el megasporangio. En cada megasporangio se diferencia una sola célula madre de la megáspora, el megasporocito. De forma semejante a la vista en angiospermas, éste se divide por meiosis, formando una tétrada lineal de megasporas. De ellas, las tres orientadas hacia el micrópilo abortan, mientras que la que queda en la posición más interna es la funcional, la que dará lugar al gametófito. Sin embargo, hay una diferencia fundamental con angiospermas, y es que en gimnospermas, la diferenciación de la célula madre de la megaspora y todos los procesos que vendrán detrás tienen lugar después de la polinización.

La megaspora funcional se divide mediante **mitosis** muchas veces, pero sin formar pared celular (solo divisiones nucleares), de modo que se forma un *cenocito* multinucleado, con unos alrededor de 2000 núcleos en *Pinus*. De este modo pasa la megaspora el invierno, y reanuda su crecimiento a la primavera siguiente. Entonces, el siguiente paso será la tabicación del cenocito, formando una estructura compacta denominada *endospermo primario* o *prótalo*. No conviene confundir el endospermo primario de las gimnospermas con el endospermo que veremos en las angiospermas (Tema 10), pues a pesar de su denominación semejante, difieren notablemente tanto en origen como en función.

Una vez finaliza el proceso de tabicación del prótalo, se forman dos o tres arquegonios en la zona cercana al extremo micropilar. Cada arquegonio está constituido por una célula huevo u ovocélula, el gameto femenino. En gimnospermas, el gameto femenino es muy voluminoso, más que el de las angiospermas. En definitiva, el gametófito femenino maduro de las gimnospermas estará conformado por el prótalo, junto con los arquegonios, que son los que portan los gametos.

8.9. Resumen

En este tema se han visto las distintas partes que conforman el pistilo, el órgano reproductor femenino de la flor. Se ha visto también cómo las hojas carpelares de la flor pueden fusionarse para formar pistilos compuestos, o bien formar cada una de ellas pistilos independientes. Dentro de cada pistilo, podemos

distinguir el estigma, donde se depositará el polen para la polinización, el estilo, por donde se extenderá el tubo polínico en su tránsito hacia la célula huevo, el ovario, donde se albergan los óvulos, y el óvulo, dentro del cual se desarrolla el gametófito femenino o saco embrionario.

Dentro del saco embrionario se da la megasporogénesis que origina una megaspora, y la megagametogénesis, que tiene como consecuencia la formación de ocho núcleos haploides en siete células. Una de estas células es la célula huevo, el gameto femenino. A él se unirá una espermátida para formar el zigoto que posteriormente dará lugar al embrión. El resto de células del gametófito tendrán una función accesoria, de apoyo en las distintas etapas de la fecundación y la embriogénesis posterior. Por sus notables diferencias con las angiospermas, hemos abordado por separado la formación del gameto femenino en las gimnospermas, en las que este se forma tras la polinización, y no antes como en angiospermas.

8.10. Información adicional

- Raven, P.H., Johnson, G.B. (1996). Biology. 4th edition. W.C. Brown Publishers.
- Reproduccion sexual - Hipertextos del Área de la Biología (recurso online). http://www.biologia.edu.ar/reproduccion/sexual.htm
- Skinner D.J., Hill T.A., Gasser C.S. 2004. Regulation of Ovule Development. The Plant Cell, 16: S32-45.
- Strassburger, E. 1994. Tratado de Botánica. 8ª edición. Omega, Barcelona, 1088 p.
- Yadegari R., Drews G.N. 2004. Female Gametophyte Development. The Plant Cell, 16: S133-141.

TEMA 9. Tipos de polinización

La polinización es el transporte de los granos de polen desde los sacos polínicos de las anteras hasta el estigma en las angiospermas, o hasta el micrópilo de los óvulos en las gimnospermas. De todos los procesos de los que consta la reproducción sexual, el transporte del polen es el único que transcurre fuera de los órganos sexuales, y en muchos casos fuera de las flores. En estos casos, es obvio que el transporte va a estar muy influido por el entorno en el que estén situadas las flores donantes y receptoras del polen. Pese a ello, se trata de un proceso crucial dentro del ciclo reproductivo de las plantas, hasta el punto que marca el tipo de sistema reproductivo. En este tema veremos distintos aspectos de la polinización que determinan el tipo de sistema reproductivo, pero fundamentalmente, veremos los tipos de polinización que existen en función de cual y cómo sea la flor donante y la flor receptora, y los mecanismos de distinta naturaleza que las plantas han desarrollado para asegurarse un tipo de polinización u otro.

Podemos distinguir diferentes tipos de polinización basándonos en dos criterios: el individuo y las consecuencias genéticas. Desde el punto de vista del individuo (Figura 9.1), podemos hablar de:

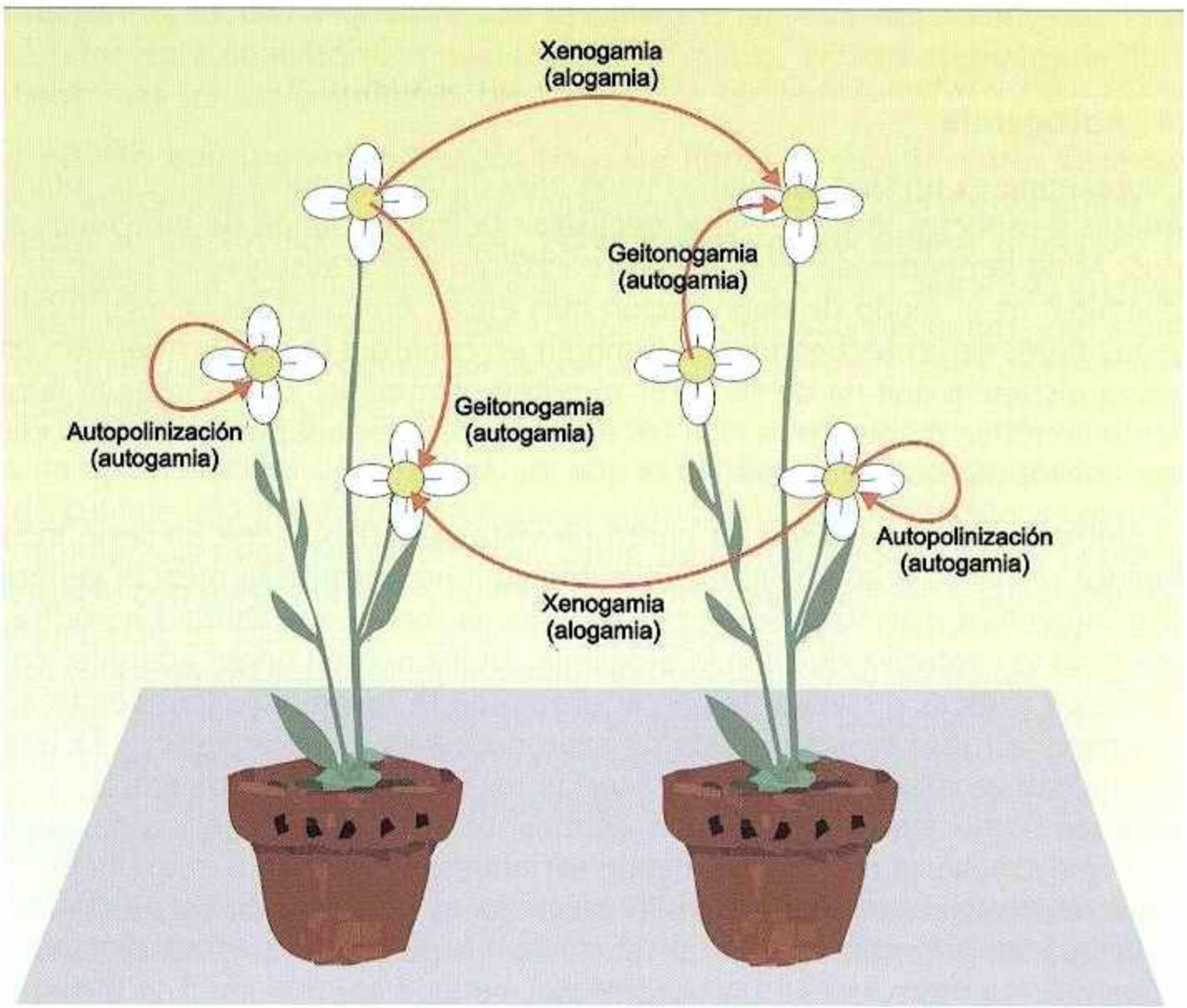


Figura 9.1: Tipos de polinización.
Imagen de Seguí Simarro.

- *Polinización directa o autopolinización:* cuando el transporte del polen ocurre desde los estambres hasta el estigma de una misma flor. Es decir, el polen no sale de su flor.
- *Geitonogamia*: cuando el transporte del polen ocurre dentro de un mismo individuo, desde los estambres de una flor hasta el estigma de otra flor, pero ambas de un mismo individuo.
- *Polinización cruzada* o *xenogamia*: cuando el transporte del polen ocurre desde los estambres de una flor hasta el estigma de otra flor de otro individuo diferente.

Sin embargo, desde el punto de vista genético, da igual que el polen se transporte dentro de una misma flor (polinización directa) o entre flores de un mismo individuo (geitonogamia). Las consecuencias genéticas son las mismas, pues en ambos casos los genotipos de los gametos masculinos y femeninos serán los mismos, sean de la misma flor o de distinta flor de un mismo individuo. Por tanto, a efectos genéticos, se consideran únicamente estos dos tipos:

- *Autogamia*: polinización dentro de un mismo individuo, sea mediante polinización directa o mediante geitonogamia.
- *Alogamia*: polinización entre flores de distintos individuos (xenogamia).

9.1. Autogamia

La autogamia es un tipo de polinización muy difundida entre malezas, plantas pioneras y especies insulares, que necesitan la fructificación de individuos aislados. Al no depender de ningún agente externo que transporte el polen entre individuos, es el modo de polinización más eficaz en cuanto a la seguridad de que las flores serán fecundadas, y también en cuanto a la rapidez del proceso, pues la distancia que ha de recorrer el polen es mínima. Es decir, es la herramienta genética mediante la cual los individuos mejor adaptados pueden colonizar nuevos nichos ecológicos antes que los demás.

En cambio, y también desde un punto de vista genético, tiene un serio inconveniente respecto a la alogamia. La autogamia no permite la mezcla genética entre individuos distintos. Se genera así mucha menos variablidad hereditaria y plasticidad evolutiva que con la alogamia. Únicamente podrán aparecer combinaciones génicas distintas debido al efecto de la recombinación meiótica. Si la autogamia fuese el único modo de reproducción de una especie, a la larga, tras muchas generaciones, desaparecerían los individuos heterocigotos, y solo quedarían homocigotos (recesivos y dominantes). La base genética de esa especie se estrecharía mucho, quedando seriamente expuesta a la extinción tan pronto se produjera un cambio en las condiciones del entorno. Esta es la razón por la que en su entorno natural nunca hay especies total y absolutamente autógamas. Siempre tienen un porcentaje, aunque sea mínimo, de alogamia, para permitir el flujo génico y evitar estrechamientos peligrosos de su fondo genético como especie.

Las flores de las plantas autógamas suelen ser generalmente muy poco llamativas. Al no tener necesidad de atraer a ningún polinizador, no gastan energía en generar atractivos. Así pues, las flores de autógamas se caracterizan en general por ser inconspicuas, presentar piezas florales reducidas, sin fragancia y sin néctar, y en las que en sus anteras hay menor cantidad de polen que en el caso de las alógamas.

9.1.1. Cleistogamia y casmogamia

En una flor autógama, la polinización puede producirse antes o después de la antesis. Si se produce después de la antesis, en flores ya abiertas, estaremos ante un modo de polinización denominado *casmogamia*. Típicos ejemplos de flores casmógamas pueden ser las hortícolas (solanáceas, cucurbitáceas...). La casmogamia no es exclusiva de flores autógamas, pues las alógamas necesitan obligadamente abrirse para diseminar su polen.

Si la polinización se produce antes de la antesis, dentro del capullo o botón floral, estaremos ante un modo de polinización denominado *cleistogamia*. En este caso, la autogamia es obligada, al no llegar a abrirse las flores. Estas flores presentarán reducción en el número y tamaño de los estambres, y modificaciones del periantio. La cleistogamia es un fenómeno común en las plantas cultivadas pero raramente obligatorio en una especie silvestre. Típicos ejemplos de flores cleistógamas son las gramíneas (cereales).

Hay plantas que presentan los dos tipos de flores: producen flores casmógamas, y al comienzo o al final de la floración presentan flores cleistógamas, de tamaño, forma y color diferentes. Por ejemplo, el cacahuete (*Arachis*), las leguminosas o la violeta (*Viola odorata*). En *Viola odorata* (Figura 9.2) las flores cleistógamas tienen pétalos rudimentarios y anteras más pequeñas, con menos polen, mientras que las casmógamas son las típicas flores vistosas de coloración violácea que dan nombre al género.

Hay un tipo particular de cleistogamia que se denomina *cleistogamia ecológica*. Se da cuando una planta produce flores cleistógamas en respuesta a condiciones ambientales desfavorables (frio, calor, humedad, sequía, etc.), pudiendo alternarse con flores normales cuando las condiciones vuelven a la normalidad. Por ejemplo, el sorgo produce flores casmógamas en la base y centro de la panícula y cleistógamas en su extremo bajo condiciones de estrés. El arroz, variedad 'Japonica', sufre un retraso en la apertura de la espiguilla o un cierre completo en condiciones de alta humedad. Otra violácea (*Viola tricolor*) produce flores cleistógamas bajo condiciones de fotoperíodo corto y casmógamas bajo fotoperíodos largos.

Otro tipo de cleistogamia es la *cleistogamia constitucional*, donde el control es principalmente genético o el resultado de interacciones entre el genotipo y el entorno. Es el caso de algunos cultivos como el sorgo, arroz, cebada, *Poa chapmaniana* o algunas especies de *Plantago*.

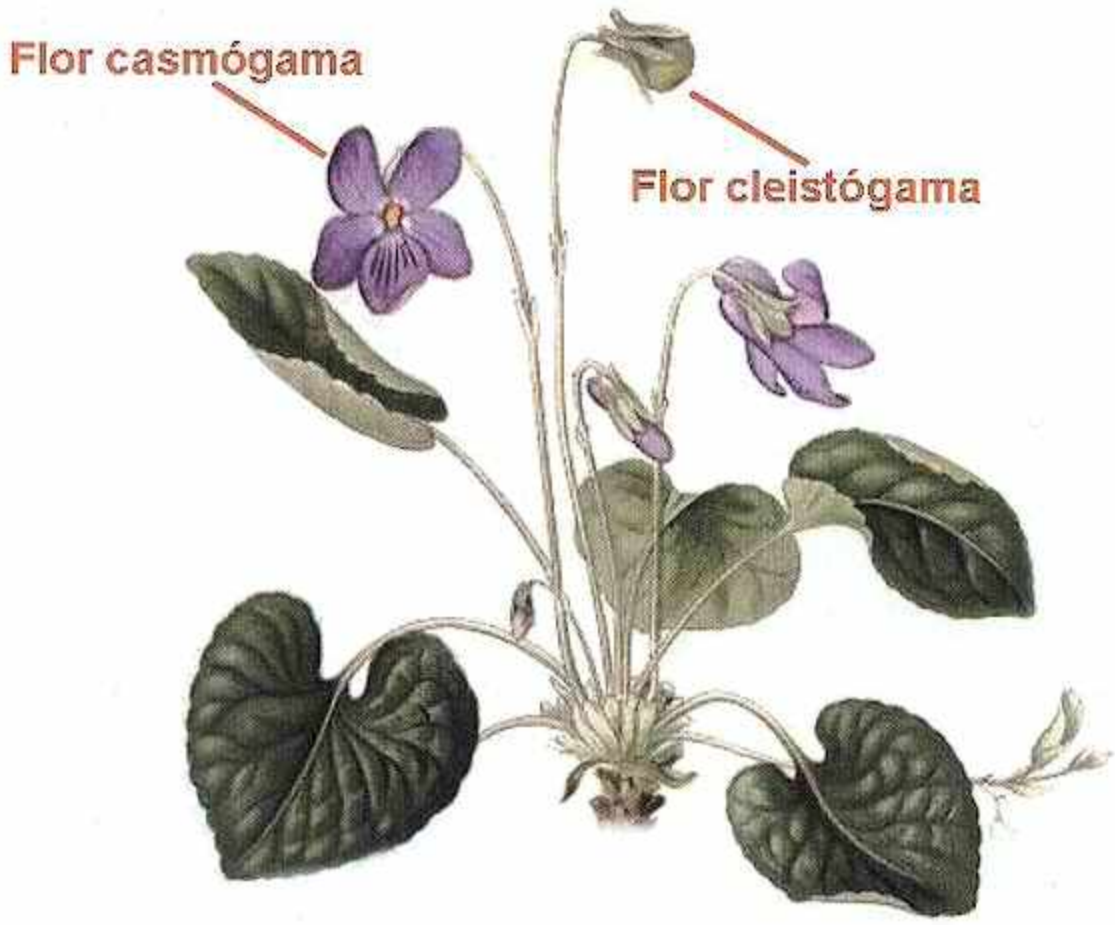


Figura 9.2: Flores casmógamas y cleistógamas en un mismo individuo de *Viola odorata*.
Adaptación de Imagen de dominio público de C.A.M. Lindman,
en *Bilder ur Nordens Flora*, Stockholm 1917-1926.

9.2. Alogamia

La alogamia es la polinización cruzada entre flores de distintos individuos. Dicho de otro modo, sería la imposibilidad de un individuo de fecundar sus flores con su propio polen. En muchas especies es obligada pues las flores, aún siendo hemafroditas, son *autoincompatibles*. Esto es, presentan barreras genéticas y/o fisiológicas que impiden bien la germinación del propio polen, o bien el desarrollo de su tubo polínico.

Las ventajas desde un punto de vista reproductivo serán justo las que hemos visto como desventajas en la autogamia: producir nuevas combinaciones genéticas en la población, y asegurar la variabilidad de la especie y por tanto, la posibilidad de sobrevivir a los cambios de medio ambiente. Tendría también como desventaja lo que hemos visto que era ventajoso en la autogamia: es más lenta, y por tanto desfavorable a la hora de colonizar nuevos nichos ecológicos.

En cualquier caso, es un mecanismo que asegura un mayor éxito de la especie en términos evolutivos que la autogamia. Es por ello que es el modo de polinización más extendido en angiospermas. De hecho, para favorecer la alogamia las angiospermas han desarrollado numerosas estrategias. Todas ellas se basan en, de un modo u otro, conseguir un único objetivo: impedir la autofecundación. Por un lado, han evolucionado desarrollando adaptaciones florales (barreras físicas) que impiden la coincidencia de ambos sexos en el tiempo o en el espacio. Estas son la *dicogamia*, la *hercogamia*, la *presentación secundaria de polen* y la

diclinia. Por otro lado, tenemos mecanismos de tipo genético y fisiológico que evitan la autofecundación incluso en aquellas flores en las que androceo y gineceo están maduros y funcionales en la misma flor y al mismo tiempo. A estos mecanismos se les denomina *mecanismos de autoincompatibilidad*.

9.2.1. Dicogamia

Este mecanismo de favorecimiento de la alogamia consiste en que la dehiscencia de la antera y la receptividad del estigma suceden en momentos distintos del desarrollo de la flor. Se le conoce también como *separación temporal de sexos*. Al no coincidir en el tiempo, no puede darse la autofecundación. El desfase entre la dehiscencia de la antera y la receptividad del estigma puede variar entre un día y varias semanas.

Si el estigma se hace receptivo primero y luego la antera dehisce, estaríamos ante una caso particular de dicogamia denominado *protoginia*. Aquí, la flor funcionará primero como flor femenina y luego como flor masculina. Un ejemplo de protoginia se da en el magnolio *(Magnolia grandiflora;* Figura 9.3). Si la antera dehisce primero y luego el estigma se hace receptivo, estamos ante el caso opuesto, la *protandria*. En este caso, la flor funcionará primero como flor masculina y luego como flor femenina. Un ejemplo de protandria se da en *Agave* (Bromeliaceae).

Figura 9.3: Protoginia en *Magnolia grandiflora*.
Imágenes de contenido libre en www.morguefile.com.

9.2.2. Hercogamia

En especies hercógamas, las anteras y el estigma están, de un modo u otro, separadas espacialmente entre sí. Su posición relativa es tal que la autogamia no puede darse. Por ello se le denomina también *separación espacial de sexos*. Se trata de un mecanismo bastante común, que se observa en, por ejemplo,

muchas legumbres, en las que el estigma está rodeado de un penacho de tricomas que impiden que el polen de la misma flor alcance el estigma. En otros casos, el estigma se proyecta más allá del nivel de las anteras, por lo que el polen de esa flor nunca puede alcanzar el estigma. Otro ejemplo curioso es el de las especies del género *Ayenia* como *A. mansfeldiana, A. fruticosa o A. compacta,* en las que los pétalos modificados ejercen de barrera física entre estambres y estigma. Según la posición relativa de anteras y estigmas, se pueden dar varios tipos de hercogamia:

9.2.2.1. Hercogamia de aproximación

En la *hercogamia de aproximación,* los estigmas están exertos, esto es, por encima de las anteras (Figura 9.4). De este modo, es más fácil que los polinizadores, al ingresar en la flor, contacten primero con el estigma, depositando el polen que traigan de otras flores. Es el tipo de hercogamia más frecuente. Ejemplos: *Turnera* o *Jaborosa integrifolia.*

9.2.2.2. Hercogamia revertida

La *hercogamia revertida* sería lo opuesto a la de aproximación. Es decir, las anteras están por encima de los estigmas (Figura 9.5). En contra de lo que pudiera parecer a primera vista, pese a ser lo opuesto al mecanismo anterior, la hercogamia revertida también favorece la alogamia. Solo que en otro tipo de flores. De hecho, es un mecanismo típico de flores alargadas, tubulosas, como las del género *Nicotiana.* Este tipo de flores suelen ser polinizadas por lepidópteros (mariposas tanto nocturnas como diurnas). Presentan una corola en forma de vaso largo y estrecho, en el que el néctar se sitúa en su fondo, donde también está el estigma. Así, si la mariposa quiere libar el néctar, ha de introducir su espiritrompa hasta el fondo, con lo que es más fácil que contacte con el estilo antes que con las anteras, que quedan situadas mucho más arriba.

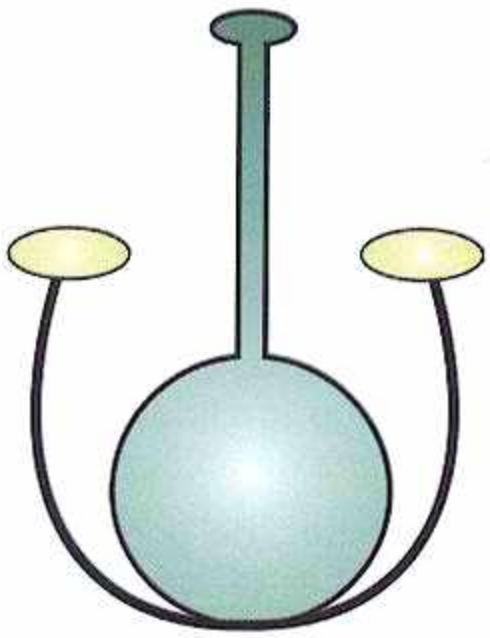


Figura 9.4: Hercogamia de aproximación.
Imagen de Seguí Simarro.

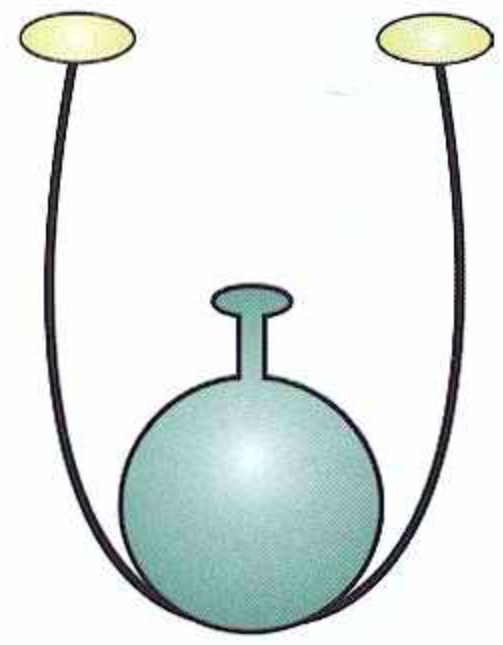


Figura 9.5: Hercogamia revertida.
Imagen de Seguí Simarro.

9.2.2.3. *Heterostilia*

La heterostilia o *hercogamia recíproca* es un polimorfismo floral en el cual las poblaciones están compuestas por individuos todos con flores hermafroditas, pero *heteromórficas*. Esto es, flores con más de una morfología floral distinta. Por este motivo a la heterostilia tambien se le conoce como *autoincompatibilidad heteromórfica*. Estas morfologías florales se caracterizan por la distinta disposición relativa y longitud recíproca de anteras y estigmas, de modo que los estigmas de una longitud se encuentran situados recíprocamente a las anteras de longitud equivalente en el morfo opuesto. Hay dos tipos distintos de heterostilia:

- *Dimórfica* (*distilia*): En la distilia, existen dos tipos (morfos) florales distintos, pero solamente se da uno en cada individuo (Figura 9.6). Así, un tipo de individuos presenta flores con lo que se denomina un *morfo corto* (S), consistente en estambres largos y pistilos (estilo fundamentalmente) cortos (flores *thrum* o *brevistilas*), y el otro tipo de individuos presenta un *morfo largo* (L), esto es, estambres cortos y pistilos largos (flores *pin* o *longistilas*). Así, la polinización sólo es efectiva entre plantas que presentan flores distintas. La distilia, como muchos otros mecanismos de favorecimiento de la alogamia, es un carácter bajo control genético. Está controlada por un solo complejo génico, denominado S, con dos alelos, el S para estilo corto, y el s para estilo largo. De este modo, una flor L (*pin*), con estilos largos, correspondería a un individuo homozigoto recesivo (ss), mientras que una flor S (*thrum*), con estilos cortos, correspondería a un individuo homozigoto dominante (SS) o heterozigoto (Ss). Según esto, el polen portador del alelo s en heterozigosis (Ss), sería compatible con estilos largos (ss) pero incompatible con estilos cortos (Ss). O sea, sería imposible que pudiera autofecundar su propia flor. Esto sería algo semejante al control genético que opera en la *incompatibilidad esporofítica*, que veremos en el apartado 9.2.5.3.

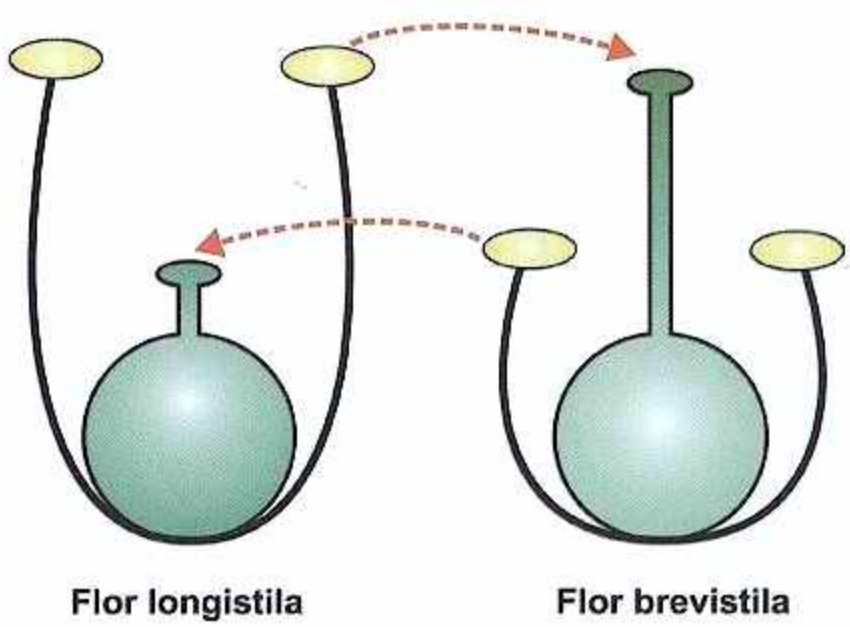


Figura 9.6: Distilia.
Imagen de Seguí Simarro.

Aunque los rasgos morfológicos fundamentales de la distilia son la distinta longitud de estilos y estambres, algunas especies dístilas presentan también diferencias en tamaño y ornamentación del polen, y en la forma de las papilas del estigma. La distilia es característica del género *Prímula* y de rubiáceas, plumbagináceas, lináceas y borragináceas.

- *Trimórfica* (*tristilia*): Existen tres morfos florales distintos, y solo uno de ellos está presente en cada individuo (Figura 9.7). En cada morfo floral solamente habrá una longitud estilar de entre las tres posibles: corta (flores brevistilas), media (flores mediostilas) y larga (flores longistilas). En cuanto a los estambres, cada flor tendrá filamentos con longitudes equivalentes a los estilos de los otros dos morfos florales, pero nunca al de su propio estilo. Y como en el caso anterior, la polinización sólo será efectiva entre plantas que presenten flores distintas. Por tanto, para que haya compatibilidad polen-estigma, el polen que llegue al estigma de una flor tendrá que provenir de anteras de otra flor en la que, además, las anteras donantes sean de igual longitud que el estilo de la flor receptora. El control genético de la tristilia viene dado por dos genes, el S y el M, con dos alelos cada uno, y siendo el gen S epistático sobre M. Así, las combinaciones alélicas necesarias para la aparición de fenotipos longistilos será ssmm, para fenotipos mediostilos serán ssMM o ssMm, y para fenotipos brevistilos serán Ssmm, SsMm o SsMM. Este mecanismo es también, como en el caso de la distilia, semejante al control genético que opera en la incompatibilidad esporofítica. Ejemplos de familias con tristilia serían: Lythraceae, Oxalidaceae, Pontederiaceae, Amarillidaceae y Connaraceae.

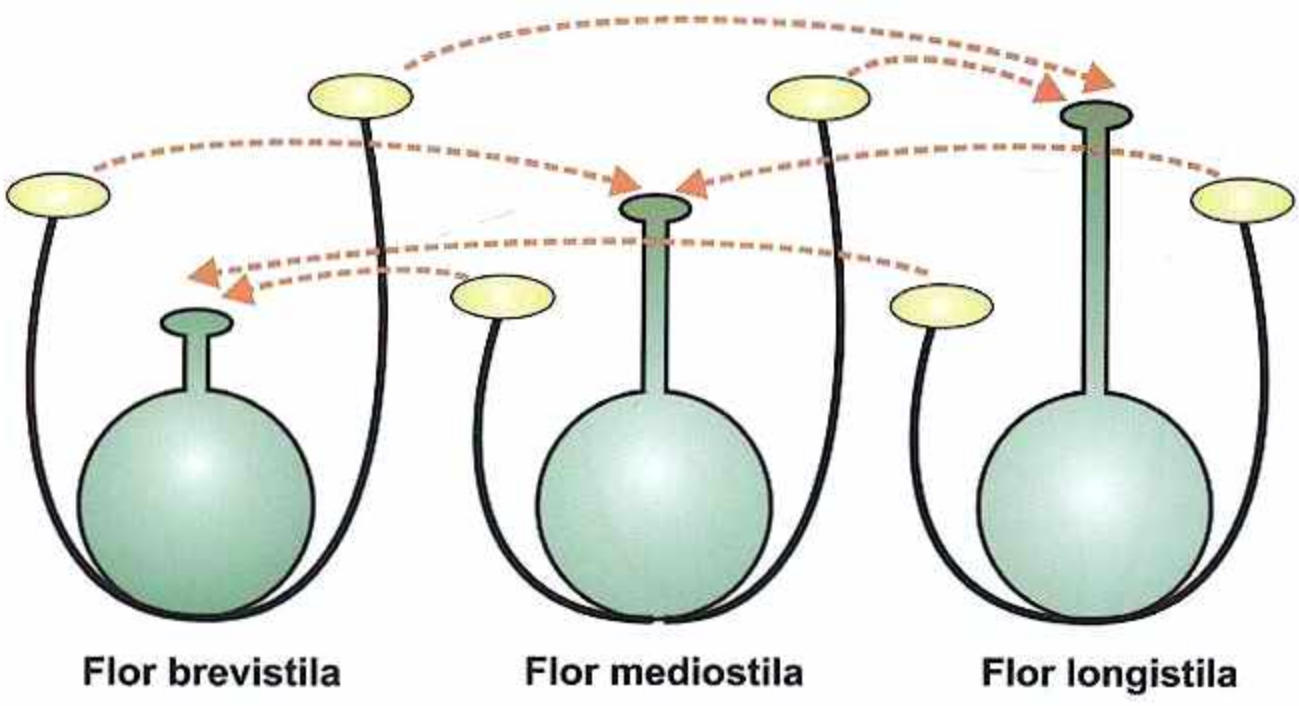


Figura 9.7: Tristilia.
Imagen de Seguí Simarro.

9.2.2.4. *Hercogamia interfloral o monoecia*

Como vimos en el Tema 3, las especies monoicas son aquellas en las que solo hay un único tipo de individuos, que en el caso de presentar también diclinia, producen flores unisexuales, o femeninas o masculinas. Es decir, tanto las flores masculinas como las femeninas están presentes en el mismo pie (Figura 3.13). El ejemplo más típico de la monoecia es el maíz (*Zea mays*, Figura 3.14), aunque también hay especies monoicas en los géneros *Humbertochloa*, *Luziola*, *Ekmanochloa*, *Sagittaria* y *Mniochloa*. El hecho de que aunque en el mismo individuo, los sexos masculino y femenino estén espacialmente separados, contribuye a evitar la autopolinización. La hercogamia interfloral puede también ir asociada o no a la autoincompatibilidad.

9.2.2.5. *Dioecia*

La dioecia sería un paso más en la separación de los sexos. Como vimos en el Tema 3, en las especies dioicas los órganos sexuales femeninos y masculinos están separados en distintos individuos. Esta separación implica una separación y una diferenciación no solo sexual, sino también genética, pues cada sexo puede ir adquiriendo por separado caracteres diferenciales más allá de los de la determinación sexual. Se trata de un mecanismo más efectivo que la monoecia para impedir la autofecundación, aunque no previene el apareamiento entre hermanos o entre formas menos emparentadas. La dioecia es poco frecuente en plantas superiores, aunque podemos encontrar ejemplos en especies como la palmera, datilera, lúpulo, espinaca, papaya o espárrago.

9.2.2.6. *Enantiostilia*

En la *enantiostilia*, las flores pueden ser hermafroditas, pero heteromórficas (Figura 9.8). Un tipo floral presenta el pistilo desviado hacia la izquierda y el otro lo tiene desviado hacia la derecha, de manera que cada tipo de flor es la imagen especular del otro tipo. Se presenta en flores sin néctar, con dimorfismo también en las anteras: la flor presenta por un lado varias *anteras proveedoras*,

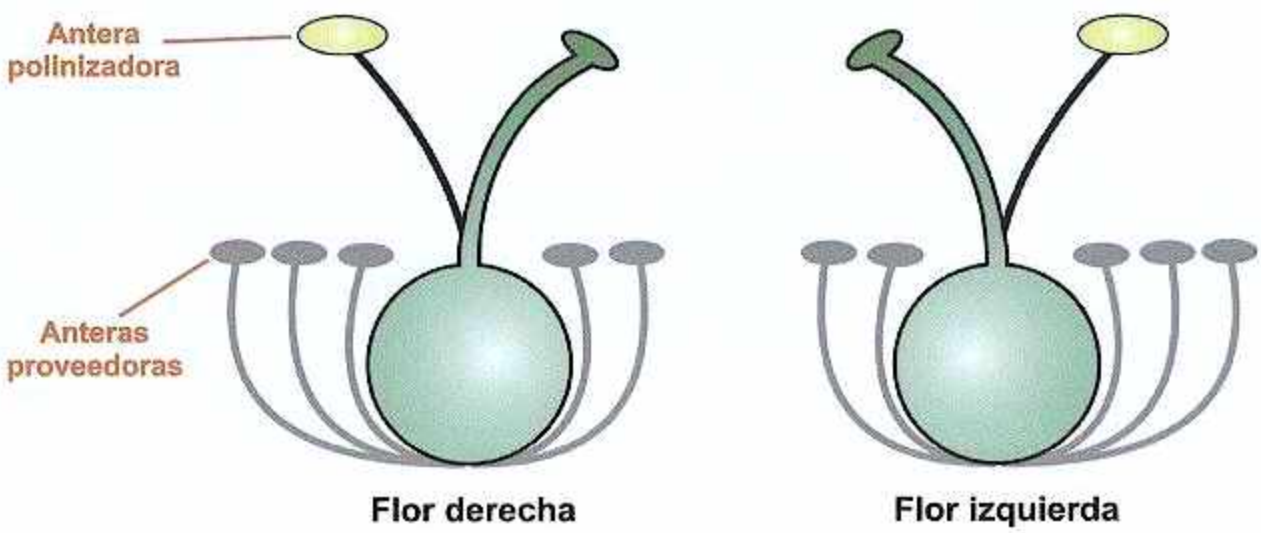


Figura 9.8: Enantiostilia.
Imagen de Seguí Simarro.

que proveen polen a los insectos, y anteras polinizadoras, orientadas hacia el lado opuesto al del estilo. Esta asimetría promueve la polinización cruzada en plantas melitófilas (visitadas por abejas). Por ejemplo, en *Cassia chamaecrista* o *Copaifera langsdorffii* (Figura 9.9).

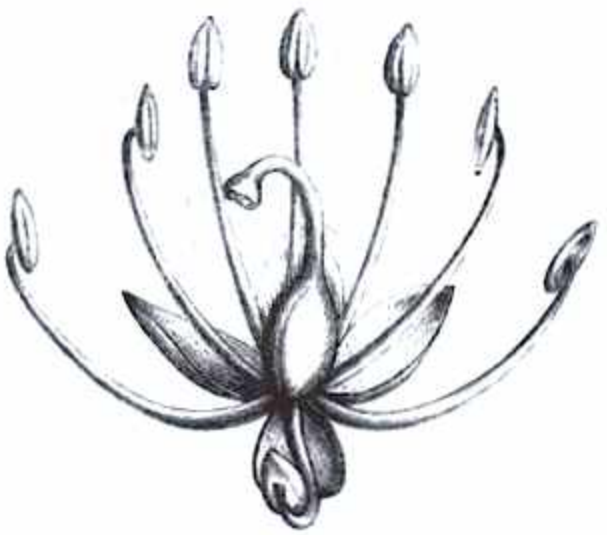


Figura 9.9: *Copaifera langsdorffii*.
Imagen de dominio público, de P. H. W. Taubert. *Leguminosae*, en *Natürliche Pflanzenfamilien*, Vol. III.

9.2.2.7. Dimorfismo estigmático altitudinal

En el *dimorfismo estigmático altitudinal*, las plantas presentan dos tipos florales con estigmas de distinta altura. En la forma L (longistila), los estigmas sobresalen por encima de los estambres, mientrs que en la forma S (brevistila) los estigmas quedan por debajo de los estambres. La diferencia de esta disposición con la heterostilia, en la que también hay formas L y S, es que la longitud de los estambres es similar en los dos casos. Es decir, no hay reciprocidad entre la longitud de los estambres de un tipo floral y la de los pistilos del otro tipo floral. Se da, por ejemplo, en especies de *Narcissus* como *N. assoanus* o *N. dubius* (Figura 9.10).

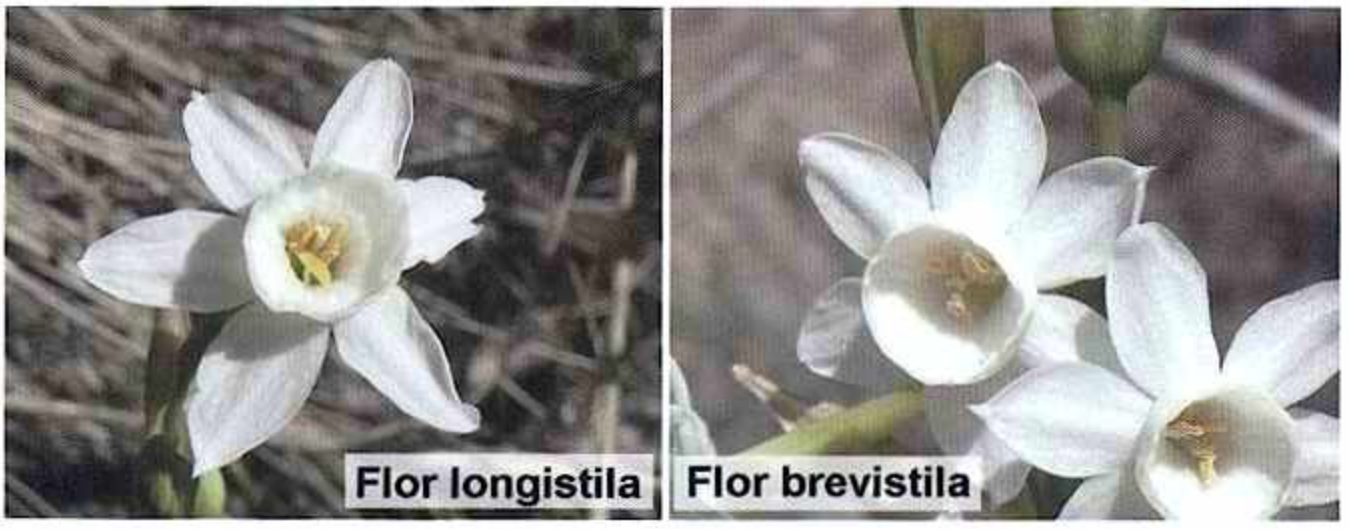


Figura 9.10: Dimorfismo estigmático altitudinal en *Narcissus dubius*.
La flor izquierda es longistila (el estigma está por encima de los estambres), y la derecha brevistila (estigma por debajo de los estambres).
Imágenes de Narcisse Douteux, de dominio público, en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

9.2.3. Presentación secundaria del polen

La *presentación secundaria del polen* consiste en la recolocación y presentación del polen en otras estructuras florales específicas diferentes de las anteras, en lugar de presentarse el polen directamente en ellas. Estas estructuras se conocen como *presentador del polen*. El presentador es una estructura normalmente derivada del tejido del estilo, y está frecuentemente localizada en una zona próxima a la región estigmática. El polen se deposita y acumula en el presentador. El estilo, que es reflejo, bascula cuando un insecto se posa, con lo que recoge el polen del presentador con una especie de cepillo que lleva unido, y recupera su posición cerca del estigma al irse el insecto. Así, el cepillo queda cargado, y cuando llegue un nuevo insecto y se pose en la flor, el polen será transferido al insecto, que al irse lo diseminará, favoreciendo así la alogamia.

La presentación secundaria de polen ha sido propuesta como un mecanismo preciso de transferencia de polen debido a que aproxima los lugares de presentación y recepción de los gametos masculinos. Sin embargo, no existen estudios experimentales que lo comprueben sin lugar a dudas. De hecho, algún estudio aboga por la baja eficiencia de este método. Por ejemplo, en *Polygala vayredae* existe un mecanismo de presentación secundaria de polen consistente en una estructura en forma de cesto cerca de la región estigmática fértil. Se observó que la recolocación del polen en esta estructura conduce a pérdidas significativas de polen, alrededor de un 49% del polen total producido por la flor. No obstante, este mecanismo es virtualmente universal en las Compositae, y muy común en las Papilionoideae y Leguminosae. Un ejemplo típico en las leguminosas es el guisante (*Pisum sativum*, Figura 9.11).

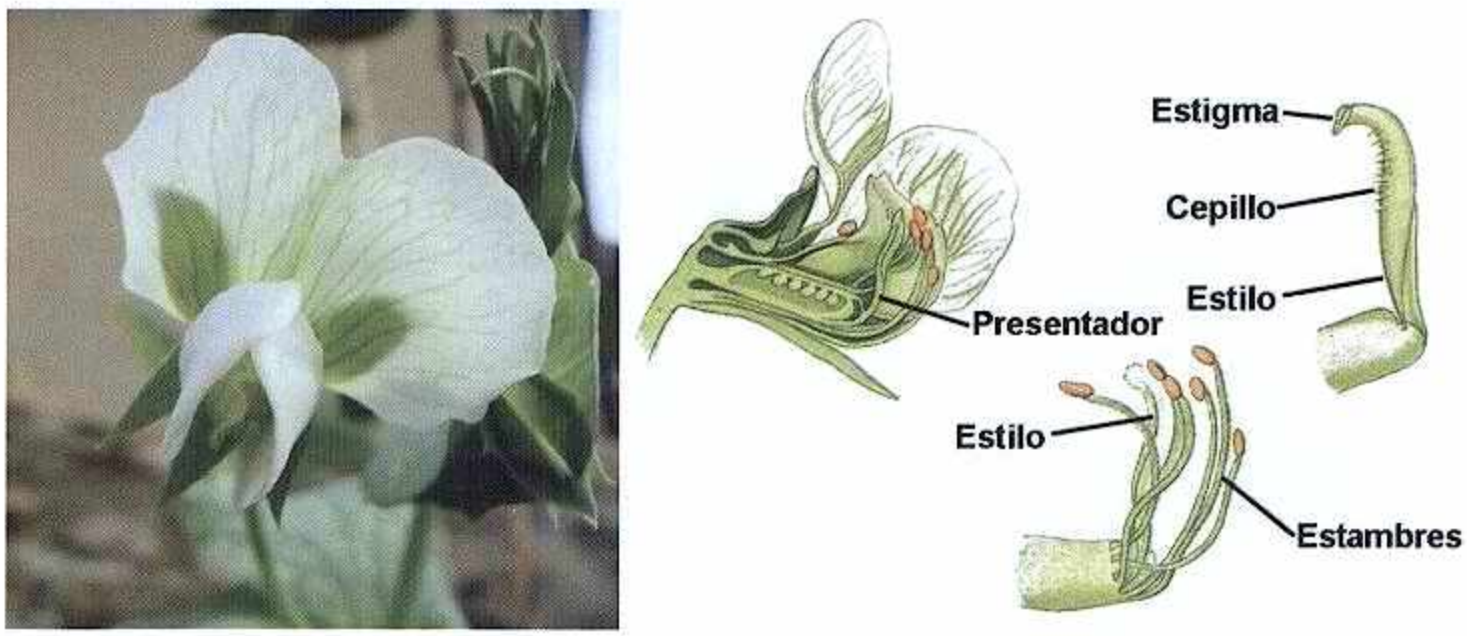


Figura 9.11: Presentación secundaria del polen en guisante (*Pisum sativum*).
La fotografía de la izquierda es de Net_efekt, en flickr.com, bajo licencia Creative commons Attribution 2.0 generic. El resto de ilustraciones son de dominio público, de O. W. Thomé, *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, 1885, Gera, Germany.

9.2.4. Diclinia

En las especies diclinas, las flores son unisexuales. Por tanto, los sexos están espacialmente separados en flores distintas, con lo que se dificulta la autopolinización. El caso más efectivo de favorecimiento de la alogamia sería la combinación de diclinia y dioecia, con los que unos individuos serían totalmente masculinos y otros totalmente femeninos, y no tendrían otra opción que cruzarse entre ellos. Ejemplo de especie diclina sería la papaya, como vimos en el tema 3, o las cucurbitáceas o el cannabis.

9.2.5. Autoincompatibilidad

Hasta ahora hemos visto mecanismos para impedir físicamente el contacto entre polen y estigma de una misma flor. En muchos de estos casos, los mecanismos están basados en la propia anatomía de la flor, o en la presencia de distintos tipos florales (flores heteromórficas). Sin embargo, la mayoría de las angiospermas presentan flores hermafroditas, y un solo tipo floral (flores homomórficas). Estas flores frecuentemente presentan estambres y pistilo de longitud semejante (denominadas flores *homostilas*). En estos casos tan frecuentes existen otro tipo de mecanismos para evitar la autofecundación que se conocen con el nombre genérico de *autoincompatibilidad homomórfica*. La autoincompatibilidad es la incapacidad de una planta hermafrodita con gametos funcionales para autofecundarse tras haberse autopolinizado. La autoincompatibilidad es un importante mecanismo para favorecer la polinización cruzada (alogamia) y asegurarse así la producción de nuevas combinaciones genéticas en la población, la variabilidad de la especie y en consecuencia, la posibilidad de sobrevivir a los cambios de medio ambiente.

La autoincompatibilidad es el mecanismo más frecuente de favorecimiento de la alogamia. Se estima que estos mecanismos son los que gobiernan la autoincompatibilidad en cerca del 50% de las plantas con flores conocidas, entre las que se incluyen la mayoría de familias y especies de interés agronómico, como crucíferas, compuestas, solanáceas, liliáceas o poáceas. Los modelos genéticos y moleculares para su estudio son *Nicotiana, Brassica, Petunia* y *Papaver*. En todas estas especies la alogamia es obligada pues, aunque presentan flores hemafroditas, éstas son autoincompatibles. Esta incompatilibilidad viene ocasionada por el desarrollo de una serie de mecanismos fisiológicos, genéticos y bioquímicos que impiden bien la germinación del propio polen, o bien el desarrollo del tubo polínico. En especies autoincompatibles, el polen propio es reconocido e inactivado directamente en el estigma, o bien durante el crecimiento del tubo polínico, antes de que alcance el óvulo. El polen ajeno, no se inactiva.

La autoincompatibilidad también puede ser una útil herramienta para los mejoradores, pues es un eficiente sistema de control de la polinización en la producción comercial de semillas híbridas.

9.2.1.1. Genética de la autoincompatibilidad.

La autoincompatibilidad está gobernada por un solo locus, el *locus* S, aunque en algunos casos pueden existir hasta tres loci involucrados. El locus S de autoincompatibilidad (locus S, o *self-incompatibility locus*) es multialélico (S1, S2, S3, S4,... Sn). Sus miembros constituyen una serie alélica y se comportan como tales: existe dominancia total o completa (jerarquía de dominancia del tipo S1 > S2 > S3 > S4 >S5 >Sn). En algunos casos puede existir dominancia intermedia o incompleta o incluso aparecer genotipos nuevos resultantes de la interacción entre los dos alelos del locus). Las plantas que han desarrollado mecanismos de incompatibilidad son siempre heterozigóticas para este locus. En estas plantas se inhibirá el desarrollo de todo grano de polen que lleve uno de los alelos de la serie alélica idéntico a alguno de los que lleve el estigma receptor.

En base al tipo de control genético que se ejerce sobre el desarrollo del polen, la autoincompatibilidad homomórfica se puede clasificar en *autoincompatibilidad gametofítica* y *autoincompatibilidad esporofítica*.

9.2.1.2. Autoincompatibilidad gametofítica

La autoincompatibilidad gametofítica (Figura 9.12) depende de la constitución genética del gametofito masculino. En este tipo de incompatibilidad, el polen puede germinar, pero el crecimiento del tubo polínico es detenido después de su penetración en el estilo. Es la forma de incompatibilidad más común de las dos, estando presente en casi la mitad de las familias de angiospermas (solanáceas, frutales, gramíneas, etc). La autoincompatibilidad gametofítica se rige por las siguientes reglas:

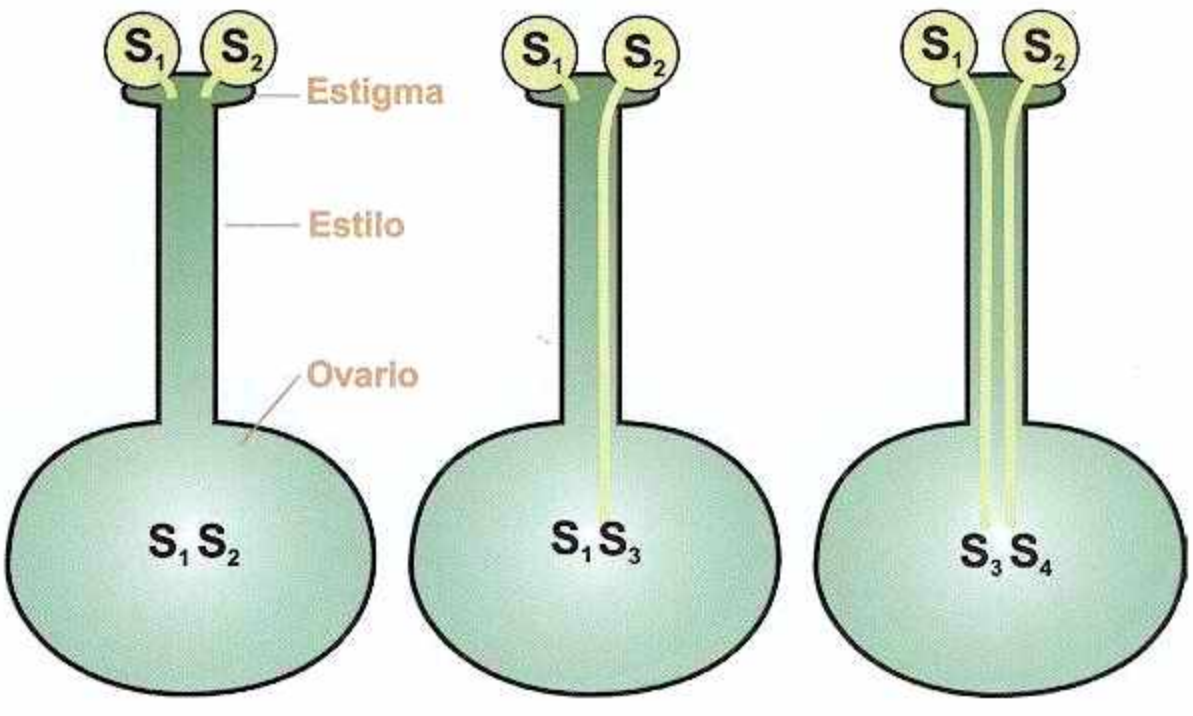


Figura 9.12: Autoincompatibilidad gametofítica.
Imagen de Seguí Simarro.

- El locus S es extremadamente polimórfico, razón por la cual es común encontrarse con numerosos alelos (alelos múltiples) en la población.
- La incompatibilidad del polen está controlada por el genotipo del alelo del locus S que lleve dicho grano de polen. Si ese alelo coincide con alguno de los del estigma receptor, el crecimiento del tubo polínico se inhibe. Si no coincide, el tubo puede crecer. Dicho de otro modo, la autoincompatibilidad gametofítica está controlada por el genotipo de la generación haploide, por el gametófito, independientemente de cual fuera la combinación de alelos del individuo diploide.

9.2.1.3. Autoincompatibilidad esporofítica

Por el contrario, la autoincompatibilidad esporofítica (Figura 9.13) está controlada por el genotipo diploide de la generación esporofítica, de manera que el comportamiento (fenotipo) en cuanto a la compatibilidad del grano de polen estará determinado por el genotipo de la planta que lo ha producido (la pareja de alelos que posea). Cada uno de estos alelos codificará una proteína distinta que se depositará en la cubierta del polen, de modo que esta llevará productos de ambos alelos S presentes en la planta origen. La compatibilidad dependerá en último término, por tanto, de la pared del grano de polen (esporodermis), cuyo origen es esporofítico. Recordemos que el tapetum interviene de modo crucial en su formación. De ahí que a este tipo de incompatibilidad se le denomine esporofítica. La autoincompatibilidad esporofítica se rige por las siguientes reglas:

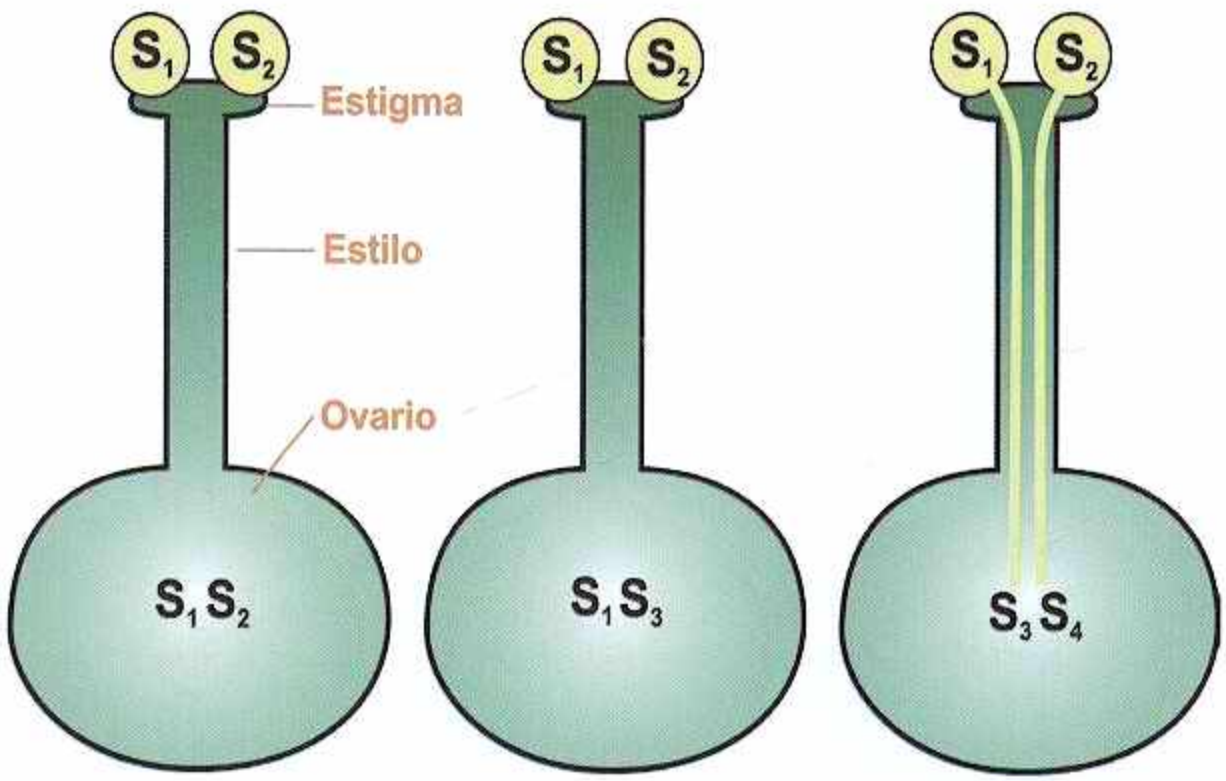


Figura 9.13: Autoincompatibilidad esporofítica. Alelos independientes.
Imagen de Seguí Simarro.

- Para que el grano de polen pueda germinar, debe adherirse al estigma, lo cual ocurrirá solamente cuando haya compatibilidad entre las proteínas de reconocimiento de la esporodermis y los receptores que existen en el estigma. Esta compatibilidad se dará cuando ninguna de dichas proteínas coincidan. Es decir, cuando los alelos de planta donante de polen y planta polinizada no coincidan. A la inversa, el polen no germinará sobre el estigma de una flor que contenga cualquiera de los dos alelos presentes en el esporofito (planta adulta) que produjo el polen.
- Esto es así aún teniendo en cuenta que cada grano de polen (haploide) contiene sólo uno de los dos alelos presentes en el esporofito (o planta adulta) que lo originó.

En resumen, podríamos sintetizar las diferencias más relevantes entre la autoincompatibilidad gametofítica y la esporofítica en el siguiente listado:

- En la incompatibilidad gametofítica, el polen que tenga cualquier alelo idéntico a los del estigma, germina pero su tubo polínico no crece. Si su alelo es distinto a los dos que presenta el estigma de la planta receptora, germina y crece su tubo polínico.
- En la incompatibilidad esporofítica, si los alelos se comportan de forma independiente, aunque el polen tenga un genotipo distinto al del estigma receptor, en su cubierta tendrá productos de los dos alelos del esporófito donde se formó. Si alguno de ellos coincide con alguno del estigma, se inhibe la germinación directamente en el estigma, sin desarrollo de tubo polínico.
- En la incompatibilidad esporofítica, si los alelos presentan dominancia (por ejemplo, S1 > S2), el fenotipo de la cubierta del polen será el del alelo dominante, independientemente de que el genotipo propio del polen sea el alelo dominante o el recesivo. En este caso, ambos tipos de polen germinarán y desarrollarán tubo polínico.

Además de estas diferencias en cuanto al control genético, hay otra serie de diferencias entre ambos tipos de mecanismos:

- El polen que manifiesta incompatibilidad gametofítica suele ser de tipo bicelular, mientras que el que manifiesta incompatibilidad esporofítica suele ser de tipo tricelular.
- En la incompatibilidad gametofítica la inhibición del polen suele ser en el estilo, inhibiéndose el crecimiento del tubo. En cambio, en la esporofítica la inhibición suele ser en la misma superficie del estigma, formándose tapones de calosa en los estigmas, con lo que el polen no llega a germinar.
- En la incompatibilidad gametofítica los estigmas pueden ser de tipo húmedo o seco, mientras que en la esporofítica suelen ser de tipo seco.

9.2.1.4. Pseudocompatibilidad e incompatibilidad parcial

En ocasiones, la autoincompatibilidad puede debilitarse porque los alelos sufran mutaciones que los hagan menos eficaces (*incompatibilidad parcial*), o por la acción de factores ambientales como la luz, humedad o temperatura. A este segundo caso se le denomina *pseudocompatibilidad*. En especies con fuertes sistemas de autoincompatibilidad, la pseudocompatibilidad es muy utilizada para programas de mejora. Por ejemplo, el trébol es compatible a 32°C pero incompatible a 23°C.

Sea por pseudocompatibilidad o por incompatibilidad parcial, el hecho es que de este modo se generan sistemas de reproducción alogámica que permiten un cierto grado de autofecundación. Hay quien cree que esto es un paso más dentro de una transición hacia la autogamia.

9.3. Resumen

La polinización es un paso clave en la reproducción sexual de las plantas. En este paso el polen es transportado desde las anteras al estigma de la flor receptora. El hecho de que estigma y polen pertenezcan o no al mismo individuo tiene importantísimas implicaciones en la genética de una población. Una planta que se polinice a si misma (autógama) no generará descendencia con tanta variabilidad genética como aquellas que polinicen a otros individuos (alogamia). Esto puede tener serias consecuencias en el largo plazo en cuanto a la supervivencia de la especie. Por ello, las plantas han desarrollado una serie estrategias de muy distinta naturaleza para asegurar la alogamia. En este tema hemos dado un repaso por los principales mecanismos que favorecen la alogamia y que impiden la autopolinización. Hemos visto también algún mecanismo (la cleistogamia) que en algunas especies favorece la autogamia. Conocer el tipo de polinización de una especie determinada es imprescindible a la hora de abordar técnicas de mejora vegetal que impliquen cruzamientos entre distintos individuos (hibridación).

9.4. Información adicional

- Cubero, J.I. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal, 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Edlund A.F., Swanson R., Preuss D. 2004. Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. The Plant Cell, 16: S84-97.
- Inouye D.W. 1980. The terminology of floral larceny. Ecology, 61:1251-1253.
- Kao T.-H., Tsukamoto T. 2004. The Molecular and Genetic Bases of S-RNase-Based Self-Incompatibility. The Plant Cell, 16: S72-83.
- Reproduccion sexual - Hipertextos del Área de la Biología (recurso online). http://www.biologia.edu.ar/reproduccion/sexual.htm

- Strassburger E. 1994. Tratado de Botánica. 8ª edición. Omega, Barcelona.
- Yeo P. 1993. Secondary pollen presentation. Springer, New York, USA.

TEMA 10. Vectores de polinización

La polinización es el transporte de los granos de polen desde los sacos polínicos de las anteras hasta el estigma en las angiospermas, o hasta el micrópilo de los óvulos en las gimnospermas. Resulta obvio que los granos de polen son inertes, y que por tanto su transporte se ha de realizar a través de agentes (*vectores de polinización*) externos a la planta. En los siguientes apartados veremos los múltiples y variados tipos de vectores generalmente utilizados por las plantas para asegurar dicho transporte, y qué condiciones ha de reunir un agente físico o biótico para que pueda ser considerado vector de polinización.

Para que un agente se considere vector de polinización han de darse una serie de condiciones en cuanto a su interacción con el polen y con las plantas donantes y receptoras de dicho polen:

- El polen ha de transferirse de la antera al vector.
- El polen ha de ser transportado por el vector.
- El polen ha de transferirse del vector al estigma.
- La fecundación ha de darse con el polen depositado por el vector.

No todos los vectores son igualmente eficientes. En determinadas circunstancias hay vectores más eficientes que otros. Para comparar entre ellos se utiliza el parámetro *eficiencia de polinización*, que mide la eficiencia de un vector. Esta eficiencia se puede expresar en distintos términos:

- número de granos de polen depositados en el estigma tras una visita
- número de granos de polen depositados respecto al número de granos recogidos
- porcentaje de frutos o semillas generados por visita del vector
- porcentaje de estigmas tocados por visita del vector

De todos ellos, parece que el último (el porcentaje de estigmas tocados por visita del vector) suele ser el más comúnmente utilizado para medir la eficiencia del vector.

Existen dos grandes tipos de vectores de polinización, los *vectores abióticos* y los *vectores bióticos*. Los abióticos son aquellos agentes físicos presentes en el entorno de la planta que de forma pasiva transportan los granos de polen. Podemos distinguir fundamentalmente dos, el viento y el agua. Los bióticos son aquellos seres vivos que de forma voluntaria o involuntaria intervienen en el transporte del polen de una planta a otra, como parte de su comportamiento habitual. Básicamente, estamos hablando de animales, y principalmente de insectos. Las plantas evolucionan junto con sus vectores de polinización. Esto hace que las plantas se vayan adaptando progresivamente a su vector, y en el caso de los vectores bióticos, también el vector a la planta. De este modo, la flor desarrolla una serie de características específicamente adaptadas al vector

que la va a polinizar. Al conjunto de estas características, que nos permiten inferir cual es su vector probable de polinización, se le denomina *síndrome de polinización*.

10.1. Vectores abióticos

10.1.1. Anemofilia

A la polinización por medio del viento se le conoce con el nombre de *anemofilia*. Se cree que fue el primer vector utilizado por las plantas, y es el vector de polinización utilizado por la mayoría de las gimnospermas. En angiospermas, es más frecuente en monocotiledóneas que en dicotiledóneas, que presentan otra serie de especializaciones. La anemofilia depende de las propias características del vector, el viento. No suele haber una dirección fija en la que sople el viento siempre en un mismo lugar, por lo que el transporte de polen de plantas anemófilas no está orientado. Que una determinada planta sea polinizada por el viento depende en gran medida del azar. Estas características del viento hacen que no sea el método de polinización más eficiente. De hecho, se calcula que un pie de maíz produce 50.000.000 granos de polen, cuando solo son necesarios unos 1.000 para fecundar los óvulos presentes en un pie.

Por tanto, las plantas anemófilas producen polen adaptado a estas características: producen polen en grandes cantidades, de pequeño tamaño, con una superficie lisa que facilita la dispersión, y seco, con poca presencia de cemento polínico, o de rápida desecación. Además, en gimnospermas como el pino (*Pinus*), el polen desarrolla unas especializaciones denominadas *sacos aeríferos* para aumentar la flotabilidad. Como vimos en el tema 7, el polen de *Pinus* desarrolla dos células laterales dentro de las que se forman dos grandes sacos rellenos de aire (Figura 7.14). De esta forma el polen aumenta considerablemente su superficie con un aumento de peso insignificante, lo cual redunda en una significativa mejora de la flotabilidad en el aire, frente a por ejemplo el típico polen esférico y macizo de las angiospermas.

En angiospermas, las plantas anemófilas suelen congregarse en grandes poblaciones y en lugares expuestos al viento como llanuras o los estratos superiores de los bosques. En estas plantas, la floración es temprana, las flores aparecen antes de que un exceso de follaje que puede obstaculizar la captación del polen. Las flores anemófilas de angiospermas carecen de medios de atracción como un perianto desarrollado, olor o néctar. No los necesitan. Suelen ser unisexuales, siendo las masculinas (encargadas de fabricar grandes cantidades de polen) más numerosas que las femeninas. Las masculinas además desarrollan estambres con filamentos largos y finos, de manera que la antera quede lo más expuesta posible a ser agitada por el viento. Las femeninas generalmente son uniovuladas, con estilos y estigmas agrandados para facilitar la captación de polen. Un ejemplo de flores de estas características lo podemos encontrar en *Poterium sanguisorba* (Figura 10.1).

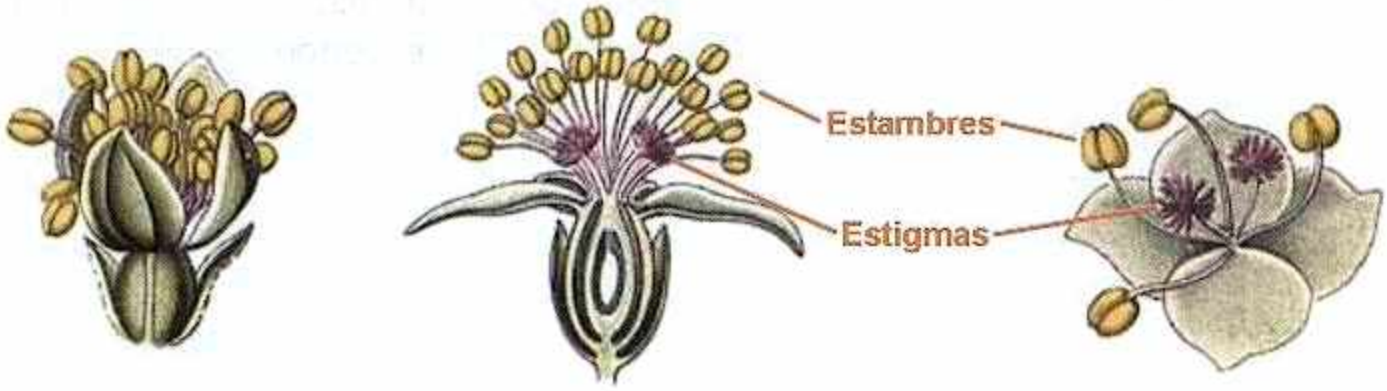


Figura 10.1: *Poterium sanguisorba*, flor anemófila.
Adaptado de imagen de A. Masclef, de dominio público, en Atlas des plantes de France. 1891.

10.1.2. Hidrofilia

La hidrofilia es el modo de polinización en el que el agua actúa de vector. Suele darse en plantas acuáticas con flores flotantes o sumergidas. Sin embargo, no es el modo más común en las plantas acuaticas, que suelen ser polinizadas por animales. Existen muy diversas adaptaciones al uso del agua como vector de polinización. Por ejemplo, en el caso de una monocotiledónea, *Vallisneria spiralis* (Figura 10.2), hay individuos con flores exclusivamente masculinas e individuos

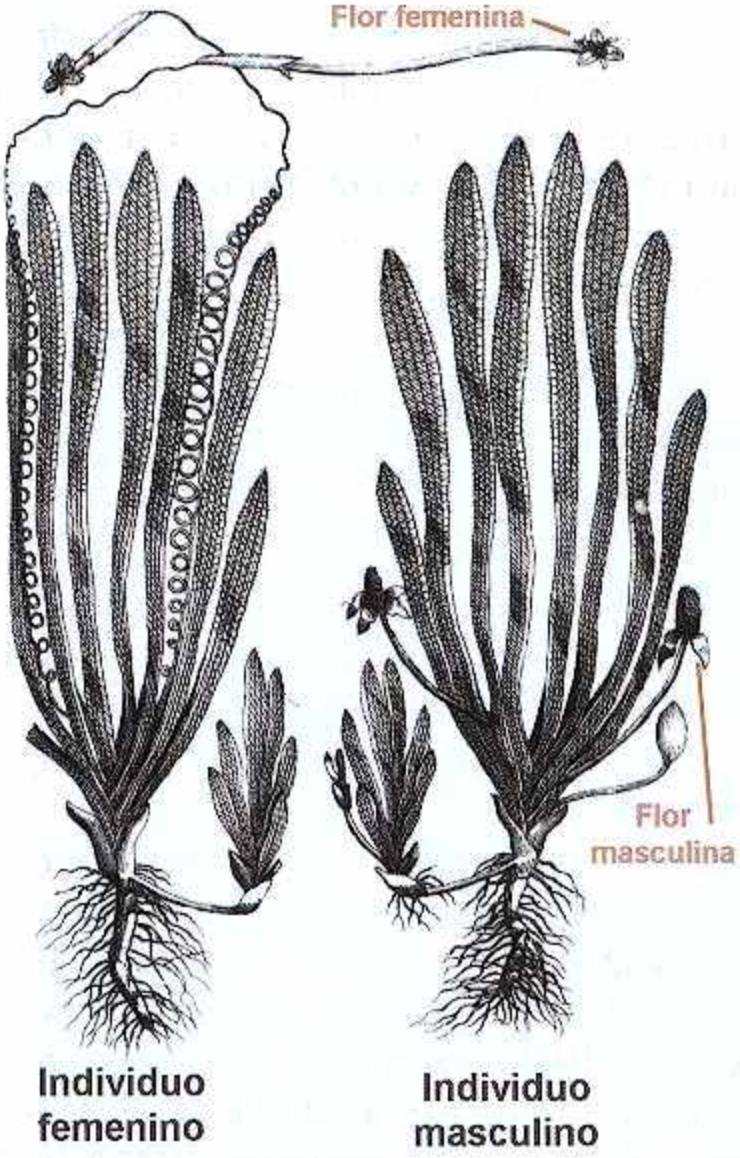


Figura 10.2: *Vallisneria spiralis*.
Imagen de dominio público, de E. Darwin, *The Botanic Garden*, 1789.

con flores exclusivamente femeninas. Las femeninas están al final de largos pedúnculos filiformes en forma de espiral, que emergen a la superficie en el momento de la polinización. Por su parte, las flores masculinas, muy pequeñas, aparecen próximas a las raíces, y para la polinización se desprenden y emergen a la superficie, donde son llevadas flotando por la corriente del agua o el viento hasta las flores femeninas flotantes. Cuando contactan con una, depositan el polen en ella. Un caso similar se da en el género *Elodea*, aunque éste se reproduce sobre todo asexualmente, mediante la producción de hijuelos flotantes, y la reproducción sexual tiene un papel menor.

Otro ejemplo típico es el de *Zostera marina*, planta que vive sumergida en el mar, y cuyas flores presentan granos de polen largos (del orden de milímetros), filamentosos y flexibles, formando copos (unidades polínicas) que son transportados por el agua hasta que se encuentran con los estigmas alargados de la flor femenina. En el caso de *Posidonia*, cuyos granos de polen no poseen cubierta externa, el polen permanece en todo momento bajo el agua, desplazándose hasta que encuentra una flor. Este desplazamiento pasivo se da también en *Ceratophyllum*, donde los estambres se abren al formarse burbujas de aire en el aerénquima. Otras especies presentan polen esférico, pero los granos van embebidos en largas tiras de mucílago. Su forma facilita el contacto y la adherencia a los largos estigmas.

Las gotas de lluvia pueden también ser un agente polinizador, al arrastrar en su caída polen de una flor a otra. Incluso en las ranunculáceas, con flores erectas, discoidales y cóncavas (Figura 10.3), el agua de lluvia puede provocar la autopolinización al salpicar y llevar granos de polen hacia el estigma de la propia flor.

Figura 10.3: *Ranunculus repens.*
Imagen de Josef F. Stuefer, en Flickr.com, bajo licencia Creative Commons Attribution.

10.2. Vectores bióticos: zoofilia

La *zoofilia* es el modo de polinización en el que el vector es un animal. Raramente todas las especies de una familia presentan el mismo tipo de polinización. Lo más normal es que en cada familia o en el mismo género haya especies adaptadas a diferentes polinizadores, en función del entorno en el que se desarrollan y del tipo de fauna que cohabite en dicho entorno.

Los animales polinizadores pueden ser muy variados, desde insectos de muy distinto tipo, hasta pájaros, o incluso mamíferos (murciélagos o roedores). A la polinización por insectos se le denomina *entomofilia*, y las flores así polinizadas se denominan entomófilas. A la polinización por aves se le denomina *ornitofilia*, y a la polinización por murciélagos (quirópteros) se le denomina *quiropterofilia*. En función de los hábitos de cada uno de estos tipos de animales, las plantas por ellos polinizadas desarrollarán métodos de atracción (señales y recompensas) diferentes.

10.2.1. Señales y recompensas

Los animales necesitan desplazarse para buscar alimento, y las plantas se aprovechan de esta necesidad para asegurar el transporte de su polen. Esta interrelación crea complejas relaciones entre ambos, y hace que muchas plantas hayan evolucionado junto a sus polinizadores. Las plantas diseñan estrategias de atracción que combinan la presentación de estímulos llamativos (*señales*) que atraen al animal, y el ofrecimiento de sustancias nutritivas (recompensas) que pueda utilizar como alimento, como el polen o el néctar. La planta logra atraer al polinizador a través de productos que le ofrece como recompensa.

Las señales que presentan las flores para asegurar la visita de los vectores bióticos pueden ser de naturaleza óptica (color) o química (olor). Los olores atraen sobre todo a los polinizadores de olfato muy desarrollado (insectos y murciélagos). De acuerdo con la sensibilidad humana, los olores se clasifican en:

- simpáticos (agradables, fragancias):
- aromáticos (canela, vainilla, etc.)
- dulces (miel, rosa, violeta, etc.)
- afrutados (naranja, banana, etc.)
- idiopáticos (desagradables):
    - fétidos (olor a carne descompuesta, a excrementos)
    - feos (a pescado, caprino, etc.)

Respecto a los olores, hay que remarcar el hecho de que las denominaciones de estos olores han sido puestas de acuerdo a un criterio exclusivamente humano. Esto quiere decir que cuando se considera desagradable un olor, no quiere decir

que lo sea para el animal en cuestión. Más bien al contrario, si se siente atraído por él. Hay estudios que indican que el polen por si mismo también desprende su olor característico. Concretamente, son los compuestos aromáticos del cemento polínico (polenkitt) de la cubierta externa del polen los principales responsables del olor del polen. Un olor que es diferente al de las otras partes de la planta, y también al del polen de otras especies. Este olor específico de cada polen puede ser detectado y distinguido por los insectos.

Las recompensas para el polinizador tienen como finalidad asegurarse de que, una vez el animal ha visitado la flor, repita en futuras ocasiones. En términos de marketing, podríamos hablar de que las recompensas son estrategias de "fidelización del cliente". Las recompensas suelen tener forma de alimento. Las principales son el propio polen y el néctar. El polen es altamente nutritivo por todas sus reservas calóricas en forma de carbohidratos (25%, sobre todo almidón) o lípidos (5%, fundamentalmente en forma de aceites) y su contenido en proteínas (25%) y aminoácidos (10%), además de vitaminas. Además, las plantas que ofrecen polen como principal o única recompensa suelen presentar polen especialmente rico en aceites, pues para los animales los lípidos son más apreciados que el almidón. Por esta razón, supone un alimento muy deseable por ciertos animales, sobre todo insectos. En especies zoofilas el polen suele ser ornamentado y contar con una cubierta oleaginosa.

La recompensa más común que ofrecen las plantas es el néctar. El néctar es una solución acuosa azucarada, compuesta fundamentalmente por sacarosa, glucosa y fructosa, que además incluye aminoácidos, ácidos orgánicos y minerales en baja proporción. El néctar es sintetizado por tejidos secretores especializados, los *nectarios*, situados generalmente en la base de la flor, cerca del receptáculo (Figura 3.6), pero siempre de tal manera que la flor se asegure de que el insecto, en su búsqueda del néctar, contacte con los estambres y se cargue de polen. El néctar es el principal aliciente de los animales atraídos por flores (animales antófilos) como las abejas, que recogen el néctar, lo evaporan y lo almacenan para el invierno en forma de miel. Al igual que con el polen, cada especie productora de néctar lo produce con unas características típicas en cuanto a la cantidad de néctar, la concentración de azúcares, la proporción entre los distintos azúcares o el contenido en aminoácidos. Estas características son apreciadas por el polinizador e influyen en su decisión.

Además del néctar o el polen, puede haber otras recompensas más específicas para ciertos animales. Por ejemplo, algunos escarabajos mastican pétalos o tejidos ováricos de ciertas flores que suelen tener órganos florales carnosos. También pueden presentar recompensas de tipo no nutritivo para atraer animales. Por ejemplo, aportar materiales para la construcción de nidos (en aves), aportar atractivos sexuales o proporcionar lugares cálidos de cobijo, descanso, apareamiento u ovoposición.

10.2.2. Requisitos de un vector biótico de polinización

Para que un animal se considere vector biótico de polinización ha de cumplir con los cuatro requisitos genéricos antes expuestos para vectores de polinización, y además con los siguientes, propios de animales:

- Las señales de la planta han de ser percibidas y usadas por el vector
- La recompensa ha de ser utilizada/consumida por el vector como parte integral del proceso de polinización
- Como resultado de la polinización, ha de haber una contribución relativa del polen transportado por el vector en la siguiente generación
- Han de haber interrelaciones entre diferentes vectores implicados en la polinización

Asimismo, para que una planta se considere zoofila, ha de cumplir una serie de requisitos para atraer a los polinizadores:

- Anunciar la presencia de una recompensa para el polinizador
- Proporcionar dicha recompensa, usualmente alimento, al polinizador
- Tener las anteras y el estigma posicionados de modo que contacten con el cuerpo del polinizador para facilitar la transferencia del polen. En función de la parte del cuerpo que contacte con las anteras y acarree por tanto el polen, se denomina *nototribia* si el polen lo transportan en la cara dorsal, y *esternotribia* si lo llevan sobre la cara ventral.

10.2.3. Entomofilia

Las flores entomófilas necesitan desarrollar una serie de características específicas que las hagan atractivas para los insectos. Por ejemplo, la cubierta del polen de las flores entomófilas suele presentar púas, espinas, irregularidades, elevadas cantidades de cemento polínico e incluso hebras de *viscina*, una sustancia viscosa de naturaleza lipídica que suele mantener los granos de polen unidos (formando unidades polínicas) en las especies que la sintetizan.

Dentro de la entomofilia, podemos distinguir flores *cantarófilas* si la polinización la llevan a cabo coleópteros (escarabajos), flores *miófilas* si es por dípteros (moscas), flores *melitófilas* si es por himenópteros (abejas y avispas) y flores *psicófilas, esfingófilas* y *falenófilas* si es por lepidópteros (mariposas). Veremos las características de cada uno de estos tipos de polinización a continuación.

10.2.3.1. Coleópteros: cantarofilia

En general, las flores cantarófilas suelen ser de gran tamaño, de tipo rotáceo (circulares, aplanadas y perpendiculares al pedicelo), fuertemente olorosas, con fragancias frutales, y de colores poco llamativos, verdosos o blanquecinos. Suelen ser flores poliníferas, que ofrecen abundante polen y no néctar como

recompensa para el escarabajo. Por ello, suelen presentar también muchos estambres para producir polen en grandes cantidades. Los coleópteros son insectos poco ágiles, en ocasiones pesados y de gran tamaño. Sus élitros duros y lisos tampoco les hacen ágiles en el vuelo. Todas estas características hacen que los coleópteros no sean buenos polinizadores. Y por ello, las flores cantarófilas deben ser robustas, poco profundas y fácilmente accesibles. Además estos insectos presentan un aparato bucal masticador con el que, además de comerse las anteras, suelen también mordisquear otras partes florales, dañándolas en ocasiones seriamente. Por este motivo los pétalos de las flores cantarófilas suelen ser carnosos para actuar como recompensa adicional, y sus óvulos están generalmente ubicados en profundidad dentro de un ovario formado por carpelos duros. Las flores cantarófilas son frecuentes en las magnoliáceas, ranunculáceas, ninfáceas y aizoáceas como *Carpobrotus edulis* (Figura 10.4).

Figura 10.4: Escarabajo *Heliotaurus ruficollis* en inflorescencia de *Carpobrotus edulis*.
Imagen de Joaquim Alves Gaspar, en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org), bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 Generic.(http://creativecommons.org/licenses/by/2.5).

10.2.3.2. Dípteros: miofilia

Muchas especies de dípteros (moscas) son importantes polinizadores de ciertas plantas, cuyas flores desarrollan caracteres específicos denominados en

conjunto como *síndrome de miofilia*. Algunas características de este síndrome son la antesis (apertura) diurna, la presencia de colores poco llamativos en general, fragancias no muy agradables al olfato humano, poca o nula producción de néctar, y poca profundidad de la flor. Más allá de estas pocas características comunes a muchas de ellas, las flores miófilas no desarrollan una única estrategia o síndrome floral para atraerlas. Así, las flores polinizadas por moscas presentan a sus polinizadores conjuntos de señales muy heterogeneas. Veremos algunos de estos síndromes de miofilia.

Algunas flores son relativamente inodoras, con corola pequeña y néctar libre. Por ejemplo, *Cabomba caroliniana*, una planta acuática con flores protoginas, en las que primero madura el gineceo. En las flores de *C. caroliniana*, la flor se abre durante dos días consecutivos (Figura 10.5). El primer día sus tres pistilos están separados, mientras que los estambres son cortos e indehiscentes, aún no han madurado. El segundo día, los pistilos se juntan en el centro y quedan rodeados por los estambres, ya maduros, que han crecido alargándose de modo que las anteras sobresalen por encima de los nectarios. Por tanto, cuando una mosca visite una flor en su segundo día de apertura, al acercarse al nectario a libar el néctar forzosamente rozará con la antera próxima a él y se cargará de polen. Si esa mosca cargada de polen visita posteriormente una flor en su primer día de apertura, al buscar el néctar, se rozará con los estigmas próximos al nectario, depositando el polen en estas flores.

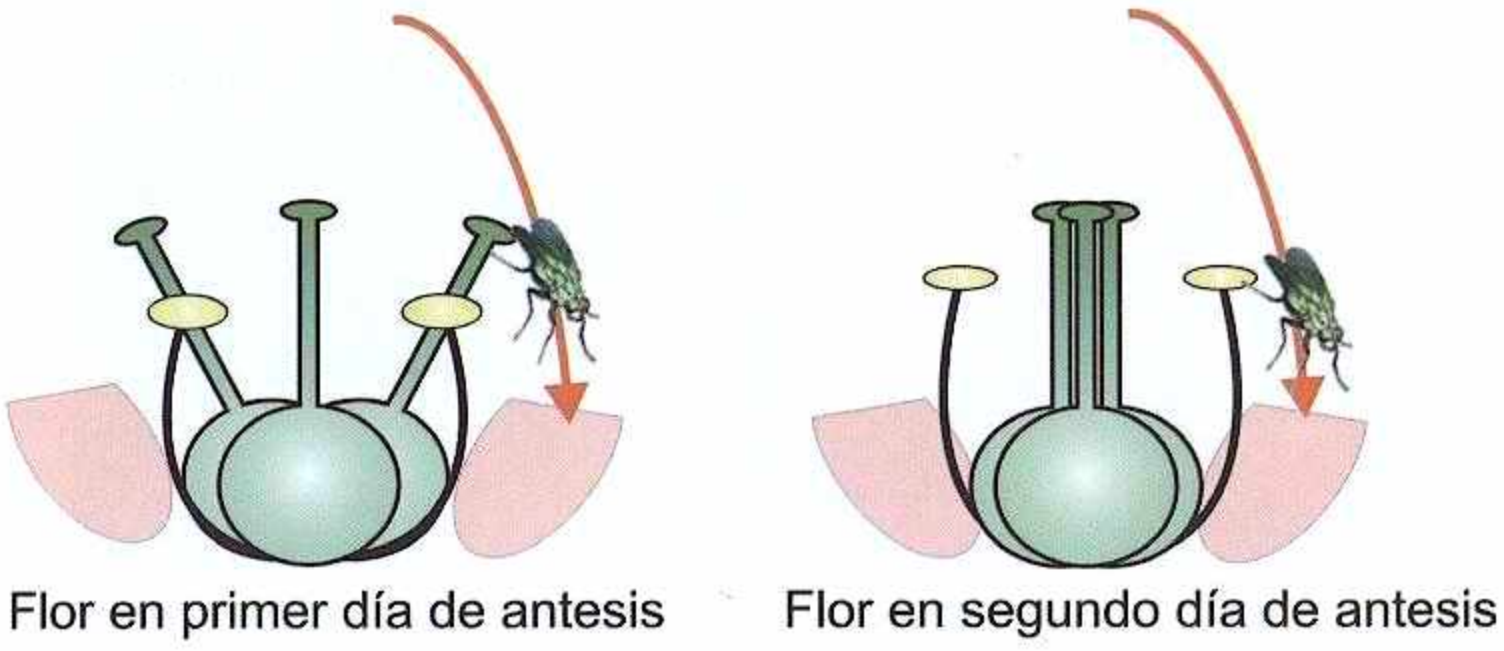


Figura 10.5: Miofilia en *Cabomba caroliniana*.
Imagen de Seguí Simarro.

Otras flores adoptan estrategias absolutamente diferentes: sintetizan sustancias de olor desagradable al olfato humano. Por ejemplo, sustancias que simulan olores fecales, o a carne podrida o en descomposición, atractivos para las moscas necrófagas ya que depositan sus huevos en dicha carne. Al acercarse a la ovoposición, captan el polen de estas flores. Ejemplos de este tipo de

plantas son los géneros *Huernia* y *Rafflesia*. *Rafflesia arnoldii* (Figura 10.6) es una planta del sudeste asiático que produce las flores más grandes conocidas, de alrededor de un metro de diámetro. Esta planta, además del olor, simula en sus flores el color y la textura de la carne en descomposición.

Otras plantas "simuladoras" son las del género *Helosis*. Por ejemplo, *Helosis cayennensis* (Figura 10.7) es una planta parásita de Sudamérica que pasa la mayor parte de su ciclo vital bajo tierra, parasitando raíces de otras plantas, y que en el momento de la floración produce unas inflorescencias que imitan los cuerpos fructíferos de ciertos hongos. De este modo atraen a un grupo de moscas que suelen alimentarse y poner huevos en estos hongos. Otro ejemplo de este tipo de estrategia son las orquídeas del orden *Pleurothallinidae*, que atraen a las moscas del género *Zygothrica* mediante la emisión de flores con labelos en forma de cuerpo fructífero.

Figura 10.6: *Rafflesia arnoldii*.
Imagen de Ma Suska, en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org), bajo licencia Creative Commons Attribution 2.0 Generic. (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0)

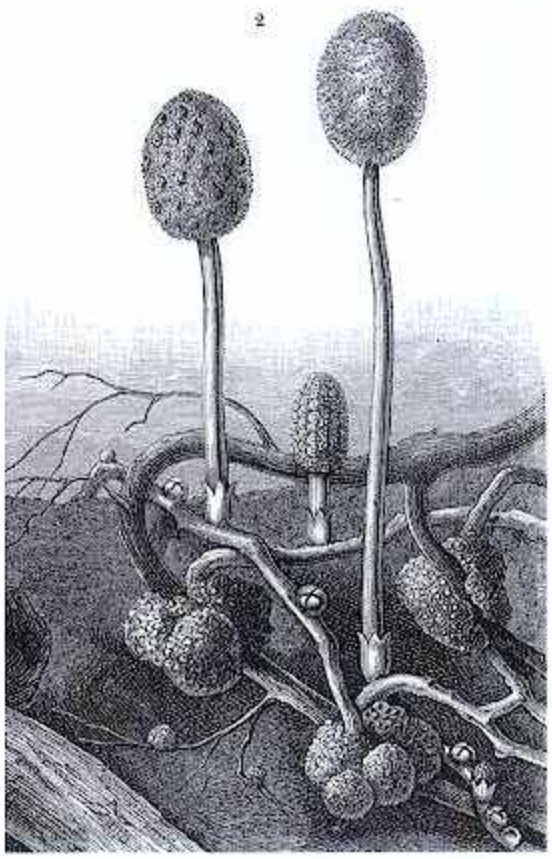


Figura 10.7: *Helosis cayennensis*.
Adaptación de imagen de dominio público, de A.J.K. von Marilaun y A. Hansen, *Pflanzenleben, Erster Band: Der Bau und die Eigenschaften der Pflanzen*. (1913).

Otras especies presentan flores trampa. Por ejemplo, *Arum maculatum* presenta una inflorescencia en espádice, con su correspondiente espata situada a su alrededor, protegiéndola (Figura 10.8). En la parte apical del espádice se sitúan flores neutras (estériles), con cerdas gruesas orientadas hacia abajo. En la parte media presenta flores masculinas fértiles, y en la zona basal se sitúan las flores femeninas.

De abajo hacia arriba, la espata se dilata en la base formando una especie de urna, y se estrecha alrededor de la zona de las flores neutras (Figura 10.8). En la zona apical de la espata se sitúa un osmóforo que genera un olor fétido, atractivo como reclamo para los dípteros. Además, esta parte de la espata se abre ampliamente para permitir la entrada del insecto. La epidermis interna de esta zona es muy lisa y resbaladiza, con gotas de aceite secretadas por las papilas. De este modo, cuando las moscas atraídas por el olor desprendido por el osmóforo resbalan y caen en la urna, quedan atrapadas por las cerdas de las flores neutras. Al anochecer, las flores masculinas fértiles liberan el polen, que cae sobre los insectos así atrapados. Al día siguiente se marchitan las flores neutras, y los insectos cargados de polen pueden salir. Cuando vuelvan a posarse en la espata de otra flor, y se precipiten al fondo de su urna, el polen que acarrean polinizará las flores femeninas situadas en la base del espádice, a la altura de la urna.

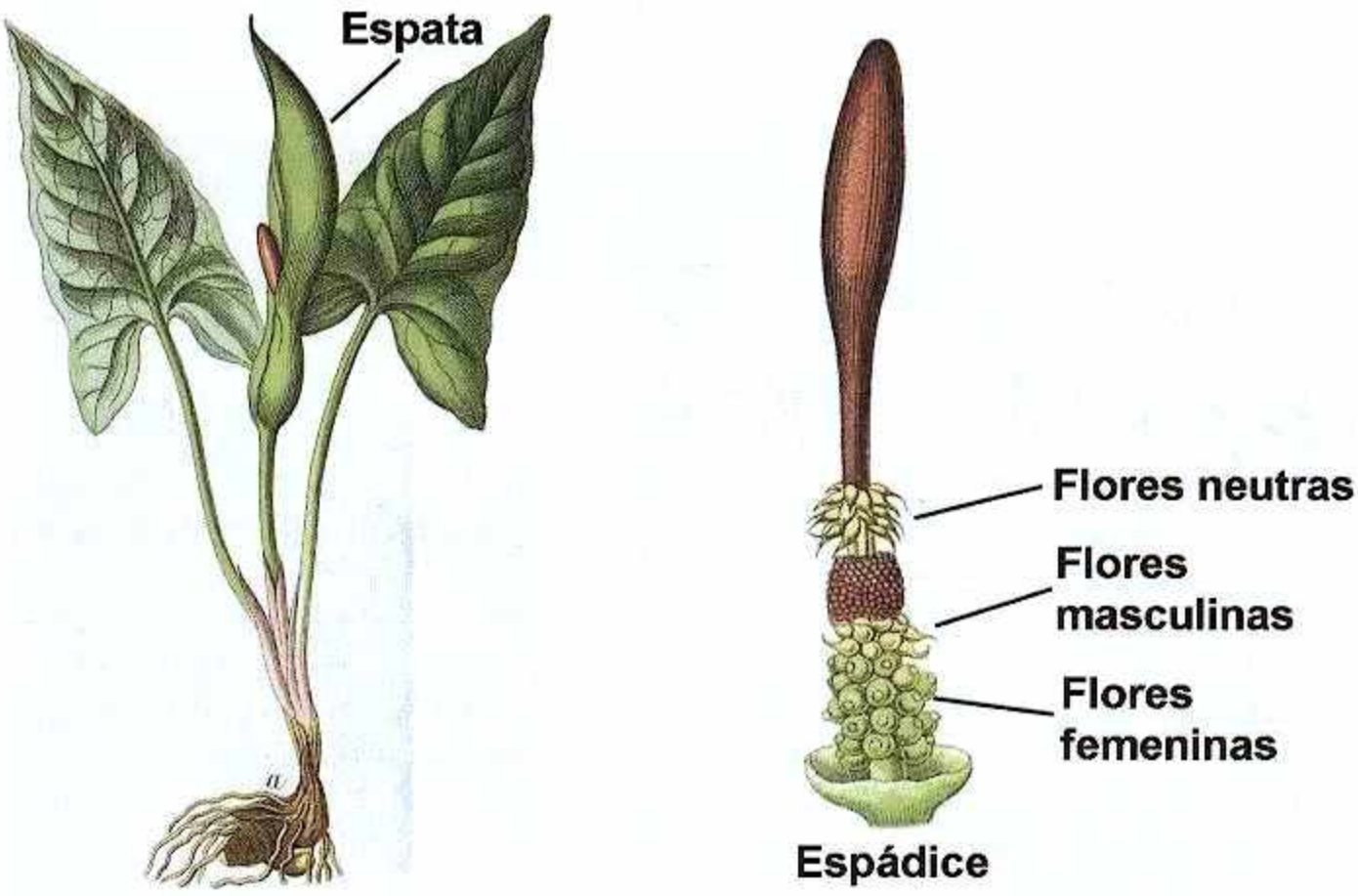


Figura 10.8: *Arum maculatum.*
Imagen de dominio público, de *Deutschlands Flora in Abbldungen* (1796), en www.biolib.de.jpglibre,de.

10.2.3.3. Himenópteros: melitofilia

Las abejas y las avispas se caracterizan por su capacidad para detectar la luz ultravioleta. Por este motivo, algunas flores melitófilas han desarrollado pigmentos que reflejan la luz ultravioleta solar para que pueda ser vista por estos insectos. Colores típicos del síndrome de melitofilia son el azul, blanco, violáceo, amarillento o rosado, pero no el rojo, pues estos insectos no son capaces

de percibirlo. Aparte de por el color, estas flores se caracterizan también por presentar antesis diurna, ser fragantes, con aromas suaves, y presentar néctar. Sin embargo, este néctar no está fácilmente accesible, sino más bien escondido al fondo de flores de forma tubular, más o menos profundas. Además producen polen en cantidades desde moderadas a abundantes. En general, las flores melitófilas combinan las características antes mencionadas para atraer a sus polinizadores por la combinación de su forma, olor y color. Así, además de lo antes mencionado, suelen tener corolas generalmente con una forma amariposada, labiadas o en forma de fauce. Formas en general adecuadas para que se posen los insectos sin dificultad. Además, la superficie de la corola presenta manchas o líneas coloreadas que actúan de guía para el polinizador, señalándole el camino a seguir para llegar al néctar (Figura 10.9). También producen sustancias aromáticas en los osmóforos de la corola (como en la flor fragante del azahar, *Citrus)*, u otros órganos florales (como en *Narcissus*). Además de *Citrus*, muchos de los principales frutales de interes agronómico son polinizados por abejas. Por ejemplo manzanos, cerezos, ciruelos, kiwis, aguacates o perales (Figura 10.10).

Figura 10.9: Flor melitófila de *Viola tricolor hortensis*, cv. 'Yellow'.
Imagen de Skyro, en www.stock.xchng.hu, bajo licencia SXU

Dentro de la polinización melitófila, el ejemplo más conocido es el de las abejas, cuyo modo de vida gira totalmente en torno al polen y al producto que fabrican con él, la miel. Las abejas surten sus nidos (colmenas) con granos de polen que constituye el aporte proteico y vitamínico de sus larvas. También recogen néctar para los adultos, libándolo con su aparato bucal (Figura 10.11).

Figura 10.10: Abejas polinizando flores de peral (*Pyrus communis*).
Imagen de Pablo Mersé, de dominio publico, en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

Figura 10.11: Abeja libando néctar de una flor.
Imagen de Frank Mikley, en Wikimedia Commons, bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 generic.

En otras especies, la recolección del polen por la abeja es vibrátil (*buzz-pollination*). La llevan a cabo abejas o abejorros del género *Bombus* que se aferran a la flor, y con rápidas contracciones de sus músculos para el vuelo indirecto producen un zumbido característico (buzz) que hace vibrar las anteras, provocando la salida del polen. Las flores con polinización vibrátil tienen una serie de características comunes, como la corola de forma cóncava o con pétalos reflejos, un tamaño pequeño a mediano, la ausencia de néctar, las anteras con dehiscencia poricida, y los granos de polen de tamaño pequeño o mediano, no grasos y de superficie lisa. Es el caso de especies de ericáceas, melastomatáceas, solanáceas o fabáceas como *Cassia fistula* (Figura 10.12).

Existen otro tipo de recompensas en las llamadas *flores de aceite*, que ofrecen aceites o cuerpos grasos secretados o almacenados en glándulas especiales llamadas *elaióforos*. Estas sustancias atraen a ciertos grupos de abejas de la familia de las Antophoridae. Es el caso de las flores de especies de la familia Malpighiaceae, de varias especies de orquídeas y de solanáceas del género *Nierembergia* (Figura 10.13). En *N. hippomanica*, los polinizadores recogen aceites de los pelos glandulares junto con el polen. También duermen y copulan en la flor.

Algunas especies de orquídeas del género *Ophrys* (Figura 10.14) imitan en el labelo de sus flores la forma, textura, pilosidad y color de las hembras de ciertas avispas o abejas, engañando al macho. Por ejemplo, *Ophrys insectifera* es

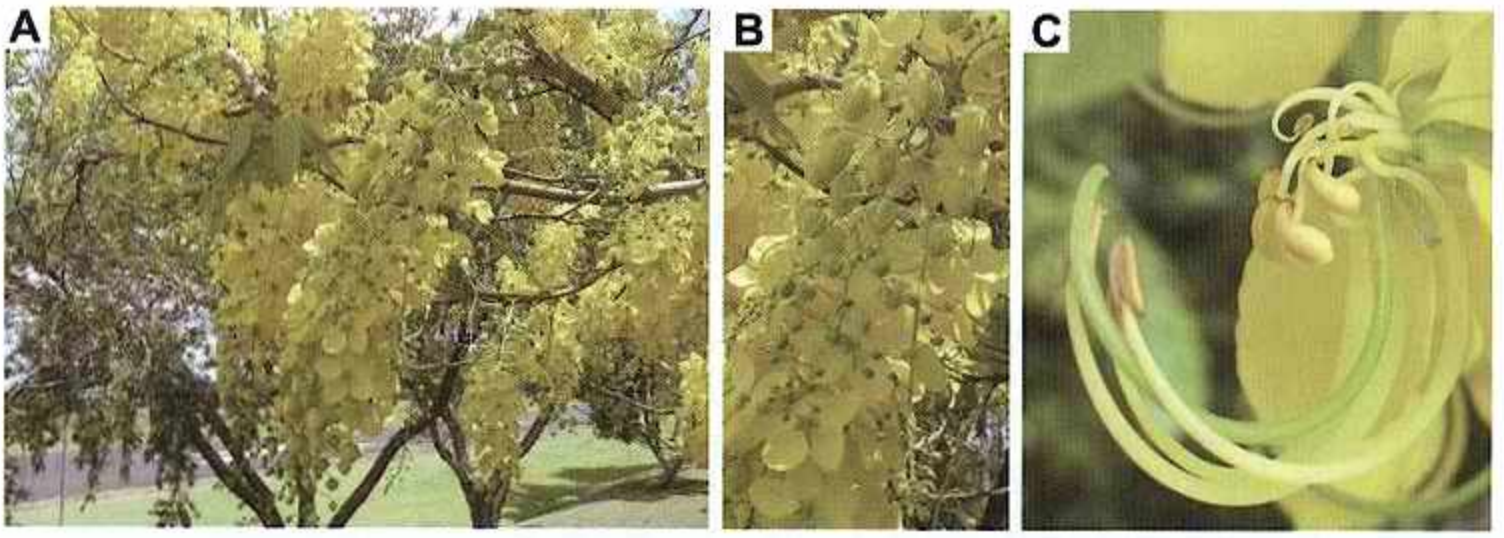


Figura 10.12: Árbol (A), inflorescencia (B) y flor (C) de *Cassia fistula*.
Adaptado de imágenes de Jim Conrad (C) de dominio público, y de Peter Greenwell (A y B) bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5. http://creativecommons.org/licenses/by/2.5, en Wikimedia Commons. (http://commons.wikimedia.org).

Figura 10.13: *Nierembergia repens*.
Imagen de Wouter Hagens, de dominio público, en Wikimedia Commons.

visitada solo por dos especies de avispas del género *Argogorytes*. Los machos nacen varias semanas antes que las hembras, y en sus primeros vuelos son atraídos por la fragancia de las flores, similar a las feromonas secretadas por las hembras. Cuando el macho se posa en la flor e intenta la cópula con la falsa hembra, entran en contacto con la antera y se carga de polen. A esto se le llama *pseudocopulación*. Si esto lo intentan en diversas flores, van trasladando el polen de una flor a otra. Éste sería un caso de polinización en el que el vector no obtiene ningún beneficio a cambio de su acción, sino que es literalmente engañado por la flor.

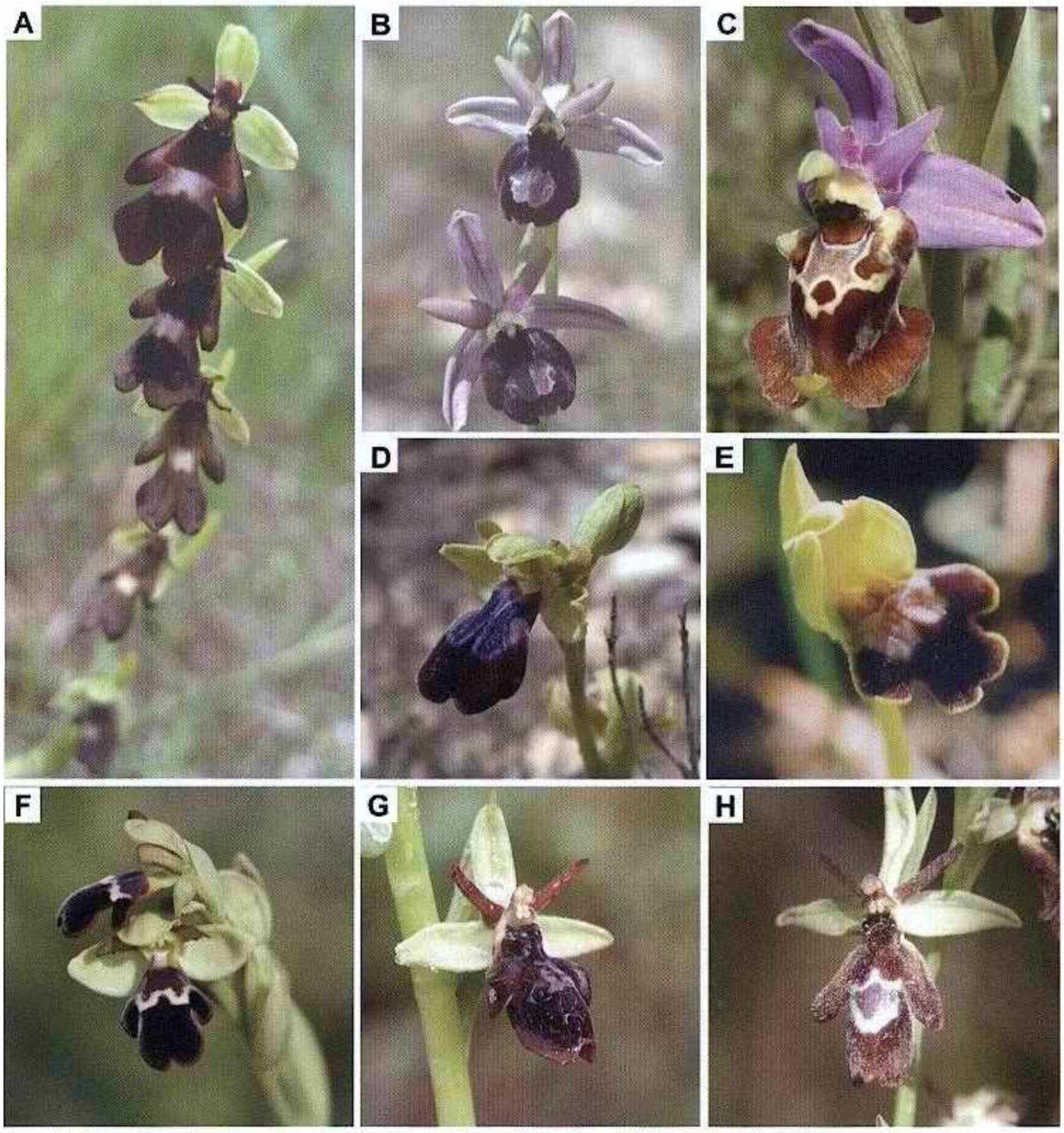


Figura 10.14: Distintas flores del género *Ophrys*. A: *O. insectifera*. B: *O. drumana;* C: *O. apulica*; D: *O. iricolor*; E: *O. flammeola*; F: *O. dyris algarvensis*; G: *O. x hybrida*; H: *O.* × *royanensis* (*O. drumana* × *insectifera*).

Imágenes de Quinzor (A), M. Klueber (B), M. Fracchiolla (C), G. Pisanty (D), M. Iannizzotto (E), L. Nunes Alberto (F) y B. Haynold (G y H), todas en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org). Salvo C, de dominio público, todas las imágenes están bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0. o 2.5 (http://creativecommons.org/licenses/by).

10.2.3.4. Lepidópteros: psicofilia, esfingofilia y falenofilia

Las plantas con flores falenófilas, psicófilas y esfingófilas son típicamente polinizadas por lepidópteros. En general, los lepidópteros se caracterizan por presentar un aparato bucal de tipo suctor, con una espiritrompa muy larga, que enrollan cuando no está en uso (Figura 10.15). Así, las flores polinizadas por lepidópteros suelen proporcionar al insecto una superficie donde posarse y ofrecer como recompensa néctar, que se sitúa en un nectario hundido en el

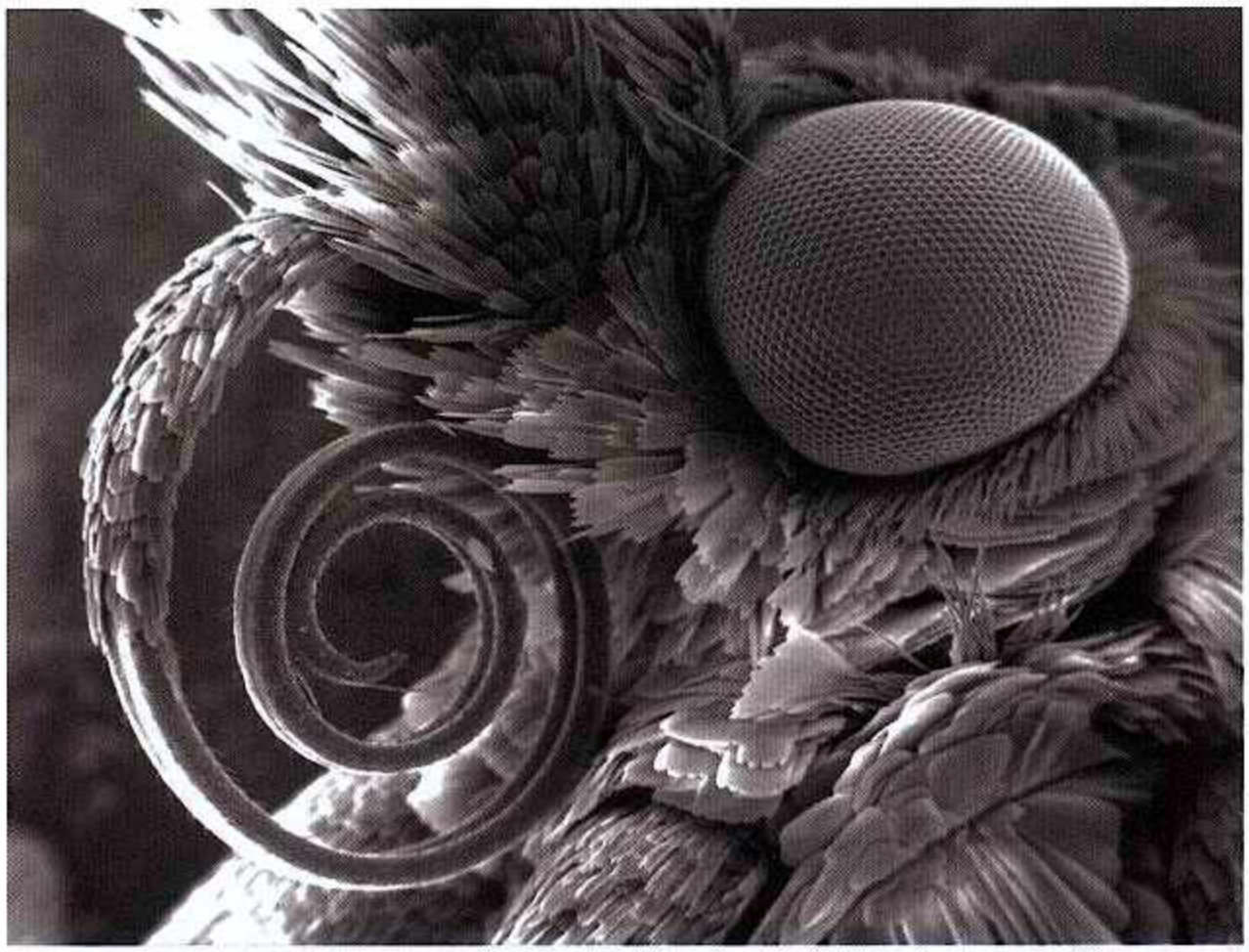


Figura 10.15: Detalle de la cabeza de una mariposa con su aparato bucal suctor (espiritrompa).
Imagen del Dartmouth Electron Microscope Facility, de dominio público.

fondo de la flor o del *espolón*, estructura larga y tubular, accesoria a la flor, que presenta néctar en el fondo. Si no existe espolón, la corola de estas flores forma una estructura larga y tubular, de modo que tanto en este caso como en el de presencia de espolón, el néctar solo podrá ser libado mediante una espiritrompa.

Los lepidópteros son un orden de insectos que comprende, entre otros, a las mariposas, las polillas y las esfinges. Pese a pertenecer a un mismo orden y tener muchos aspectos en común, como el aparato bucal que acabamos de ver, los hábitos de cada uno de estos lepidópteros son distintos. Por ejemplo, muchas de las mariposas son diurnas, mientras que muchas polillas son nocturnas. Las mariposas diurnas se guían por señales visuales, mientras que las nocturnas lo hacen por señales olfativas. Por tanto, las flores especializadas en ser polinizadas por cada uno de ellos presentarán síndromes florales diferentes, que veremos a continuación.

Las flores psicófilas (Figura 10.16) están especializadas en la polinización por mariposas diurnas. Son flores erectas, de anteras fijas, no necesariamente fragantes, y de colores vivos, anaranjado, azul, morado e incluso rojo, al contrario de las melitófilas. La antesis de las flores psicófilas tiene lugar durante el día. Frecuentemente son tubulosas, con el néctar muy escondido al fondo de la flor. El néctar es abundante, con aromas suaves y agradables. Como ejemplo de flores psicófilas podemos citar *Dianthus*, *Lavandula*, o *Nicotiana tabacum*.

Figura 10.16: Mariposa diurna en una inflorescencia de *Lantana*.
Imagen de dominio público en http://pdphoto.org.

Las flores esfingófilas (Figura 10.17) y falenófilas son las polinizadas por mariposas nocturnas, que pueden ser de dos tipos, las esfinges (familia esfíngidos), mariposas grandes y robustas, y las polillas (familias tineidos, pirálidos, geléquidos y tortrícidos), respectivamente. Tanto polillas como esfinges visitan flores estrechamente tubulosas, muy fragantes, horizontales o pendulares, blanquecinas o de colores claros, y cuya antesis se da al anochecer. El néctar suele ser muy abundante, y estar escondido al fondo de la flor o del espolón. Muchas de estas mariposas no necesitan posarse para libar, pues pueden mantenerse

Figura 10.17: Flores esfingófilas de *Nicotiana alata*.
Imagen de C.E. Lewis, en Flickr.com, bajo licencia Creative Commons Attribution 2.0 Generic.

paradas en vuelo. Por ello, las corolas de las flores que polinizan suelen carecen de bordes o éstos se encuentran doblados hacia atrás. Ejemplos de este tipo de flores son *Lillium*, *Lonicera*, *Cestrum parqui* y otras *Nicotiana* como *N. alata* (Figura 10.17).

La coevolución conjunta de algunas plantas junto con las especies de polillas que las polinizan, ha hecho que se desarrolle una interdependencia hasta tal punto que ninguna de las dos especies puede vivir sin la otra. Es el caso por ejemplo de la polilla de la yuca (*Tegeticula* spp), único polinizador conocido de la yuca (*Manihot esculenta*), o de la esfinge de Morgan (*Xanthopan morganii praedicta*) que visita la orquídea *Angraecum sesquipedale* (Figura 10.18), originaria de Madagascar. Esta orquídea presenta una historia curiosa, que da idea de hasta qué punto planta e insecto se interrelacionan.

Las flores de *A. sesquipedale* son verdosas-blanquecinas y tienen forma estrellada (Figura 10.18A). Sin embargo, de su anatomía destaca la presencia de un larguísimo espolón de 20 a 35 centímetros de longitud que desemboca en el receptáculo de la flor. En la base del espolón está el néctar que liba la polilla *Xanthopan morganii praedicta*. La historia de *A. sesquipedale* tiene que ver con Charles Darwin, que estudió ejemplares de esta orquídea en 1862, y al observar el largo espolón de la flor y la disposición del néctar al fondo de él, dedujo que el hecho de que existiera una flor así implicaba a su vez la existencia de un polinizador con una probóscide de largo similar, capaz de acceder al néctar del fondo. En su publicación de 1862 (*La fecundación de las orquídeas*), predijo la existencia de tal polinizador, y además auguró que tenía que ser una mariposa

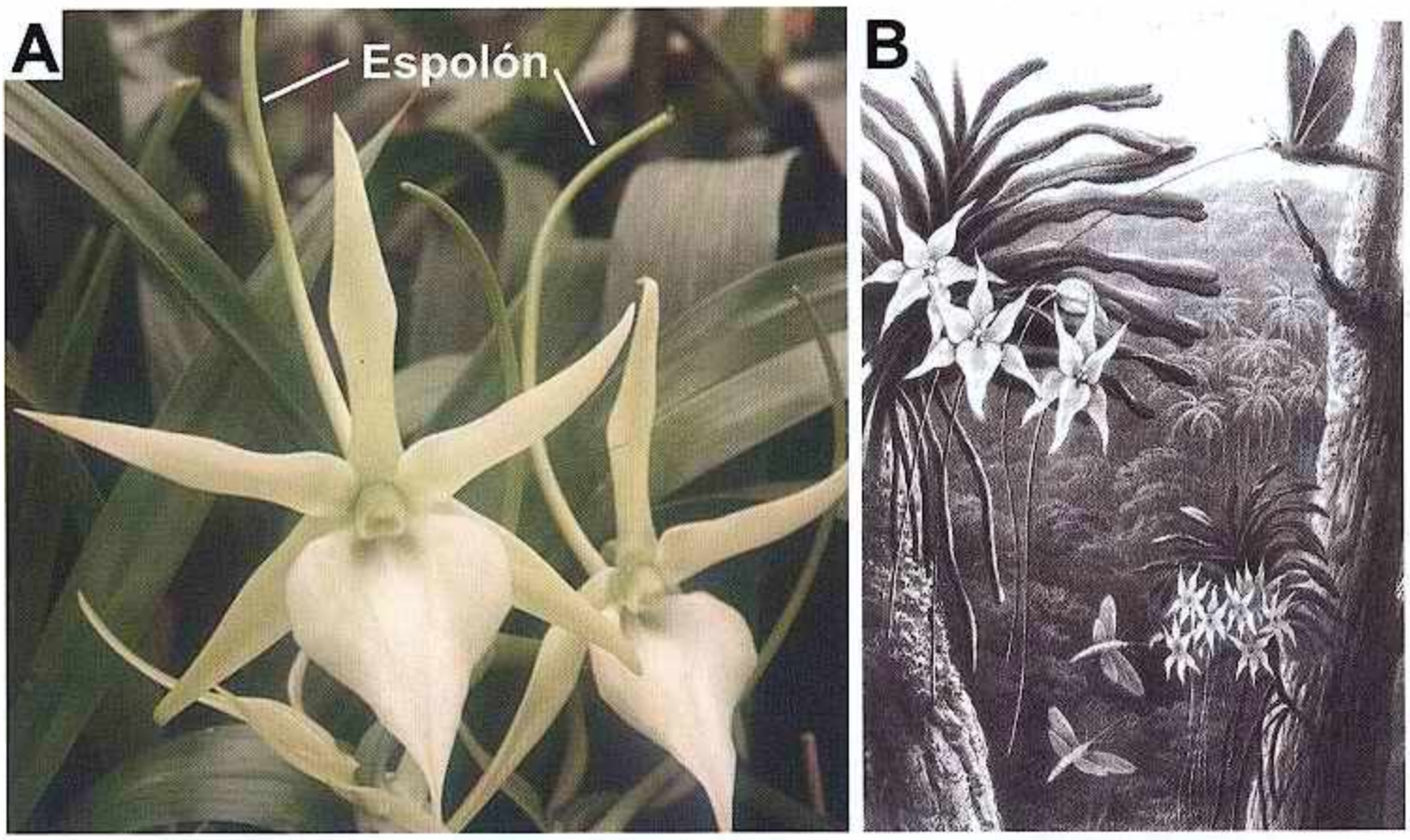


Figura 10.18: A: Orquídea *Angraecum sesquipedale*.
© www.larsen-twins.dk, reproducida con permiso.
B: "Sphinx moth fertilizing *Angraecum sesquipedale* in the forests of Madagascar"
Ilustración de A.R. Wallace, , en The Quarterly Journal of Science (1867), 4(16): p. 470. De dominio público.

de tipo esfíngido. Esta predicción dio lugar a ilustraciones en revistas científicas de la época como la que se reproduce en la Figura 10.18B, en la que se recrean la flor y su hipotético polinizador. Hipotético porque tal insecto jamás había sido descrito hasta entonces. 41 años más tarde, en 1903, el misterioso polinizador de *A. sesquipedale* fue encontrado y descrito en Madagascar. Se le dio el nombre de *Xanthopan morganii praedicta*. La denominación de *praedicta* para la subespecie se debe precisamente a que su existencia fue predicha por Darwin antes de descubrirse.

10.2.4. Aves: ornitofilia

La *ornitofilia* es la polinización por medio de pájaros. Los pájaros tienden a visitar flores o inflorescencias, grandes, de antesis diurna, a menudo tubulosas o cóncavas, en forma de brocha, sin superficies para posarse, y preferentemente de colores muy vivos como el rojo principalmente, o también el anaranjado o amarillo. Por contra, como los pájaros tienen el sentido del olfato mal desarrollado, suelen ser inodoras. Las corolas, largas, fuertes y pendulares, presentan paredes más duras de lo habitual para evitar daños por el pico del ave a otros órganos, pues los pájaros (comúnmente colibríes) introducen el pico en la flor mientras se mantienen en vuelo suspendidos en el aire.

En cuanto al néctar, las flores presentan manchas o líneas e la corola que sirven de señales-guías para indicar al ave dónde se encuentran situados los nectarios. El néctar es fluído, abundante, y está profundamente ubicado. De modo semejante a lo visto en las mariposas, los pájaros, generalmente picaflores o colibríes (Figura 10.19) lo absorben con su lengua tubulosa o en pincel. Al acercarse, a por néctar, el polen se adhiere al pico o a otras partes de la cabeza.

Figura 10.19: Colibrí *Amazilia tzacatl* libando de una flor ornitófila. Imagen de Scott Robinson, en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org), bajo licencia Creative Commons Attribution 2.0 Generic.

Las flores ornitófilas son propias de regiones tropicales. Por ejemplo, Hibiscus, Tropaeolum, Fuchsia, Euphorbia pulcherrima o Erythrina cristagalli. Al igual que veíamos con los lepidópteros, en la orinitofilia existen también estrechas asociaciones y evolución conjunta de planta y polinizador, como en el caso de los colibríes (Trochilidae) con orquídeas (Orchidaceae) o bromelias (Bromeliaceae); los pájaros diamante africanos (Pardalotidae) con los géneros Erythrina, Spathodia y Symphonia; los melífagos australianos (Meliphagidae) con muchas especies de las familias Proteaceae y Ericaceae; o el I'iwi de Hawai (Vestiaria coccinea), que desarrolló un pico largo y curvo y una lengua larga especialmente adaptada para llegar al néctar de *Lobelia* (Figura 10.20).

Figura 10.20: A la izquierda, detalle de la cabeza y pico de *Vestiaria coccinea*, polinizador de *Lobelia tupa*, a la derecha.
La imagen izquierda es de dominio público y la derecha de M. McCauslin, en Flickr.com, bajo licencia Creative Commons Attribution.

10.2.5. Quirópteros: quiropterofilia

La *quiropterofilia* es el síndrome floral que presentan las flores especializadas en ser polinizadas por quirópteros (murciélagos). Las especies polinizadoras de murciélagos son, junto con los Oposum (ver apartado 10.2.6) los únicos mamíferos capaces de alimentarse exclusivamente de néctar, extraído de las flores a las que polinizan. Las características de estos murciélagos (hábitos nocturnos, escasa visión, olfato desarrollado, tamaño considerable respecto al de la flor, lengua larga...) hacen que las flores quiropterófilas (Figura 10.21C) sean grandes, robustas, pendulares, de forma fasciculada o cóncavas, de abertura ancha, antesis nocturna, colores poco o nada llamativos, con gran cantidad de néctar y polen, y muy fragantes, con aromas que recuerdan al olor a fruta o material fermentado. En general, olores que contengan ésteres, alcoholes, aldehidos y ácidos alifáticos, todos ellos compuestos que ejercen una fuerte atracción en los murciélagos. Suelen ser flores solitarias o estar expuestas en zonas accesibles de la planta.

Dado el hábitat de estos mamíferos voladores, la quiropterofilia es un síndrome exclusivo de especies vegetales tropicales y desérticas o semidesérticas,

incluyendo géneros como *Musa*, *Agave*, *Adansonia* y algunas bignoniáceas y cactaceas. Por ejemplo, el murciélago mexicano de hocico largo *Leptonycteris nivalis* se alimenta del néctar de los cactus saguaro (*Carnegiea gigantea*, Figura 10.21) y de los ágaves del desierto de Sonora. Como adaptación a la dieta a base de néctar, la lengua de este murciélago presenta cerdas carnosas en su punta, y puede extenderse hasta casi una longitud igual a la de su cuerpo.

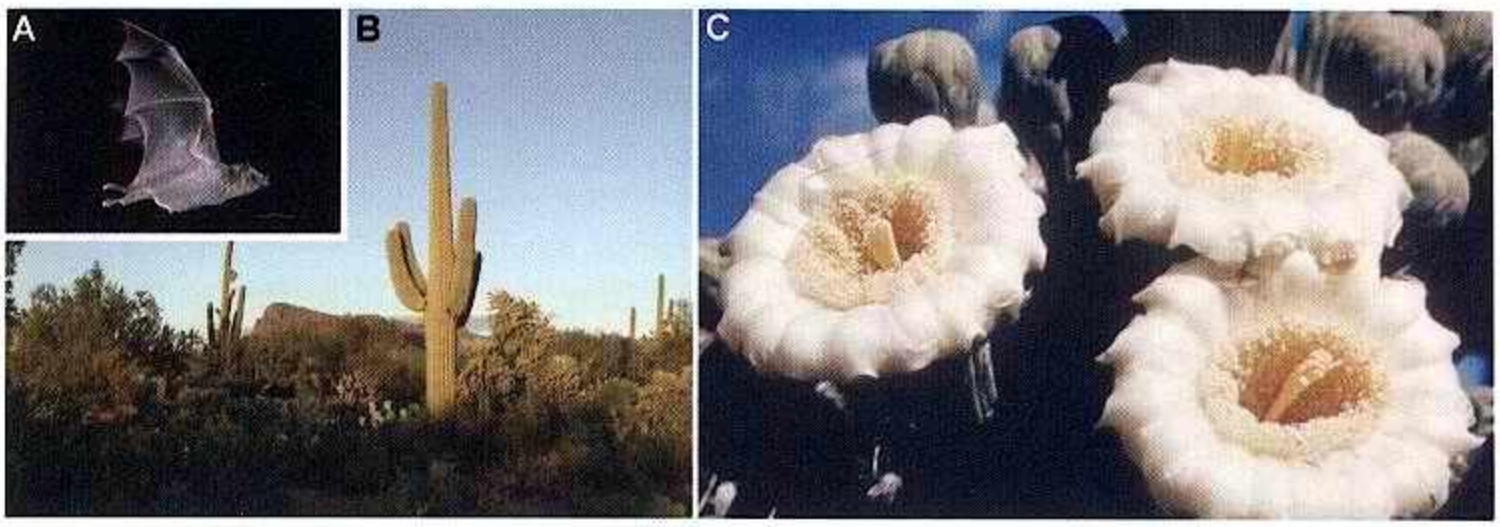


Figura 10.21: A: Murciélago *Leptonycteris Novalis*, polinizador del cactus *Carnegiea gigantea* (B). C: Flores quiropterófilas de *Carnegiea gigantea*.
Imágenes de dominio público.

Otros casos de quiropterofilia se dan en el durián (*Durio zibethinus)*, un árbol del sudeste asiático muy apreciado en Tailandia, Indonesia y Malasia por la calidad y gran tamaño de sus enormes frutos. Este árbol es polinizado por el murciélago espeleólogo (*Eonycteris spelaea*), que además visita plantas de otras 30 especies más. La planta de la flor de la pasión (*Passiflora mucronata*) es polinizada principalmente por el murciélago de lengua larga de Pallas (*Glossofaga soricina*). Otros ejemplos de plantas con flores quiropterófilas son *Lecythis poiteaui* (Lecythidaceae), *Caryocar glabrum, Parkia decussata* o *Markea camponoti*.

10.2.6. Otros animales

Aunque con un papel menos relevante que los vistos hasta ahora, hay otros animales que también pueden participar en la polinización, utilizando el néctar como alimento. Entre ellos podemos destacar a ciertos reptiles, pero sobre todo destacan los mamíferos (aparte de los murciélagos) de muy distinto tipo. Desde los pequeños mamíferos como roedores (ratones en flores de *Protea*, por ejemplo), hasta incluso jirafas, pasando también por algunos primates y marsupiales. Por ejemplo, el *Tarsipes rostratus* australiano (Figura 10.22) es un marsupial semejante a la musaraña que se alimenta principalmente de polen y miel, por lo que también es conocido como oposum de la miel. Son los únicos mamíferos no voladores cuya dieta se basa exclusivamente en néctar, que obtienen principalmente de *Banksia*.

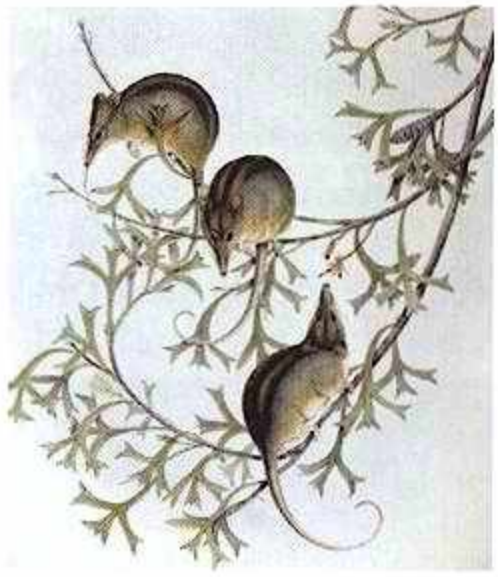


Figura 10.22: *Tarsipes rostratum.*
Imagen de dominio público de J. Gould, en Mammals of Australia, Vol. I (1863).

Las plantas polinizadas por mamíferos no voladores a menudo exhiben características comunes en cuanto a tamaño grande, agrupación en inflorescencias con gran número de flores, colores poro llamativos pero intenso olor, a menudo acre, y grandes cantidades tanto de néctar (especialmente rico en azúcares) como de polen. Esto último es muy importante, pues hay que tener en cuenta que los mamíferos son mucho más grandes que los insectos o las aves polinizadoras, y carecen de la precisión en la polinizador que otros animales como abejas o mariposas pueden conseguir. En estos casos las probóscides permiten dirigir la libación de forma precisa, y con orientar las anteras de la forma adecuada, con poco polen que se produzca será suficiente para impregnar al insecto. En cambio, en el caso de los mamíferos, la captación del néctar será mucho más imprecisa, y se desperdiciará mucho polen. Por eso se ha de producir en exceso.

En este tipo de síndrome floral también se observan casos de evolución conjunta planta-polinizador. Además del ejemplo visto antes del oposum de la miel, el lirio africano (*Massonia depressa*) es polinizado de noche por al menos cuatro especies de pequeños roedores, dos de ellas gerbos. Este tipo de lirio tiene flores poco vistosas, muy robustas, situadas cerca del suelo, y emiten un fuerte olor a fermentado. Pero lo más curioso es que produce grandes cantidades de un néctar muy azucarado, y unas 400 veces más viscoso de lo que sería una solución azucarada equivalente. Se cree que esta consistencia casi gelatinosa habría aparecido fruto de la especialización por roedores, capaces de lamer esta sustancia, evitando así la competencia con insectos, incapaces de libar algo tan sumamente viscoso.

10.3. Importancia ecológica de la polinización

Es evidente que la polinización es el mecanismo por el que las plantas que se reproducen sexualmente se aseguran su éxito reproductivo. Sin embargo, esta no es la única consecuencia de la polinización. Este proceso, además de ser útil para la planta, también lo es para el vector biótico (animal) encargado

de llevarla a cabo. De hecho, hemos visto algunas especies de insectos que se nutren de néctar o polen, e incluso de mamíferos como algunos murciélagos o el oposum de la miel, que dependen exclusivamente del consumo de néctar. Esta dependencia mutua hace que las dos especies, planta y polinizador, estén expuestas a un mismo entorno durante mucho tiempo, y que sus interacciones ecológicas evolucionen de forma conjunta, lo cual no hace sino intensificar la interdependencia.

Desde un punto de vista de la eficacia biológica, cuanto más adaptados estén el uno al otro, mayor y mejor será su interrelación. Sin embargo, desde un punto de vista ecológico, esto plantea una serie de problemas, sobre todo derivados de la acción del ser humano sobre el medio ambiente. A menudo puede parecer que una determinada decisión humana no tiene más consecuencias que las visibles inmediatamente. Nada más lejos de la realidad, pues el complejo entramado de interrelaciones entre los distintos organismos que pueblan un ecosistema determinado alcanza un equilibrio que puede ser fácilmente desestabilizado con tan solo alterar una de sus piezas, por insignificante que sea. Ejemplos de estas consecuencias en el entorno natural hay muchos, a muy distintos niveles. En el caso que nos ocupa, el de la polinización, el mantenimiento de los polinizadores es crucial para el mantenimiento de las plantas polinizadas. Así, aproximadamente la mitad de los mamíferos de la pluvisilva son murciélagos. Es evidente que su conservación será esencial para el mantenimiento de las selvas tal como las conocemos. En Norteamérica, la destrucción de las cuevas, habitadas en muchos casos por murciélagos como el espeleólogo antes mencionado, tiene claras consecuencias en la subsistencia de los saguaros y otras especies quiropterófilas del desierto. Es decir, cuando la relación planta-polinizador es muy estrecha, la desaparición de uno de los dos traerá como consecuencia la extinción de la otra especie.

Esto, lejos de ser una mera hipótesis, puede que ya haya sucedido en muchos casos. El caso de la orquídea de Madagascar *Angraecum eburneum* es un claro candidato. Por su morfología floral, muy parecida a la de *Angraecum sesquipedale* vista en el apartado 10.2.3.4 pero con un espolón todavía más largo (Figura 10.23), es altamente probable que mantuviera una estrecha relación de polinización con una polilla semejante a la esfinge de Morgan, pero con una espiritrompa todavía más larga. Este tipo de polilla a día de hoy no ha sido descrita. Muy probablemente, porque ya se haya extinguido. En paralelo, se observa cómo las poblaciones naturales de este tipo de orquídea en Madagascar están desapareciendo muy rápidamente, si no lo han hecho ya definitivamente, junto con su probable polinizador. El problema es igualmente importante en el sentido inverso. Si contribuimos a la desaparición de una especie vegetal alógama y polinizada por un vector biótico, estaremos contribuyendo también, a corto o largo plazo, a la desaparición de dicho vector biótico. Y por supuesto, si dicho animal es una presa de la que se alimenta un segundo animal, éste también se verá afectado.

Figura 10.23: *Angraecum eburneum* en invernadero.
Imagen de BotBln, en Wikimedia Commons, bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 Generic (http://creativecommons.org/licenses/by/2.5).

En definitiva, la importancia ecológica de la polinización es tal que es necesario mantener todas las especies, vegetales y animales, involucradas en dicha polinización. No solo para preservar la biodiversidad que dichas especies representan, sino la de todas aquellas especies directa o indirectamente relacionadas, que también se verán afectadas.

10.4. Resumen

Para una polinización efectiva, el polen ha de ser transportado desde la antera hasta el estigma receptor. Por tanto, han de existir medios que propicien este transporte. A estos medios se les denomina vectores de polinización. Un vector de polinización es un agente natural, físico (abiótico) o animal (biótico) capaz de tomar el polen de la antera donante y transportarlo de forma recurrente a los estigmas de las flores adecuadas, es decir, receptivas a ese polen, en las cuales éste pueda germinar. Los principales vectores abióticos son el viento y el agua. Los vectores bióticos son los animales, siendo los principales los insectos. Dentro de ellos, pueden actuar como vectores los escarabajos, las moscas, las avispas y abejas, y las mariposas, tanto diurnas como nocturnas. Además de insectos, aunque con menor relevancia, también pueden actuar como vectores de polinización algunas aves y algunos mamíferos. Dentro de los mamíferos, destacan los murciélagos, aunque también puede haber casos de polinización por parte de roedores y algunos grandes mamíferos.

Las plantas han desarrollado diversas estrategias para valerse de estos vectores. En el caso de los vectores abióticos, las plantas desarrollan estructuras que favorecen la exposición del polen al viento o al agua, y producen polen pequeño, con un alto coeficiente de flotabilidad en el aire, o flores flotantes que sean transportadas por el agua. En el caso de los polinizadores animales, las plantas han de desarrollar además sistemas de atracción (señales) que inviten al animal a acercarse a la flor, y también alguna recompensa (nutritiva o de otro tipo) que el animal pueda aprovechar. De este modo la planta atrae en primera instancia

al animal, y además se garantiza que acuda en próximas ocasiones a este mismo tipo de flores, buscando la recompensa, y captando involuntariamente polen. En casos particulares como el de las abejas, el propio polen puede actuar como recompensa.

Las especializaciones de las plantas para adaptarse a las características anatómicas o a los hábitos de los polinizadores son muy específicas, de modo que las flores que se valen de un mismo tipo de animal polinizador tienen una serie de características comunes. Algunas flores llegan a tan alto grado de especialización que solo pueden ser polinizadas por una determinada especie animal. Del mismo modo, hay animales que solo se alimentan de las recompensas producidas por ciertas flores. En esta estrecha interrelación ecológica, la desaparición de una de las dos partes puede llevar irremisiblemente a la extinción de la otra.

10.5. Información adicional.

- Bärtels A. Plantas Tropicales, Ornamentales y Útiles. Guía de Identificación. Tropenpflazen. Berlín 2002.
- Carthewa, S.M., Goldingay R.L. 1997. Non-flying mammals as pollinators. Trends in Ecology & Evolution, 12(3): 104-108.
- Darwin, C.R. 1981. El Origen de las Especies. Ediciones EDAF. Madrid.
- Gola G., Negri G., Cappeletti C. 1965. Tratado de Botánica. 2ª edición. Editorial Labor S.A., Barcelona.
- Inouye D.W. 1980. The terminology of floral larceny. Ecology, 61:1251-1253.
- Reproduccion sexual - Hipertextos del Área de la Biología (recurso online). http://www.biologia.edu.ar/reproduccion/sexual.htm
- Strassburger E. 1994. Tratado de Botánica. 8ª. edición. Omega, Barcelona.
- Yeo P. 1993. Secondary pollen presentation. Springer, New York, USA.

TEMA 11. Fecundación y embriogénesis

Una vez visto cómo se crean los gametos masculino y femenino, y cómo se transporta el masculino dentro del polen al estigma receptor del aparato reproductor femenino para la formación de un nuevo individuo por vía sexual, únicamente queda la germinación del grano de polen sobre el estigma, el desarrollo del tubo polínico hasta que alcance el saco embrionario, donde se alberga el gameto femenino, y la fecundación de éste por el gameto masculino. Todos estos procesos no necesariamente han de darse de forma ininterrumpida. En algunos casos sí sucede así, como en *Taraxacum kok-saghys*, especie en la que todos estos pasos se dan en tan solo 15 minutos. El extremo opuesto sería *Quercus*, que necesita cerca de 14 meses para lo mismo. De todos modos, lo usual es que transcurran entre 12 y 24 horas desde la polinización hasta la fecundación. A partir de ahí, se formará un nuevo embrión sexual, zigótico, que dará lugar a un nuevo individuo. Todos estos aspectos son los que veremos a lo largo de este tema.

11.1. Germinación

Los granos de polen son trasladados por los vectores de polinización y depositados en el estigma de la flor. Muchos granos llegan al estigma y germinan, pero solo uno de ellos producirá la fecundación de cada óvulo. La función de todos menos uno se verá bloqueada, de uno u otro modo, a lo largo de los procesos de germinación, desarrollo del tubo polínico, y descarga de las células espermátidas. También aquí, en este punto del proceso, es donde se darán, si procede, las reacciones de autoincompatibilidad entre polen y estigma de un mismo individuo que vimos en el tema 9.

En la germinación se suceden secuencialmente una serie de eventos (Figura 11.1). Una vez depositado el polen en el estigma (Figura 11.1A), se da en primer lugar la adhesión del grano de polen a la superficie del estigma (Figura 11.1B). La cubierta del polen forma una especie de base o pie de naturaleza lipoproteica, con el que queda firmemente anclado. Posteriormente, el polen se rehidrata, con lo que se reactiva su metabolismo, y queda en condiciones de iniciar la síntesis del tubo polínico. Entonces, el grano de polen se abre por una de las aperturas, y por ella emerge el tubo polínico (Figura 11.1C). La relación del tubo polínico con la intina no está todavía muy clara. Al microscopio óptico, se ven perfiles que sugieren que al comenzar a crecer, el tubo polínico presiona la capa de intina y la empuja hacia los lados de la apertura, rompiéndola y emergiendo por el agujero que se crea. Sin embargo, en secciones de polen germinando observadas mediante microscopía electrónica de transmisión, la intina se ve formando una lámina continua con la pared del tubo. Es decir, como si creciera en paralelo al crecimiento del tubo. En cualquier caso, la fuerza generadora de tal movimiento proviene de la formación de una gran vacuola en el interior de la célula vegetativa del grano de polen, cuyo continuo crecimiento por incorporación constante de agua proporcionará el impulso necesario para el desarrollo del tubo polínico.

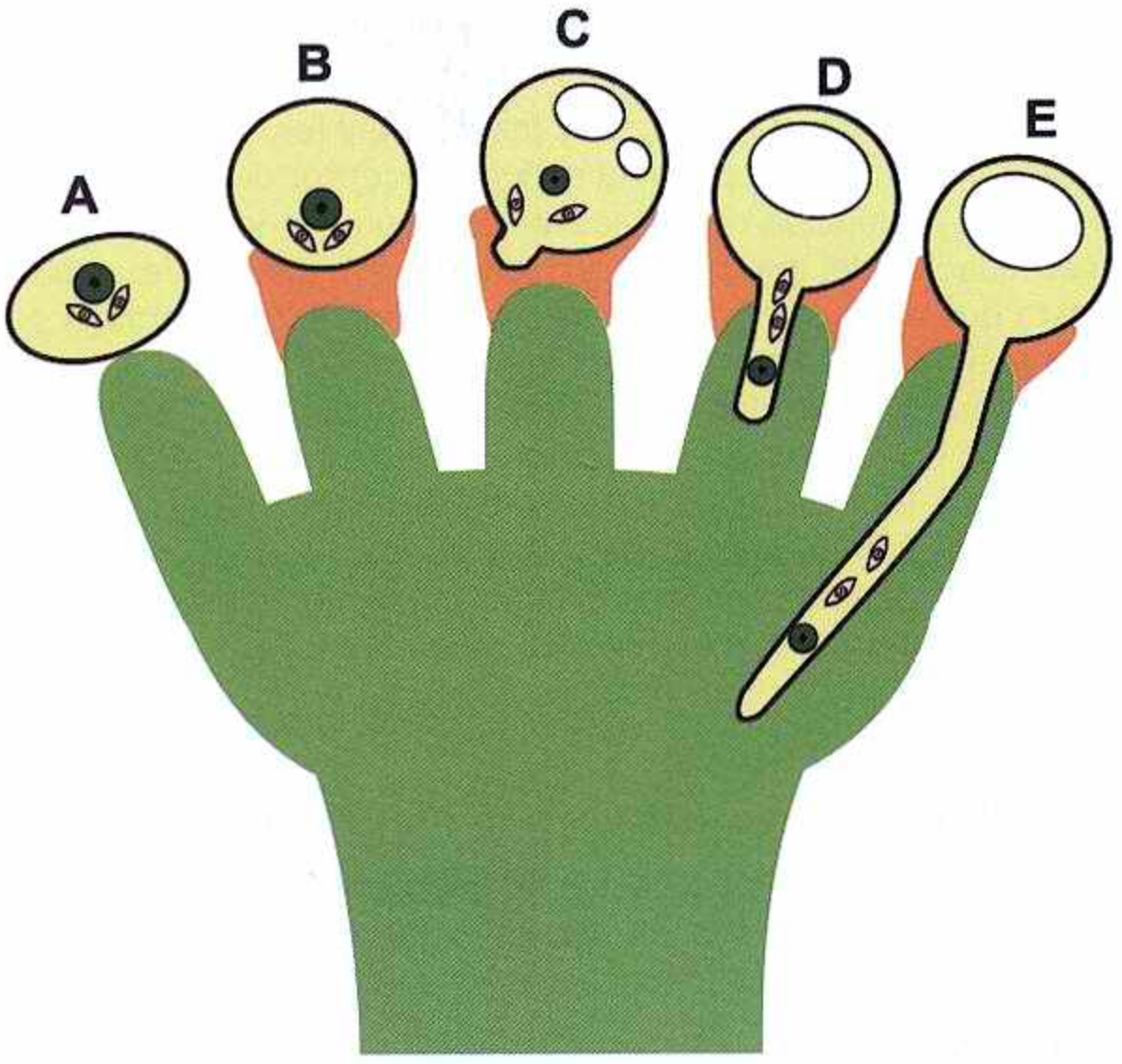


Figura 11.1: Germinación del grano de polen sobre el estigma receptor.
Imagen de Seguí Simarro.

11.2. Emisión del tubo polínico

Una vez germinado el polen, el tubo entra en una fase de crecimiento masivo (Figura 11.2). Penetra en la papila del estigma y se extiende hacia el estilo (Figura 11.1D y E). El tubo crece sobre el tejido transmisor del estigma, sobre las células, entre ellas o a lo largo de las paredes de las mismas. Para poder avanzar a través de las paredes, éstas junto con las láminas medias de pectinas que separan las paredes de células contiguas son disueltas por la acción de celulasas y pectinasas producidas en el extremo del tubo. El tubo polínico crece por alargamiento, esencialmente por un proceso de síntesis de pared celular en el extremo en crecimiento. Hacia dicho extremo se desplazan cisternas del aparato de Golgi que proporcionan un constante y masivo aporte de vesículas

Figura 11.2: Polen de *Brassica napus* emtiendo el tubo polínico.
Imagen de Seguí Simarro.

secretoras. Estas vesículas son guiadas a través de microtúbulos y filamentos de actina polimerizados también en el extremo en crecimiento. Al llegar a la membrana plasmática se funden con ella, aportando membrana junto con su contenido en sustancias pécticas y hemicelulosas formadoras de nueva pared celular. Sin embargo, el componente principal de la pared celular en formación del extremo en crecimiento del tubo es la calosa. Esta sustancia de naturaleza polisacarídica (1-3 ß glucano), al igual que vimos en el caso de las tétradas de microsporas, forma las paredes iniciales ayudando a proporcionar una rigidez a la pared en formación, a la espera de la llegada de los polímeros finales de naturaleza celulósica, hemicelulósica y péctica. La calosa es sintetizada directamente en la cara extracelular de la membrana plasmática por unos enzimas denominados calosa sintasas. Estos enzimas son transportados hasta su lugar funcional por medio de las vesículas antes mencionadas, que las incorporan a su membrana plasmática.

Como vimos en el tema 7, hay algunas especies que dispersan su polen todavía en estado bicelular, sin haberse dividido las espermátidas. En estas especies, las espermátidas se dividen tras la germinación del polen, durante el desarrollo del tubo polínico. Conforme crece el tubo, el citoplasma vegetativo pasa al tubo, impulsado por el crecimiento de la vacuola, y el núcleo vegetativo se posiciona primero, seguido del generativo, que una vez en el tubo, sufre la segunda mitosis del polen. En el caso del polen tricelular, que sufre la segunda mitosis del polen aún en su antera, la migración de los núcleos por el tubo será la misma, solo que las dos espermatidas discurrirán tras el núcleo vegetativo. El hecho de que este núcleo sea el primero en adentrarse en el tubo polínico no es trivial. De hecho, el núcleo vegetativo es el responsable de la expresión de todos los genes implicados en la formación del tubo polínico.

Es fácil suponer que el citoplasma albergado en la célula vegetativa del grano de polen no puede ser suficiente para llenar un tubo polínico que en ocasiones puede llegar a medir centímetros, sobre todo en estilos largos. Para poder avanzar, el propio tubo va formando tapones de calosa tras de sí, que sellan sucesivamente las partes viejas, vacías, por donde ya han pasado los núcleos. Así, el tubo sigue su desarrollo sobre el tejido estilar hasta llegar al óvulo, donde tendrá lugar la descarga de las espermátidas para dar paso a la fecundación.

11.3. La doble fecundación

La doble fecundación es un fenómeno característico de las angiospermas. De hecho, es lo que distingue la fecundación de las angiospermas de la de la mayoría de las gimnospermas, y del resto de vegetales, que presentan una fecundación sencilla. La inmensa mayoría de las gimnospermas no presenta doble fecundación, con dos excepciones conocidas hasta la fecha. En los géneros *Ephedra* y *Gnetum*, ambas gimnospermas, se ha podido observar doble fecundación. Estos dos géneros están filogenéticamente alejados de las angiospermas, por lo que la presencia de este tipo de fecundación no parece estar asociado a la transición gimnospermas-angiospermas. De hecho, se cree más probable que la doble fecundación apareciera de modo independiente en ambos grupos.

Cuando el tubo polínico llega al óvulo, penetra generalmente por el micrópilo (Figura 11.3A), proceso conocido como *porogamia*. En algunos casos excepcionales, el tubo puede penetrar por otros lugares, como los tegumentos (en *Ulmus*), o la chalaza (en *Casuarina*). A este proceso inusual se le denomina *aporogamia*. Una vez dentro del óvulo, el tubo polínico contacta con el saco embrionario (Figura 11.3B) a través del aparato filar de las sinérgidas, lo atraviesa, y luego se forma un poro en el extremo por el que descarga su contenido (los gametos y parte de su citoplasma) en el citoplasma de una de las sinérgidas que flanquean a la célula huevo (Figura 11.3C). El resto del contenido del tubo (el núcleo vegetativo y el citoplasma restante) se desorganiza y acaba siendo reabsorbido.

Una vez descargados, cada uno de los dos gametos masculinos (espermátidas) intervendrá en un proceso distinto e independiente, motivo por el cual a este tipo de fecundación se le denomina doble (Figura 11.3D). Uno de los gametos penetrará en la célula huevo, y se fusionará con ella para seguidamente fusionar su núcleo con el de la célula huevo (*cariogamia*) y dar lugar al zigoto unicelular y diploide, constituido por un genoma haploide paterno y uno materno (Figura 11.3E). El otro núcleo espermático penetrará en la célula central y se fusionará con el núcleo secundario (Figura 11.3E), producto de la fusión de los dos núcleos polares originarios del saco embrionario. Así, se formará un núcleo triploide (generalmente), con dos genomas haploides de origen materno y uno paterno. A este núcleo resultante se le denomina *núcleo primario del endospermo*, y fruto de sucesivas divisiones dará lugar al endospermo, tejido nutricio que rodeará al embrión en formación.

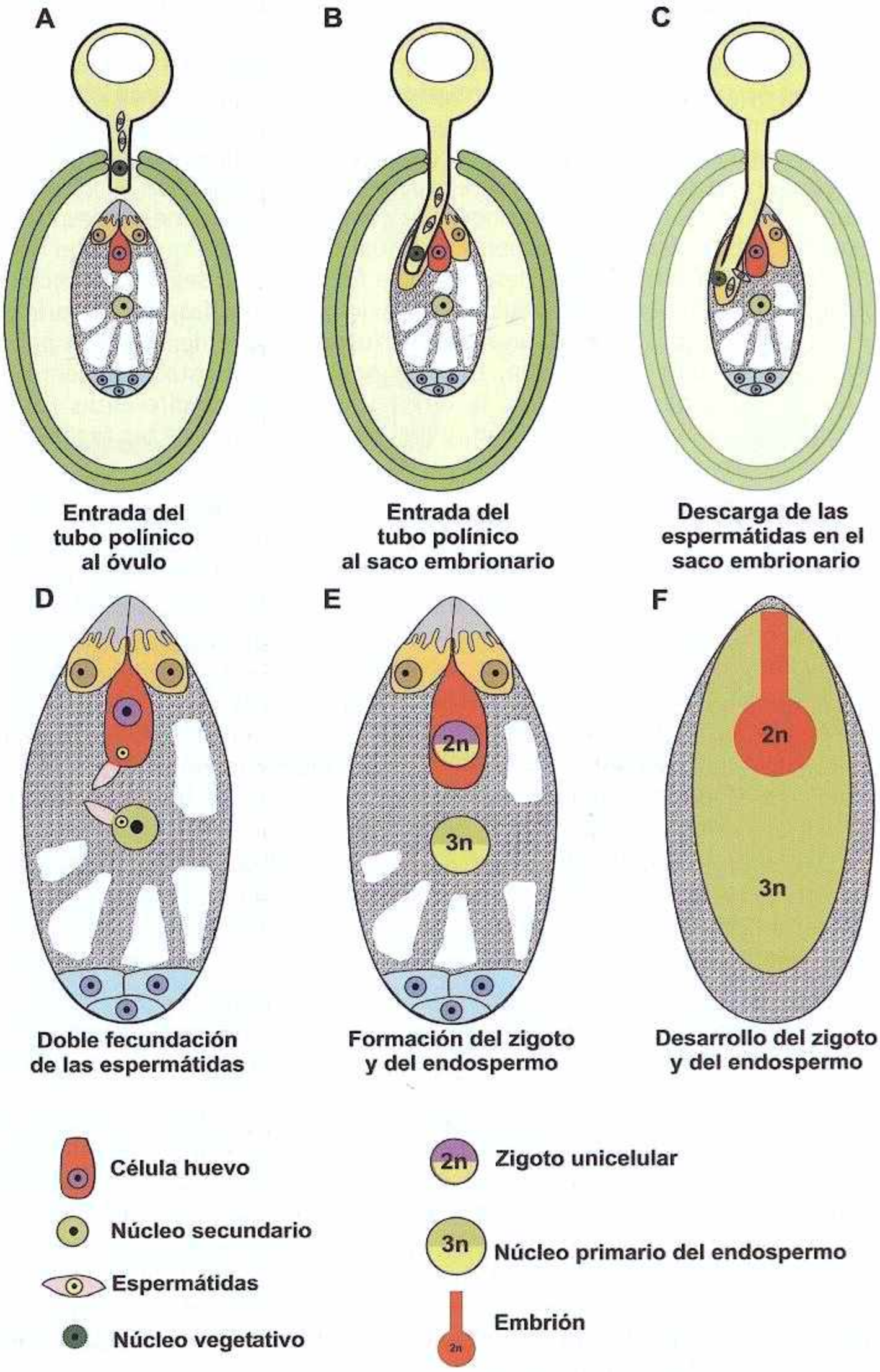


Figura 11.3: La doble fecundación en angiospermas.
Imágenes de Seguí Simarro.

11.4. Embriogénesis en dicotiledóneas

La *embriogénesis sensu stricto* es el proceso de desarrollo por el que una célula huevo fecundada por una espermátida da lugar a un embrión maduro en el seno de un óvulo que a su vez da lugar a una semilla (Figura 11.3F). Debido a la doble fecundación, y a diferencia de las gimnospermas, la embriogénesis en angiospermas se caracteriza por el desarrollo simultáneo del embrión y el endospermo. En realidad, la embriogénesis comienza generalmente después de iniciarse el desarrollo del endospermo, lo cual quiere decir que sucede desde pocas horas hasta varios meses después de la fecundación, según la especie. El proceso global de la embriogénesis puede dividirse en dos fases. En la primera fase sucederían todos aquellos eventos morfogénicos que dan lugar al patrón básico de desarrollo del embrión. Estamos hablando del establecimiento del eje de polaridad basal-apical, de la diferenciación de los diferentes tejidos primarios que conforman el embrión, y del establecimiento de las regiones de crecimiento meristemático.

La segunda fase, que podría considerarse como de crecimiento post-embriogénico, engloba el crecimiento y la maduración de las distintas células que conforman los tejidos, y especialmente de aquellas encargadas del almacenamiento de macromoléculas y sustancias de reserva como aceites, almidón y proteínas, que serán necesarias como fuente de alimento y energía durante la germinación y crecimiento de la futura plántula. Esta fase comprende también un último paso de preparación (deshidratación) del embrión para permanecer latente durante un tiempo variable en espera de la germinación. Por tener menos que ver con el desarrollo del embrión propiamente dicho, veremos esta segunda fase en el próximo tema, cuando veamos cómo se forma la semilla y cuales son sus partes, siendo el embrión una de ellas.

En cuanto a la primera fase, ésta comienza en el saco embrionario una vez fecundada la célula huevo, cuando se funden los núcleos de ambos gametos y se forma la primera célula del nuevo embrión, denominada *zigoto* (o cigoto). En este zigoto unicelular (Figura 11.4A), desde un primer momento comienza a definirse un eje de polaridad que provoca una clara diferenciación entre los dos extremos de la célula, denominados *polo apical* o *chalazal* y *polo basal* o *micropilar* por su proximidad con dichas partes del óvulo. La polarización del zigoto es la base de su posterior desarrollo ontogénico. Esta diferenciación se ve reflejada en el establecimiento de gradientes de factores de crecimiento como las auxinas, esenciales para el desarrollo del embrión, y que comienzan a acumularse en el polo apical. Se cree que el gradiente de auxinas es el que determinará el patrón de división de la primera mitosis del embrión. Así, el zigoto sufre una primera división asimétrica que en la mayoría de angiospermas es transversal. Las siguientes pueden ser transversales, verticales u oblicuas. La primera división del zigoto desemboca en la aparición de dos células (Figura 11.4B), una más pequeña, denominada *célula terminal, apical* o *chalazal* y una más grande, la *célula basal* o *micropilar*, con destinos totalmente diferentes.

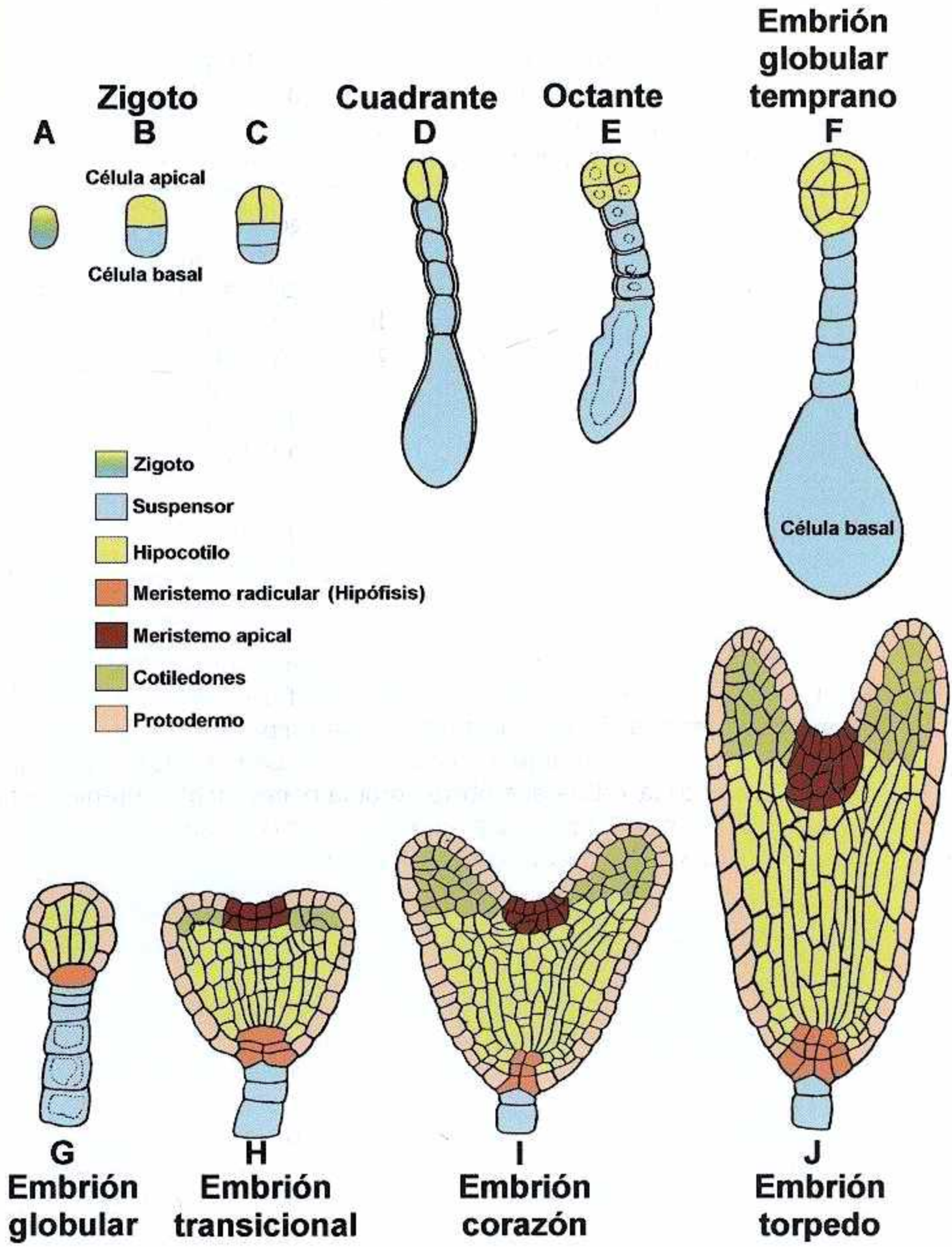


Figura 11.4: Embriogénesis en una dicotiledónea: *Capsella bursa-pastoris*.
Imagen de Seguí Simarro.

A partir de este punto, las dos células resultantes se desarrollarán por vías paralelas pero totalmente independientes. La célula apical será la responsable del desarrollo del embrión propiamente dicho. Será, por tanto, de donde derivará

la mayor parte del crecimiento. En cambio, la célula basal tendrá una función esencialmente vegetativa. La célula basal crecerá y sufrirá una serie de divisiones transversales que darán lugar al *suspensor* (Figuras 11.4C-F), una estructura alargada, generalmente formada por una única columna de células que conectan el embrión con el resto del saco embrionario, y cuyas funciones son la de sustentar al embrión y participar en la transferencia de nutrientes. La célula en contacto con el saco embrionario continuará llamándose basal. Esta célula aumenta mucho de tamaño, genera vacuolas en su interior, y participa en la nutrición del embrión. Conforme el embrión crezca y madure, esta célula acabará desapareciendo. En el extremo opuesto de la columna, la célula en contacto directo con el embrión recibe el nombre de *hipófisis*. Entre la célula basal y la hipófisis se desarrollará el suspensor por divisiones transversales de las células en columna que lo componen. Estas divisiones irán empujando al embrión en formación hacia el interior del saco embrionario (Figura 11.5), hacia el endospermo, tejido nutricio también en formación, y del que dependerá su nutrición cuando alcance un tamaño tal que el aporte del suspensor le sea insuficiente.

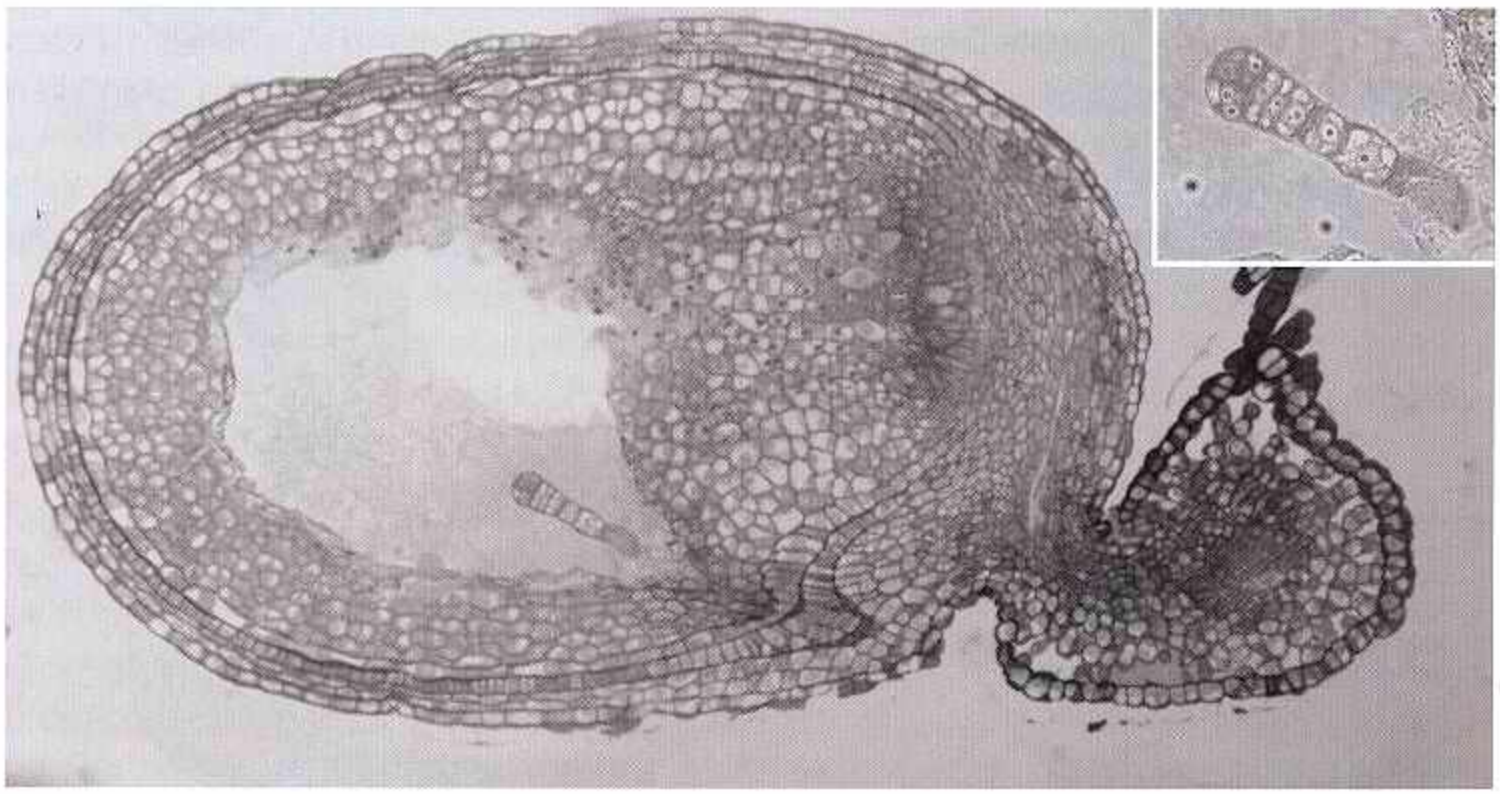


Figura 11.5: Saco embrionario con embrión octante de *Brassica napus* (colza).
Imagen de Patricia Corral Martínez, reproducida con permiso.

A partir de la proliferación de la célula apical se generará el embrión propiamente dicho. La célula apical sufrirá un patrón bien definido de divisiones que harán que el embrión se desarrolle, en sus primeros estadios (cuadrante, octante...), como un conjunto aproximadamente esférico de células pequeñas (Figuras 11.4C-F), de citoplasma denso, indiferenciadas, que aumentan en número de forma exponencial. A esta etapa del desarrollo del embrión se le denomina *embrión globular* (Figuras 11.4F, G y 11.6A). A partir del estadio en el que el embrión globular alcanza aproximadamente 64 células (Figura 11.4G), comienza el

primer evento de diferenciación, la aparición del *protodermo* o *protodermis* a partir de las células superficiales. Bajo el protodermo, se pueden ya distinguir dos dominios celulares, uno superior, apical que dará lugar al meristemo apical y los cotiledones, y uno inferior basal que generará el hipocotilo y el meristemo radicular. En angiospermas, la diferenciación de células provenientes de la hipófisis del suspensor también contribuirá a la formación del ápice radicular. El hecho de que células situadas en zonas distintas del embrión den lugar a tejidos distintos ha llevado a la idea, comprobada experimentalmente, de que el desarrollo de un determinado tejido u órgano del embrión depende de la posición en el embrión de la o las células que lo originan. Seguidamente, las células de estos dos dominios entran en un programa de divisiones continuadas y morfogénesis que darán lugar a los tejidos que acabamos de mencionar. La posición relativa de los meristemos apical y radicular definirá el eje embrionario. A ambos lados del meristemo apical tendrán lugar divisiones laterales localizadas que formarán dos protuberancias que serán los primordios de los futuros cotiledones. Estos fenómenos morfogénicos hacen que embrión cambie radicalmente su patrón de simetría, y experimente una transición (Figura 11.4H) desde lo que era un patrón de simetría radial en su etapa globular, a uno bilateral, que será el que mantenga a lo largo de todo su posterior desarrollo embrionario, y hasta que germine una nueva plántula. En la zona central del embrión comenzará la diferenciación del tejido provascular. El desarrollo de los primordios de los cotiledones proporciona al embrión una morfología cordiforme que da nombre a esta etapa de desarrollo: la del *embrión en forma de corazón* (Figuras 11.4I y 11.6B).

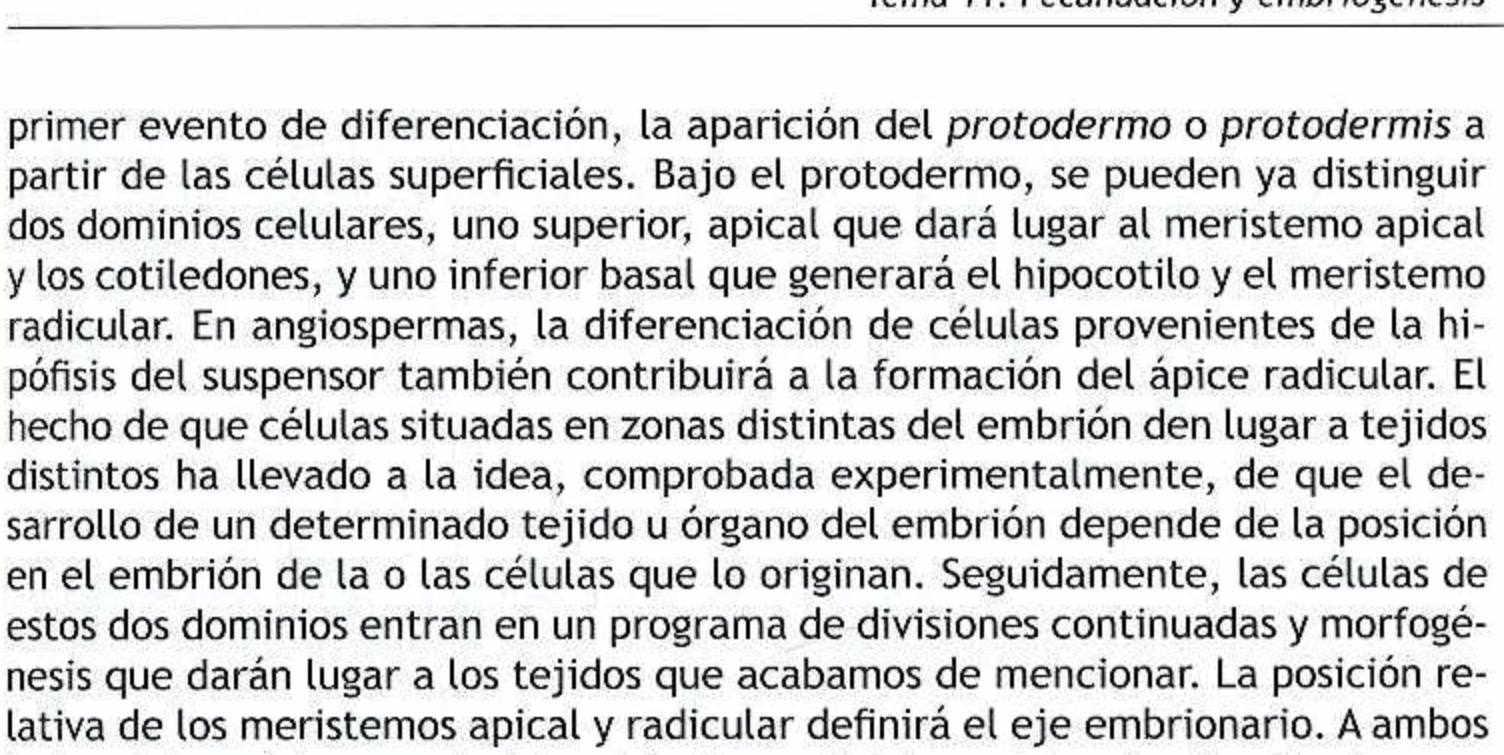


Figura 11.6: Embriogénesis en solanáceas: *Solanum melongena* (berenjena).
Imágenes de Seguí Simarro.

El crecimiento y elongación a lo largo del eje del embrión de la zona situada entre ambos meristemos dará lugar al hipocótilo, y hará que el embrión adopte

una forma alargada, en forma de *torpedo* (Figuras 11.4J y 11.6C). Así se denominan los embriones en esta etapa. Además, en la zona apical las divisiones celulares continúan y se diferencian los cotiledones, lo cual contribuye a la morfología antes mencionada. Una vez diferenciados los cotiledones, al conjunto de éstos junto con el meristemo apical se le denomina *plúmula*. Es decir, la plúmula sería el extremo apical del embrión. En el hipocotilo, una serie de divisiones longitudinales darán lugar al *procambium*, que queda delimitado respecto al meristemo fundamental. Siguiendo este patrón, el embrión sigue creciendo, por elongación del hipocotilo y sobre todo de los cotiledones.

El embrión, denominado *embrión cotiledonar* (Figura 11.6D) en esta etapa, desarrolla unos cotiledones claramente visibles. En muchas especies llega un momento en que los cotiledones alcanzan el polo chalazal del saco embrionario y se curvan al seguir creciendo. En algunos casos pueden llegar a medir más que el resto del embrión. El meristemo apical queda localizado entre estos cotiledones. El procambium formado a lo largo del eje embrionario se extiende ahora a los dos cotiledones. Una vez formado el embrión cotiledonar, éste quedaría listo para entrar en la segunda fase, de maduración, acumulación de sustancias de reserva y desecación, que veremos en el tema 12, junto con el resto de procesos que sufre la semilla.

11.4.1. Control genético y hormonal

Aunque la morfología del embrión vegetal es relativamente simple, la regulación genética que se requiere para ello dista de ser sencilla. Durante el desarrollo embrionario hay un complejo entramado de expresión génica que se pone en marcha. Por ejemplo, se estima que en los embriones de *Nicotiana tabacum* se expresan alrededor de 20.000 genes, un número equivalente al de genes expresados en tejidos adultos y diferenciados para ejercer una función específica, como puedan ser las hojas o las anteras. De entre los genes que más se expresan durante la embriogénesis, desatacan aquellos implicados en la síntesis de proteínas de almacenamiento. Es lógico, puesto que va a tener que acumularse mucho material de reserva para la germinación. Aunque a menor nivel, también existen genes que se expresan de forma diferencial en distintos momento y zonas del embrión a lo largo de todo su desarrollo. De entre ellos podríamos destacar, por su precocidad, aquellos que regulan el establecimiento de la primera polaridad, antes mencionada, en el zigoto unicelular. Otro gen claramente implicado en la proliferación celular y la morfogénesis durante las primeras etapas de la embriogénesis es el gen *BABY BOOM (BBM)*. Se trata de un gen similar a los del tipo *APETALA2*, y cuya expresión se ha detectado preferentemente en semillas y embriones de *Arabidopsis thaliana* y colza (*Brassica napus*). En estas especies, la expresión ectópica de este gen es capaz de hacer que células somáticas, diferenciadas, de plántulas germinadas entren en embriogénesis, y acaben generando embriones ectópicos o estructuras cotiledonares, además de otra serie de efectos pleiotrópicos, colaterales.

En esta regulación génica juegan también un papel crucial como efectores una serie de hormonas vegetales como las auxinas o el ácido abscísico, cada una de ellas en un determinado momento, y para una función determinada. Otras sustancias como los arabinogalactanos y las proteínas de arabinogalactano (AGPs) también tienen un papel relevante en la identidad de los meristemos y el desarrollo de los cotiledones. Aunque cada vez se va sabiendo más de este proceso, y se es capaz de inducir experimentalmente embriogénesis en células distintas al zigoto, como células somáticas (*embriogénesis somática*) o microsporas (*androgénesis*), todavía quedan por determinar los genes que regulan muchos de los mecanismos que gobiernan la entrada en embriogénesis.

11.5. Formación del endospermo

El endospermo es una estructura propia de las angiospermas, que sirve inicialmente para nutrir al embrión. Más tarde, cuando el embrión alcanza cierto tamaño, puede llegar a desaparecer por completo, o bien conservarse en la semilla como tejido de almacenamiento de sustancias de reserva o albumen. La formación del endospermo se inicia antes que la del zigoto, con la entrada en proliferación de la célula madre del endospermo, generalmente triploide por la fusión de un núcleo espermático con el núcleo secundario del saco embrionario, producto a su vez de la fusión de los dos núcleos polares. A partir de este momento inicial, el endospermo crece por divisiones celulares pero también por aumento de tamaño de cada célula (expansión celular). En un primer momento se dan las divisiones, más tarde la diferenciación de cada capa de células y por último la maduración, en la que se acumulan sustancias de reserva para la futura germinación del embrión, como veremos en el Tema 12. La formación del endospermo puede ocurrir a través de tres mecanismos, que dan lugar a tres tipos de endospermo diferentes, el de tipo *nuclear*, el de tipo *celular*, y el de tipo *helobial*.

11.5.1. Endospermo nuclear

En el de tipo nuclear o sincitial, las divisiones (cariocinésis) que sufre el núcleo secundario fecundado, triploide (núcleo de la célula madre del endospermo) están desacopladas de las divisiones del citoplasma (citocinésis). De este modo, este núcleo de la zona central del saco embrionario sufre un número variable de divisiones exclusivamente nucleares que dan lugar a numerosos núcleos (entre 8 y 2000) en un mismo citoplasma, formando una estructura que se conoce como *cenocito*, algo parecido a lo que vimos que ocurría con las divisiones meióticas antes de tabicarse la tetrada en la microsporogénesis. Al igual que en ese caso, en la formación del endospermo nuclear, las paredes celulares se formarán después, todas a la vez. En paralelo, el citoplasma se vacuoliza, apareciendo una gran vacuola que desplaza los núcleos hacia la periferia. Este tipo de endospermo es el que se da por ejemplo en géneros como *Malva*, *Malus*, o crucíferas como *Capsella*, *Arabidopsis* o *Brassica*.

11.5.2. Endospermo celular

En el endospermo de tipo celular, desde el principio cada división nuclear es seguida de la correspondiente formación de paredes celulares en el citoplasma. Sería, pues, un mecanismo semejante al que sucede en las divisiones convencionales de las células somáticas. Se da, por ejemplo, en especies del género *Senecio* o *Villarsia*.

11.5.3. Endospermo helobial

El endospermo de tipo helobial podría definirse como una combinación de los dos tipos vistos hasta ahora. Así, la primera división de la célula madre del endospermo es transversal, aunque asimétrica. Se forman dos células de tamaño muy diferente: una célula pequeña, denominada chalazal, y una grande denominada micropilar. En la chalazal, se dan al principio unas pocas divisiones nucleares libres, desacopladas de la citocinesis. Posteriormente, el contenido del citoplasma común empieza a disminuir, y los núcleos a degenerar. Por su lado, la célula micropilar sufre numerosas divisiones nucleares libres, también desacopladas de la citocinesis. Posteriormente se formarán paredes celulares entre núcleos contiguos de forma simultánea, en un mecanismo de citocinesis semejante al del endospermo nuclear. Este mecanismo no es muy frecuente, y se ha descrito en el orden de las Helobiales (monocotiledóneas), que dan nombre a este tipo de endospermo.

11.6. Embriogénesis en monocotiledóneas

Durante la embriogénesis en monocotiledóneas, como arroz o maíz, los mecanismos fundamentales que rigen la determinación de los patrones de desarrollo y la diferenciación de los distintos órganos hasta donde se sabe son los mismos que en dicotiledóneas. Hasta la etapa de octante, ambos tipos de embriones parecen ser morfológicamente idénticos, y situados de forma semejante dentro del saco embrionario (Figura 11.7A). Sin embargo, hay una serie de diferencias, sobre todo morfológicas, entre uno y otro tipo de desarrollo embriogénico (comparar figura 11.6D con 11.7B y 11.8). Muchos de los tipos de tejidos y órganos que desarrolla el embrión de las monocotiledóneas no están claramente ordenados siguiendo una simetría radial o bilateral a lo largo del eje basal-apical, como sucede en las dicotiledóneas. En monocotiledóneas el patrón de simetría (radial o bilateral) se pierde durante la etapa de transición, al desarrollarse un solo cotiledón. Así, el cotiledón único se desarrolla en un lateral del extremo apical (Figuras 11.7B y 11.8A), y el meristemo apical (*plúmula*, Figuras 11.7C y 11.8B), en forma de hendidura, queda desplazado hacia el otro lateral del embrión. Según algunos investigadores, la posición lateral del meristemo sería tan solo una consecuencia del desplazamiento que provoca el crecimiento apical masivo del cotiledón, que se diferencia antes que las otras partes del embrión.

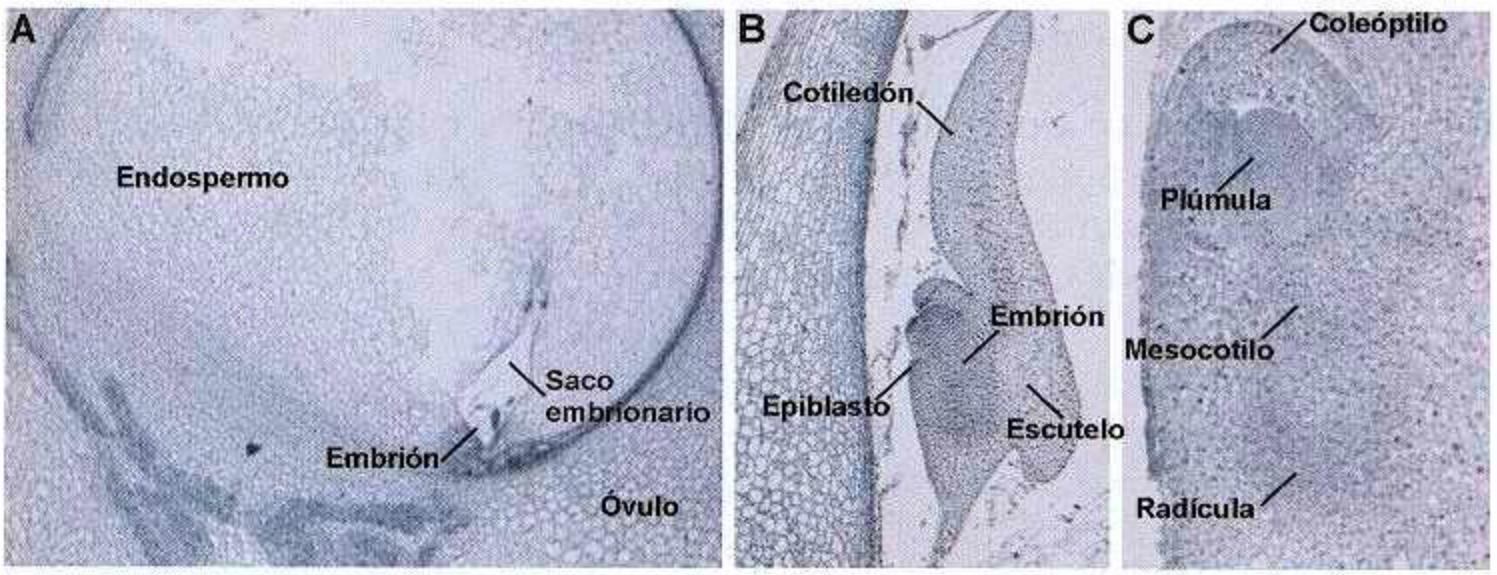
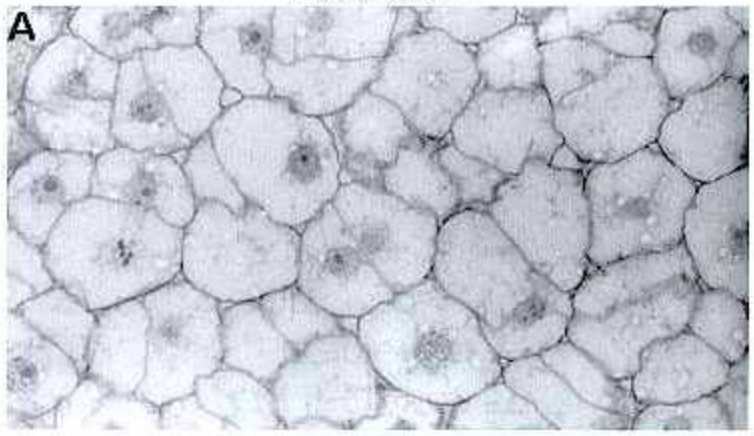


Figura 11.7: Embriogénesis en una monocotiledónea: *Zea mays* (maíz). A: Óvulo fecundado, con las primeras divisiones del embrión en el saco embrionario. B: Embrión joven. C: Detalle del embrión.
Imágenes del portal web *A Photo Laboratory Study of Plant anatomy*
(http://web.itctel.com/plantanatomy/index.htm),
reproducidas con autorización del Prof. Gerald A. Myers.

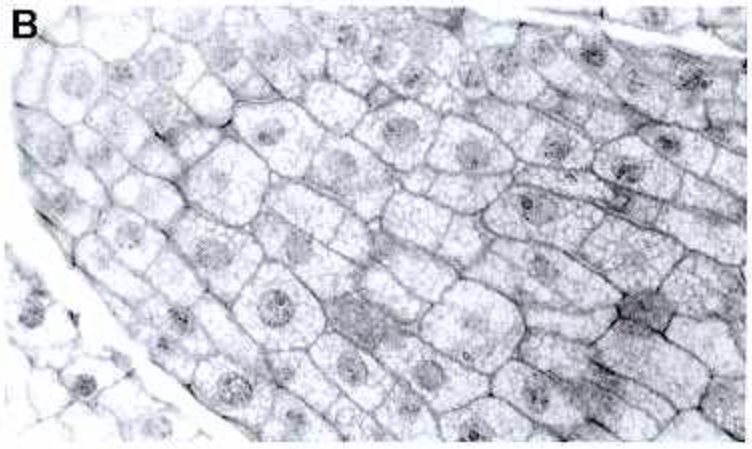
Además, en el embrión de monocotiledóneas hay otra serie de diferencias significativas. Por ejemplo la presencia del *escutelo*. El escutelo es una estructura en forma de escudo (de ahí su nombre) que separa el embrión del endospermo. Es considerado por algunos científicos como una especie de cotiledón vestigial, transformado. En el caso de muchas monocotiledóneas, el endospermo acumula gran cantidad de sustancias de reserva, y el escutelo es el encargado de movilizarlas, segregando enzimas que las hidrolizan, absorberlas y transportarlas al embrión. En cereales como avena el escutelo es alargado y penetra en el endospermo, invadiéndolo. Este tipo de embriones presentan otra estructura característica denominada *epiblasto* (Figura 11.7B). Se trata de un apéndice en forma de escama, en posición opuesta a la del escutelo, y cuya interpretación es más controvertida. Hay quien opina que sería éste el vestigio de un supuesto cotiledón primitivo, o bien la vaina del cotiledón, y hay también quien cree que sería una extensión de la coleorriza. En algunas gramíneas está ausente.

Otra diferencia es la presencia de estructuras de protección para los meristemos apical y radicular. La plúmula en embriones de monocotiledóneas viene recubierta por una estructura en forma de vaina, cerrada, denominada coleóptilo (Figura 11.7C). Pese a estar cerrada, en el momento de la germinación abrirá un orificio por donde podrá emerger la plúmula. Aunque hay diversas interpretaciones, la más común es que es la primera hoja de la futura planta. En el extremo opuesto del eje embrionario se situaría la radícula, o *primordio radicular* (Figuras 11.7C y 11.8D), y sobre ella la *coleorriza*, una vaina que envuelve la radícula. En embriones jóvenes es continua con el suspensor. Se cree que la coleorriza podría ser una suerte de raíz primaria, que degenera y queda vestigial. Al germinar el embrión, se desgarra y es traspasada por la radícula. Puesto que la coleorriza se asocia con la raíz primaria, el primordio radical sería el precursor de la primera raíz adventicia.

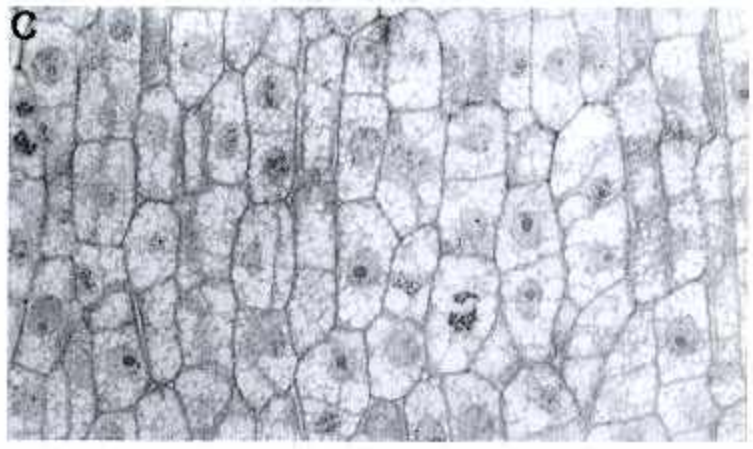
Cotiledón



Meristemo apical



Mesocotilo



Meristemo radicular

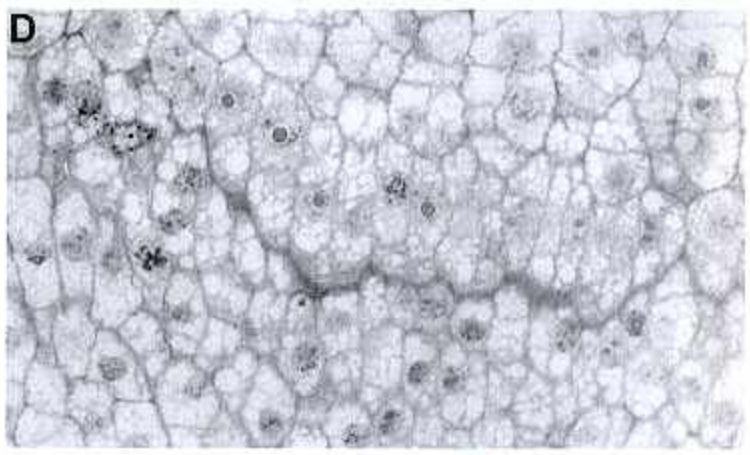


Figura 11.8: Embrión maduro de maíz.
Imagen de Seguí Simarro.

Vemos pues que el embrión monocotiledonar presenta un ordenamiento algo más complejo. Esto claramente indica una serie de diferencias en cuanto a los patrones de desarrollo y diferenciación de cada tipo. Por ejemplo, en un embrión de dicotiledóneas, todas sus partes a excepción del suspensor desarrollarán su correspondiente órgano en la planta germinada y la adulta. El meristemo apical continuará siéndolo en la planta germinada. La radícula dará lugar a la raíz, el hipocotilo al tallo, etc. Es decir, solo el suspensor es un órgano exclusivo del embrión, que desaparece en la planta adulta. Esto también es así en los embriones de monocotiledóneas, en los que el meristemo apical, el radicular, el coleoptilo o la radícula tienen su correspondencia con partes concretas de la planta adulta. Pero además, existen otras partes como el *escutelo* o el *epiblasto*, que son específicas del embrión monocotiledonar, y desaparecen en la planta germinada. Por tanto, es de suponer que estas partes adicionales requerirán de un patrón más complejo de regionalización de la diferenciación de los distintos órganos durante los primeros estadios de la embriogénesis en monocotiledóneas. Una serie de genes homeóticos del tipo homeobox, como los *KNOX*, controlan, al menos en parte, este complejo proceso.

11.7. Embriogénesis en gimnospermas

La secuencia del desarrollo del embrión de gimnospermas puede dividirse en tres fases principales: (1) la proembriogénesis, (2) la embriogénesis temprana, y (3) la embriogénesis tardía.

11.7.1. Proembriogénesis

La proembriogénesis comprende todas aquellas etapas previas a la elongación del suspensor. Se pueden distinguir hasta cuatro tipos distintos de proembriogénesis en gimnospermas. De ellos, el que acontece en las coníferas es el más común, y se interpreta como el plan basal para la proembriogénesis de cualquier otra gimnosperma. Por ello veremos la embriogénesis en una conífera modelo como *Pinus*. En ella, el tubo polínico crece muy lentamente, abriéndose paso a través de la nucela del óvulo. Al llegar al gametófito femenino, avanza hasta el cuello del arquegonio, penetra en la célula huevo y descarga en ella sus gametos. En ese momento comienza la fecundación. El núcleo de uno de los gametos se funde con el de la célula huevo. El otro gameto masculino degenera, al igual que el núcleo vegetativo y que las demás células del arquegonio.

A partir de aquí, el zigoto de gimnospermas sufre dos rondas de divisiones nucleares desacopladas de la citocinésis, dando lugar a cuatro núcleos cenocíticos. Éstos penetran al fondo de la célula, donde se disponen en el mismo plano. A esta estructura se le denomina *proembrión cenocítico*. Allí, los cuatro núcleos se dividen de nuevo dando lugar a dos capas de células, una *capa primaria embrionaria*, inferior, cuya mitosis es completa (cariocinesis + citocinesis), y una *capa primaria superior*, que no tabica. Ambas capas vuelven a dividirse, dando lugar a un total de cuatro capas o estratos de cuatro células cada uno. Los

cuatro núcleos del estrato superior, no tabicados, degeneran y mueren. El segundo estrato de cuatro células constituye la *roseta*, que desarrolla una pared gruesa (*placa basal*) que lo separa del primer estrato. El tercer estrato celular forma el suspensor. El cuarto estrato es el que formará el embrión.

11.7.2. Embriogénesis temprana

La embriogénesis temprana incluye las etapas que transcurren entre la elongación del suspensor y el establecimiento del meristemo radicular. Por tanto, comenzará en el momento en que las células del tercer estrato (*células tubulares*) comienzan a elongarse notablemente y empujan al cuarto estrato hacia el interior del prótalo, cuyas células están llenas de sustancias de reserva. Al tiempo, cada una de las cuatro células del cuarto estrato formará un embrión independiente. Es lo que se conoce como *poliembrionía homocigótica*, por provenir los cuatro embriones de divisiones de células apicales distintas pero provenientes del mismo zigoto. Sin embargo, solo un embrión se acabará desarrollándose, y los otros tres degeneran por un proceso de muerte programada y pronto desaparecen. En el embrión temprano superviviente se dispara un proceso de proliferación celular, dando lugar a una masa embrionaria indiferenciada. Las divisiones son tanto longitudinales como transversales, lo cual previene la formación de un protodermo como el visto en dicotiledóneas. Las células basales de esta masa se elongan y se dividen principalmente en el plano transversal, lo cual contribuye a un crecimiento aún mayor del suspensor.

11.7.3. Embriogénesis tardía

La embriogénesis tardía (Figura 11.9) es un periodo principalmente de histogénesis y organogénesis que comprende el establecimiento de los meristemos radicular y apical, y el posterior desarrollo y maduración del embrión. Lo primero

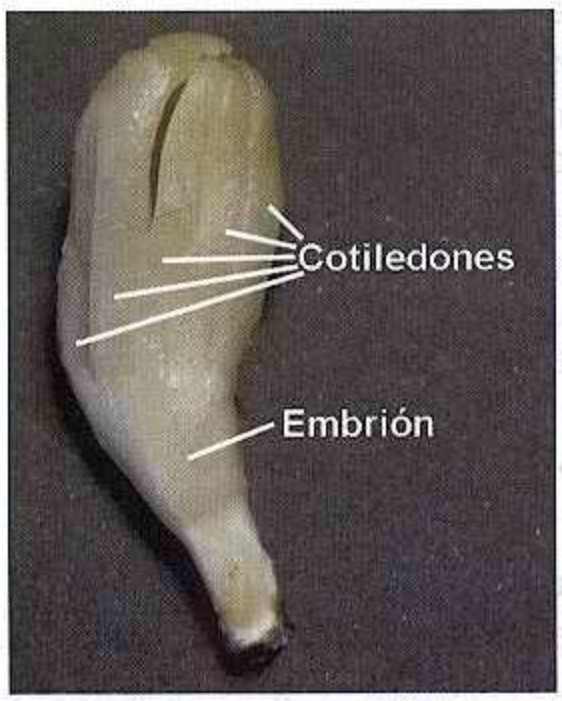


Figura 11.9: Embrión maduro de *Pinus*.
Imagen de Seguí Simarro.

que se desarrolla en el embrión de gimnospermas son los polos radicular y caulinar, lo cual establece desde un primer momento el eje embrionario. El meristemo radicular se forma en torno al centro del embrión, mientras que el apical se forma en la zona más distal de la masa embrionaria, y en una zona de ésta relativamente superficial, comparada con la zona del meristemo radicular. En esta etapa se diferencian también los tejidos vasculares y corticales. Por último se inician los cotiledones por encima del eje embrionario, formando una corona alrededor del meristemo apical. Los cotiledones aparecen en un número variable, entre 2 y 18 según la especie. Por ejemplo, dos en *Ginkgo* y ocho en *Pinus* (Figura 11.9). Alrededor de dos años después de la floración, las semillas son liberadas. Es en este momento cuando finaliza la maduración del embrión de *Pinus*.

11.8. Resumen

En este tema hemos abordado los pasos más importantes en la formación de un nuevo individuo por vía sexual: la fecundación y el desarrollo del nuevo embrión zigótico. En angiospermas, previo a la fecundación, el polen depositado en el estigma ha de germinar y emitir su tubo polínico, por el cual viajarán las espermátidas hasta el saco embrionario. Una vez allí, una espermátida se funde con la célula huevo, formando un zigoto unicelular diploide. La otra espermátida se fundirá con el núcleo secundario del saco embrionario, procedente de la fusión de los dos núcleos polares. De este modo se formará un producto triploide, cuyo desarrollo dará lugar al endospermo, el tejido nutricio encargado de proveer de alimento al menos durante las primeras etapas del embrión en desarrollo.

El desarrollo del embrión de las angiospermas es algo diferente en monocotiledóneas y dicotiledóneas, fundamentalmente debido a su principal hecho diferencial, la presencia de uno o dos cotiledones, respectivamente. En dicotiledóneas, el embrión se desarrolla en el extremo de un suspensor. En las primeras etapas el embrión adopta una morfología globular. Posteriormente comienza a desarrollar los primordios de sus dos cotiledones, lo cual provoca que pase de la simetría radial del embrión globular a la bilateral del embrión en forma de corazón y etapas posteriores. Entre ambos cotiledones aparecerá el meristemo apical, y en extremo opuesto del eje surgirá el meristemo radicular. Las etapas posteriores (embrión torpedo y cotiledonar) implican una elongación del embrión a lo largo de su eje, un crecimiento de los cotiledones, una diferenciación de los tejidos internos del embrión, y el inicio de la síntesis y almacenamiento de sustancias de reserva. En ciertas especies, el papel como almacén de reservas de los cotiledones es muy relevante. En paralelo, el endospermo continúa su desarrollo y la acumulación de reservas para la germinación.

En monocotiledóneas, aunque las primeras etapas del desarrollo son semejantes, en el momento en que empieza a desarrollarse el cotiledón único de las monocotiledóneas, este adquiere tal preponderancia que desplaza hacia un lateral las estructuras de la parte apical del embrión. Se forman también

otras estructuras exclusivas del desarrollo embrionario como el escutelo o el epiblasto.

En el caso de las gimnospermas, la fecundación y la embriogénesis presentan una serie de particularidades muy significativas con respecto a las angiospermas. Uno de los principales es la duración, mucho más larga, y otro es el tipo de fecundación, no doble como las angiospermas, sino sencilla, sin formación de endospermo secundario. La embriogénesis parte de un embrión cenocítico y pasa por la formación de cuatro embriones (poliembrionía homozigótica) de los cuales finalmente subsistirá uno.

11.9. Información adicional

- Boutilier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C.-M., van Lammeren A.A.M., Miki B.L.A., Custers J.B.M., van Lookeren Campagne M.M. 2002 Ectopic expression of BABYBOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. The Plant Cell, 14: 1737-1749.
- Cairney J., Pullman G.S. 2007. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. New Phytologist, 176(3):511-36.
- Gola G., Negri G., Cappeletti, C. 1965. Tratado de Botánica. 2da. edición. Editorial Labor S.A., Barcelona.
- Howell, S.H. 1998. Molecular Genetics of Plant Development. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ito M., Sato Y., Matsuoka M. 2002. Involvement of homeobox genes in early body plan of monocot. International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology. 218: 1-35.
- Jet Aw S., Hamamura Y., Chen Z., Schnittger A., Berger F. 2010. Sperm entry is sufficient to trigger division of the central cell but the paternal genome is required for endosperm development in Arabidopsis. Development, 137:2683-2690.
- Lau S., Ehrismann J.S., Schlereth A., Takada S., Mayer U., Jurgens G. 2010. Cell-cell communication in Arabidopsis early embryogenesis. European Journal of Cell Biology, 89:225-230.
- Liu C.M., Xu Z., Chua N.H. 1993. Auxin Polar Transport Is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. The Plant Cell, 5(6):621-630.
- Myers G.A., A Photo Laboratory Study of Plant Anatomy (recurso online). http://web.itctel.com/plantanatomy/index.htm
- Nakajima K., Uchiumi T., Okamoto T. 2010. Positional relationship between the gamete fusion site and the first division plane in the rice zygote. Journal of Experimental Botany, 61 (11):3101-3105

- Raghavan V., Sharma, K.K. Zygotic 1995. Embryogenesis in Gymnosperms and Angiosperms. En Thorpe T.A. (ed) In vitro embryogenesis in plants Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp 73-116.
- Reproduccion sexual - Hipertextos del Área de la Biología (recurso online). http://www.biologia.edu.ar/reproduccion/sexual.htm
- Souter M, Lindsey K. 2000. Polarity and signalling in plant embryogenesis. Journal of Experimental Botany, 51: 971-983.
- Steer M.W., Steer J.M. 1989. Pollen tube tip growth. The New Phytologist 111: 323-358.
- Strassburger E. 1994. Tratado de Botánica. 8ª edición. Omega, Barcelona.
- Suárez M.F., Bozhkov P.V. 2008. Plant embryogenesis. Totowa, NJ: Humana Press.
- Tykarska T. 1976. Rape Embryogenesis; I: The proembryo development. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 45: 3-16.
- Tykarska T. 1979. Rape Embryogenesis; II: Development of embryo proper. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 48: 391-421.
- Tykarska T. 1980. Rape Embryogenesis; III: Embryo development in time. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 49: 369-385.
- West M., Harada J.J. 1993. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. The Plant Cell, 5(10): 1361-1369.
- Zhong J., Ren Y.J., Yu M., Ma T.F., Zhang X.L., Zhao J. 2010. Roles of arabinogalactan proteins in cotyledon formation and cell wall deposition during embryo development of Arabidopsis. Protoplasma. DOI: 10.1007/s00709-010-0204-y.
- Zimmermann R., Werr W. 2005. Pattern formation in the monocot embryo as revealed by NAM and CUC3 orthologues from *Zea mays* L. Plant Molecular Biology, 58(5):669-685.

TEMA 12. La semilla

Según Font Quer (1975), la semilla es *el conjunto formado por el embrión en estado latente, acompañado por sustancias de reserva y protegido por un tegumento*. Podríamos también definir la semilla de un modo más breve, y atendiendo a su origen, como un óvulo transformado y maduro, después de la fecundación. De manera más sencilla, aunque menos rigurosa, podríamos decir que la semilla es el "envoltorio" del embrión vegetal. Un envoltorio que le proporciona alimento y protección.

En cualquier caso, la semilla es el carácter distintivo de las espermatofitas, que engloba tanto a gimnospermas como a angiospermas. En estas plantas, la semilla desempeña un papel fundamental en la reproducción sexual, a la hora de compensar el hecho de que las plantas sean seres estáticos, sésiles. Esta característica de las plantas les supondría serios inconvenientes para propagarse, colonizar nuevos hábitats y perpetuarse como especies. Así, las plantas se aseguran su dispersión con la aparición de las semillas, estructuras capaces de transportar un embrión a lugares distintos de donde fue creado, a veces muy alejados, y en condiciones que posibilitan su germinación en el lugar de destino, dando así lugar a una nueva planta. Las distintas especies abordan el objetivo de la dispersión con estrategias diferentes. Unas producen gran cantidad de semillas de pequeño tamaño, otras producen pocas pero muy grandes, y otras desarrollan cubiertas muy resistentes, o duras que se van ablandando con las lluvias y el frío invernal para germinar. Su papel transportador también tiene relevancia desde el punto de vista de la genética, pues supone un vehículo de diseminación de la información genética, y por tanto de favorecimiento del flujo génico.

Su función como vehículo es una de las más importantes de la semilla. Sin embargo, no es la única. Una semilla debe llegar al lugar de germinación con el embrión en un estado óptimo para la germinación. Debe por tanto nutrirlo y protegerlo de las agresiones externas (daño mecánico, ataques de patógenos, desecación, etc.). Para ello desarrolla una cubierta protectora, como veremos más adelante. Dado que el transporte de la semilla no tiene una duración fija, la semilla debe servir también como mecanismo retardante de la germinación, permitiendo suspender el crecimiento si las condiciones no son favorables, o dar el tiempo necesario para su dispersión. Y por último, cuando llegan al lugar adecuado y en el momento adecuado, las semillas deben asegurar un aporte de nutrientes suficiente para los primeros estadios del desarrollo de la plántula recién germinada, hasta que ésta desarrolle sus propios órganos (raíces y hojas verdes, principalmente) y sea capaz de valerse por si misma. La semilla tiene, por tanto, una triple función diseminadora, protectora y nutritiva del embrión.

Además. La semilla tiene una gran importancia desde el punto de vista comercial, aplicado sobre todo a la alimentación humana. Las semillas son una parte esencial de la alimentación del ser humano, bien consumidas como tales, como en el caso del arroz (Figura 12.1A), las legumbres, los cereales o los frutos

secos, o bien procesadas para elaborar alimentos como el pan, las tortas de maíz o trigo o el chocolate, especias como la mostaza (Figura 12.1B), bebidas como el café (Figura 12.1C), la cerveza o el chocolate líquido o aceites como el de girasol, colza u oliva, entre otras. Más allá de la alimentación, tienen también relevancia como fuente de medicamentos, o de materias primas para industrias como la textil (fibras de algodón) o la química (aceites industriales, de jojoba, por ejemplo). Es por todo ello que la producción de semillas para consumo humano o procesado industrial tiene una gran importancia económica en la actualidad.

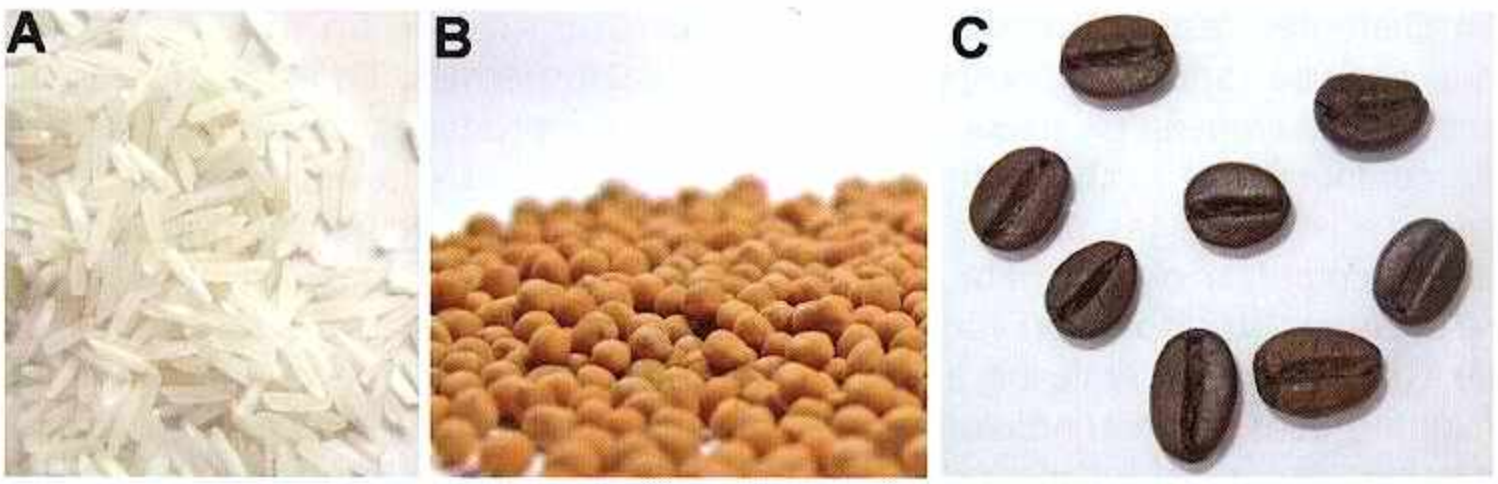


Figura 12.1: Semillas de interés alimentario: arroz (A), mostaza (B) y café (C).
Imágenes de Lazysheep1 (A), Tijmen van Dobbenburgh (B) y Niki Michailov (C), en www.stock.xchng.hu, bajo licencia SXU.

12.1. Morfología externa de la semilla

Las semillas de las distintas especies vegetales destacan por su enorme abanico de formas, tamaños y colores (Figuras 12.1, 12.2, 12.3 y 12.4). Podemos encontrar desde semillas de forma típicamente esférica, aplanada o alargada, hasta otras formas de lo más variopintas

El tamaño también es sumamente variable, desde las semillas de pocos milímetros de la albahaca (*Ocimum basilicum*, Figura 12.3A) o las de las amapolas u orquídeas (Figura 12.3B), apenas visibles a simple vista y con pesos de unos pocos miligramos, hasta las semillas de algunas palmeras como el cocotero, del tamaño de una pelota de balonmano, o las semillas de la nuez de Seychelles o coco de mar (*Lodoicea maldivica*, Figura 12.4), conocida también vulgarmente por su forma y color como "culo de negra", y contenidas en enormes frutos uniseminados de hasta 20 kilos de peso.

También su coloración es variadísima. Las células de los tegumentos poseen diversos pigmentos que le dan a cada una su color característico. Los colores marronáceos o negro son los más comunes, estando presentes en cerca del 50% de las semillas (Fivgura 12.2). Las tonalidades rojas, blancas y amarillas son menos frecuentes, y sirven como medio de atracción para los animales que se usen como vectores de diseminación. Su superficie puede ser lisa o bien presentar ornamentaciones muy variadas, y generalmente relacionadas con el tipo de vector que se encargue de su diseminación.

Figura 12.2: Diversidad de formas, tamaños y colores de las semillas.
Imágenes de Carlos Paes, Zsuzsanna Kilianen, Hannah Chapman, Lars Sundström, James Knowles, Ali Taylor, Bruno Neves y Redster, en www.stock.xchng.hu, bajo licencia SXU.

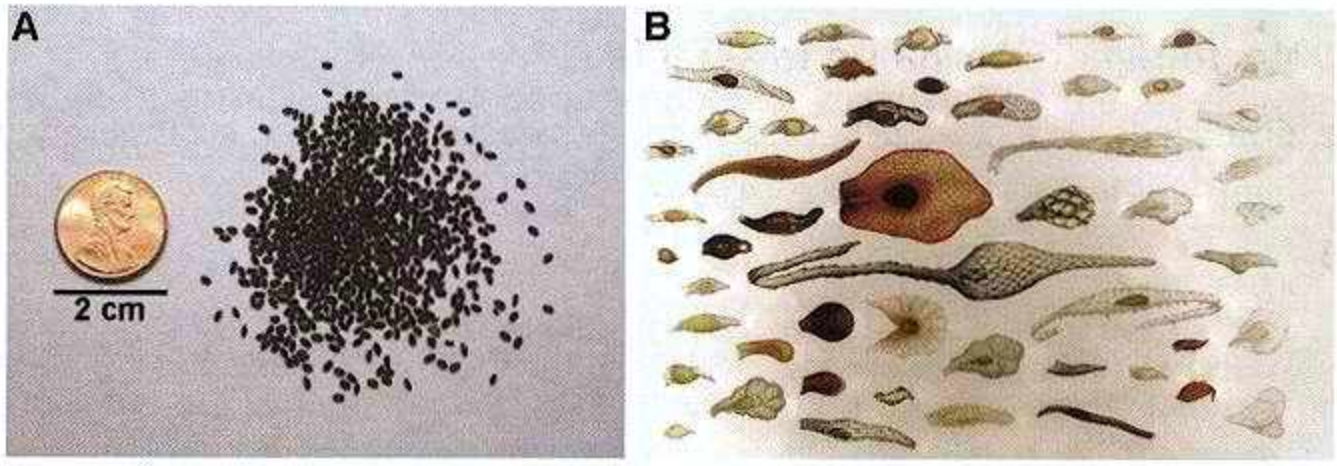


Figura 12.3: Semillas de (A) albahaca (*Ocimum basilicum*), y (B) orquídeas.
Imágenes (A) de Badagnani bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported, y (B) de J.G. Beer, de dominio público, ambas en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

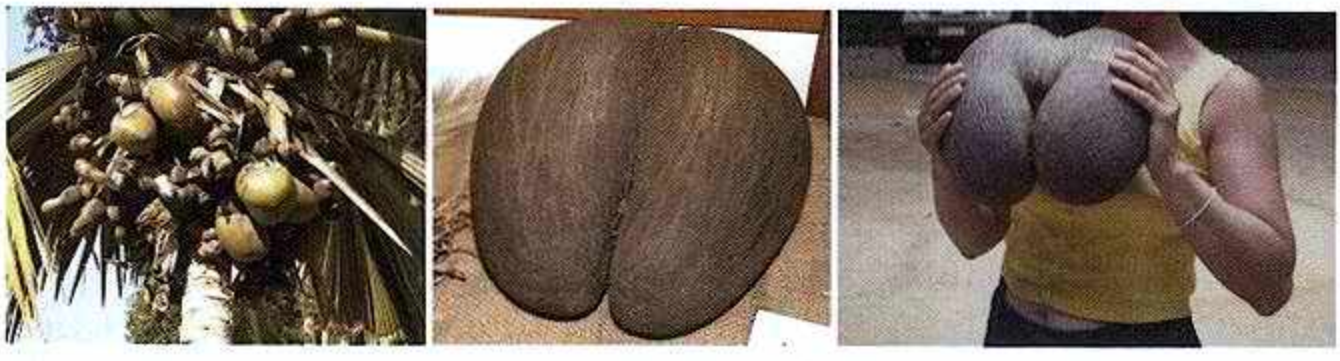


Figura 12.4: *Lodoicea maldivica*.
Imágenes de Wouter Hagens y Karel Jakubec de dominio público, y de Jerzy Strzelecki bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported, todas en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

Todas estas combinaciones posibles de formas, tamaños, colores y superficies no se dan al azar. Tienen una clara función relacionada con la estrategia utilizada por la especie para su propagación. Así, hay especies que optan por la producción de semillas pequeñas pero en gran cantidad. Al ser pequeñas, requieren poca energía para su creación, lo cual permite a la planta producir muchas. Al ser pequeñas, son fáciles de diseminar a nuevos hábitats, por ejemplo, por el viento. Sin embargo, tienen muy pocas reservas para la germinación, lo cual hará que la tasa de germinación sea muy baja. Es decir, estas especies aseguran su perpetuación en base a la cantidad de semilla producida, a costa de una baja tasa de viabilidad. Por el contrario, hay especies que producen semillas muy grandes y muy escasas en número. Estas semillas requieren mucha energía para su creación, por lo que la planta solo puede invertir recursos en la producción de muy pocas de ellas. Además, por su elevado peso son muy difíciles de diseminar, cayendo siempre muy cerca de la planta (árbol generalmente) que las generó. Por contra, estas semillas tienen muchísimas reservas para germinar. Aseguran la supervivencia gracias a esas reservas, que permiten una altísima tasa de germinación, y permiten a la plántula ser autónoma hasta que alcance cierto tamaño crítico.

Las ventajas adaptativas de las semillas grandes frente a las semillas pequeñas tienen una estrecha relación con el ambiente en el que se desarrollan. Por ejemplo, en la selva amazónica las semillas serán grandes, con suficientes reservas para asegurar a la plántula su establecimiento en un ambiente sombreado, en el que necesitan de un cierto tamaño mínimo para sobresalir y acceder a la poca luz que dejan pasar las copas de los árboles más altos. Y en el lado opuesto, las semillas pequeñas y abundantes podrían ser típicas de especies expuestas en llanuras con fuertes corrientes de viento, que actuara como vector de dispersión de dichas semillas.

12.2. Estructura de la semilla de angiospermas

En general una semilla típica (Figura 12.5) está formada por (1) el embrión, (2) la *cubierta seminal* o *epispermo* y (3) cantidades variables de endospermo, el tejido nutricio de reserva. Los veremos a continuación.

12.2.1. El embrión

Como vimos en el tema 11, el embrión crece y madura en paralelo al crecimiento de la semilla. Durante las etapas de mayor crecimiento de la semilla, el embrión está en su fase madurativa, caracterizada por la acumulación de sustancias de reserva, y por su preparación para el reposo, que veremos en el apartado 12.4. En dicotiledóneas, el embrión maduro suele ocupar la región central de la semilla (Figura 12.5). En monocotiledóneas, el embrión suele situarse en el tercio inferior de la semilla, rodeado por el endospermo (Figura 12.6) Un embrión ya maduro presentará las siguientes partes principales: los cotiledones y el *eje embrional*. Una vez desarrollados en el embrión maduro,

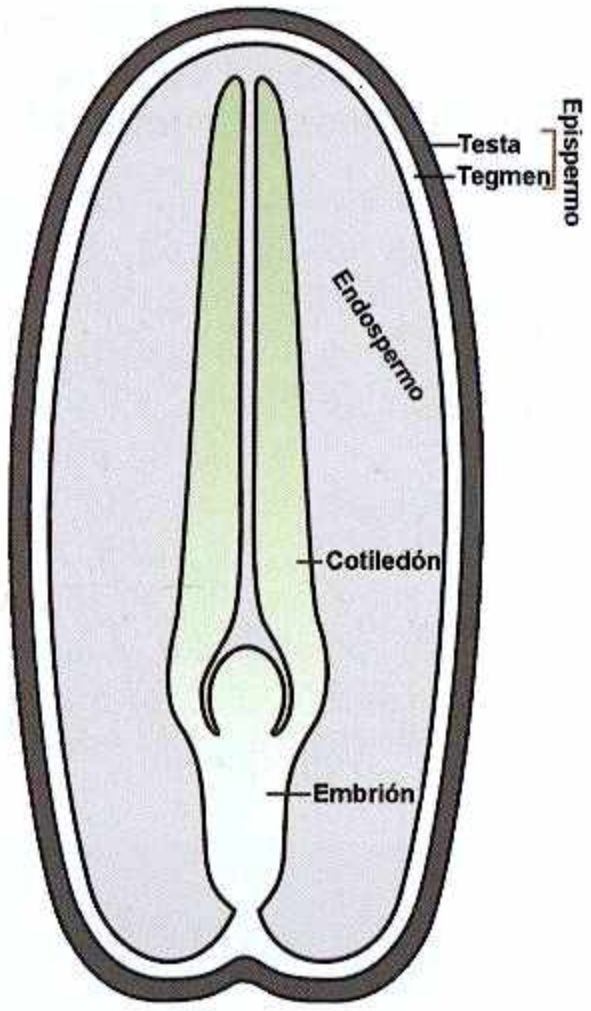


Figura 12.5: Esquema de una semilla de dicotiledónea.
Adaptación de imagen de Nova en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org), bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 Unported.

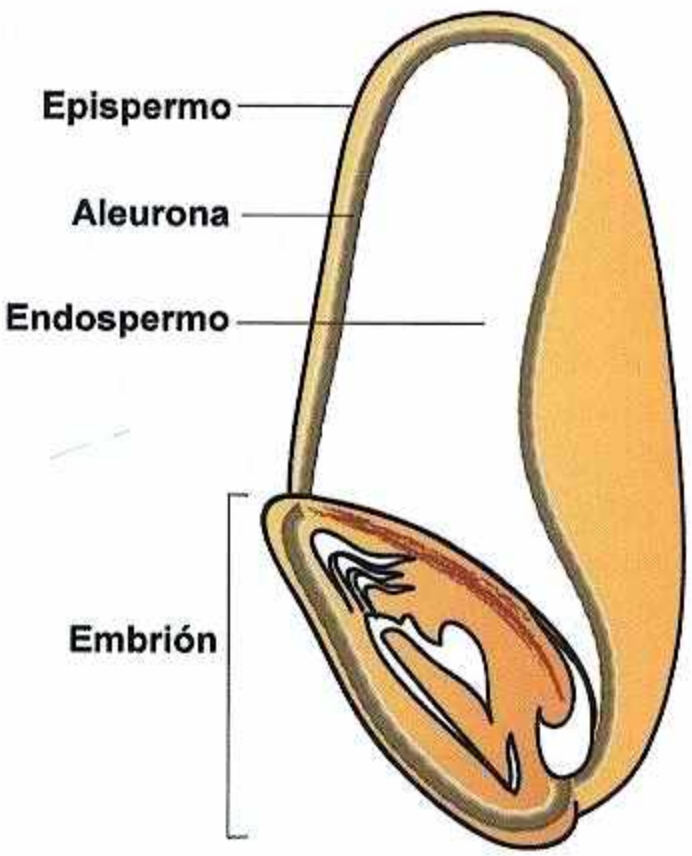


Figura 12.6: Esquema de una semilla de monocotiledónea (maíz).
Adaptación de imagen de dominio público en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

los cotiledones (1 en angiospermas monocotiledóneas, 2 en dicotiledóneas y hasta 18 en gimnospermas) tienen distintas funciones según la especie. En muchas especies (crucíferas o solanáceas por ejemplo), los cotiledones son las futuras primeras hojas, que la planta utilizará para realizar la fotosíntesis y obtener así energía hasta la aparición de las primeras hojas verdaderas.

En otras especies, los cotiledones se especializan para actuar como reserva alimenticia, proporcionando nutrientes para la generación de energía hasta la aparición de las primeras hojas verdaderas. Es el caso de las leguminosas, o de la jojoba (*Simmondsia chinensis*, Figura 12.7), donde los cotiledones ocupan gran parte del volumen de la semilla.

El eje embrional consta por un lado de los *centros de crecimiento* y por otro del *tallo embrional*. Los centros de crecimiento principales son la *plúmula* (meristemo apical caulinar) y la *radícula* (meristemo radicular). La plúmula dará lugar a todas las partes aéreas de la planta germinada. La radícula es la parte del embrión que emerge primero al germinar, dando lugar a la raíz. El tallo embrional es la zona del embrión entre ambos meristemos, que dará lugar al tallo en la planta adulta. Consta de *epicotilo*, la parte más cercana al extremo caulinar, *mesocotilo*, la zona media, e *hipocotilo*, la parte más cercana al ápice radicular.

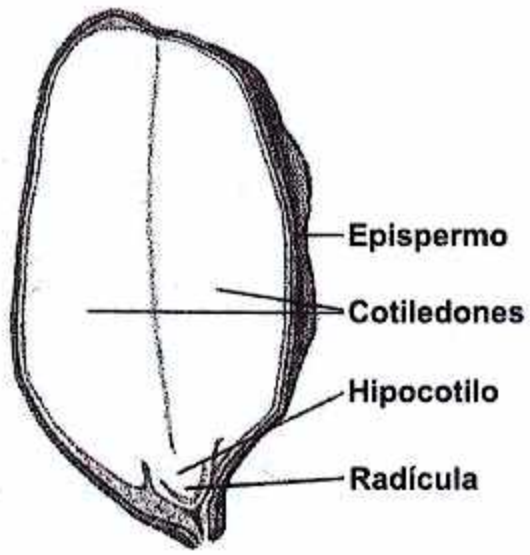


Figura 12.7: Semilla de jojoba (*Simmondsia chinensis*).
Adaptación de imagen de dominio público en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

12.2.2. La cubierta seminal

La cubierta seminal o *episperm o* es la capa más externa de la semilla. Su función principal es la de proteger al embrión y las sustancias de reserva. Aunque a veces intervienen las capas periféricas de la nucela, en general se forma a partir de los tegumentos del óvulo. En angiospermas la cubierta de la semilla suele ser seca. En el caso de los frutos secos, el episperm o suele ser delgado y membranoso. Puede en ocasiones quedar reducido a una única capa celular como en umbelíferas o en lechuga, o incluso desaparecer, como en el caso del maíz. En general, el episperm o consta de dos partes de fuera hacia adentro, la *testa* y el *tegmen* respectivamente (Figura 12.5).

La testa es la capa más externa, derivada de las capas externas del tegumento del óvulo. En ocasiones puede presentar modificaciones fundamentalmente en su morfología externa, destinadas a facilitar la dispersión de la semilla por el viento mediante la formación de alas membranosas, o por los animales mediante la formación de espinas que facilitan el agarre al pelaje del animal. Algunas semillas presentan también proyecciones sobre la testa cuya función es favorecer la absorción de agua en el momento de la germinación, para así asegurar el aporte hídrico necesario. Cuando la semilla presenta un endocarpio leñoso por debajo de la testa, ésta suele ser delgada. Cuando no hay endocarpio leñoso, la testa puede llegar a ser muy gruesa, como en el caso de *Plantago*, y es ésta la que actúa de barrera protectora frente a las agresiones externas y la deshidratación. Sobre la superficie de la testa se puede distinguir el micrópilo, el pequeño poro por donde entró el tubo polínico al óvulo y que persiste en la semilla, pues por él saldrá la radícula cuando germine la semilla.

Por debajo de la testa está el *tegmen* o *endopleura*, derivada del tegumento interno del óvulo y en ocasiones también de capas de la nucela. Suele ser mucho más delgado que la testa, por lo que su influencia en la función protectora es menor. La semilla permanece unida a la placenta por el funículo, la estructura

que conectaba el óvulo con el ovario antes de ser fecundado. Una vez la semilla madura y se desprende del funículo, en el punto de inserción quedará una pequeña cicatriz denominada *hilo*.

Como alternativa a esta estructura típica de la cubierta seminal, algunas especies han desarrollado especializaciones que dan a la semilla una apariencia en algunos casos bastante diferente de este modelo general. Por ejemplo, el algodón (*Gossypium*) presenta una epidermis seminal con pelos fibrosos de unas dimensiones considerables (Figura 12.8), de 20 a 45 cm de longitud y un grosor que oscila entre los 15 y los 25 micrómetros. Estos pelos constituyen la fibra del algodón, de enorme importancia en la industria textil para la confección de telas, entre otros materiales. La testa de esas semillas está formada por varias capas de células, y las fibras se generan a partir de la capa de células más epidérmica, formada por esclereidas columnares dispuestas en empalizada, sin espacios intercelulares. El tegmen por su parte queda reducido a la capa más interna del episperma.

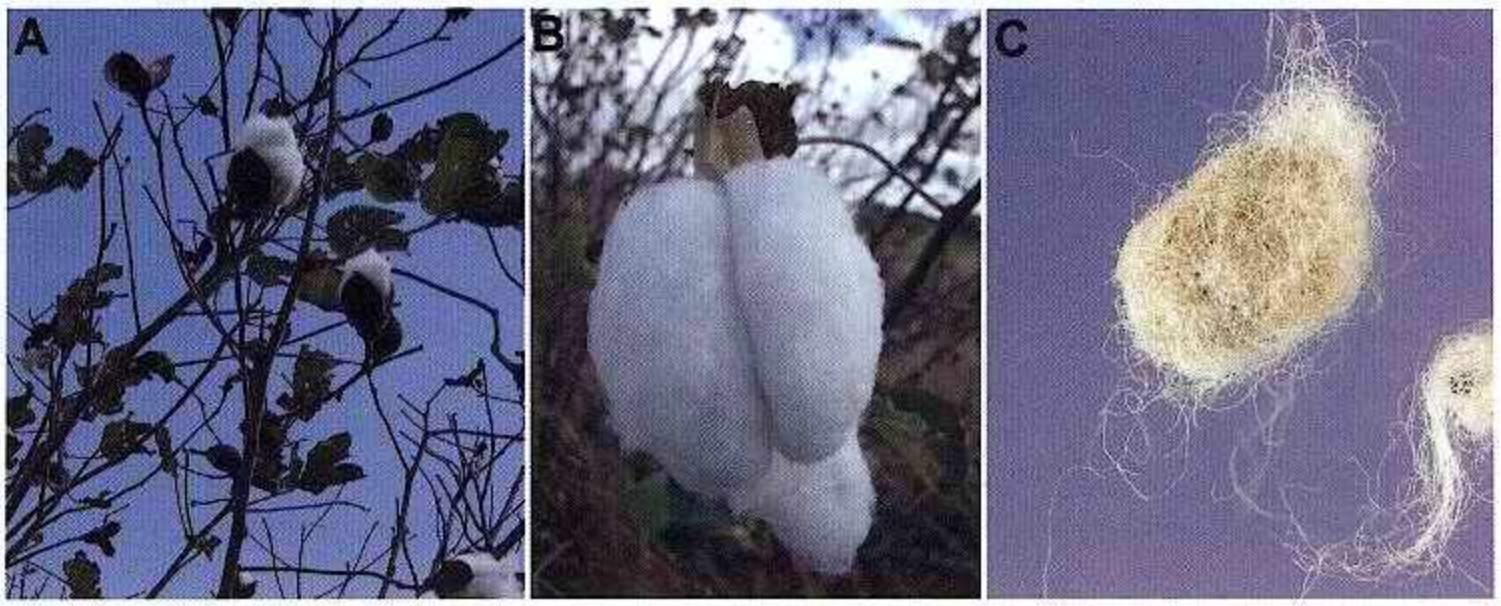


Figura 12.8: Semillas de algodón (*Gossypium* spp).
Imágenes de Forest & Kim Starr (A y B, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported) y del USDA (C, de dominio público) en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

En otras ocasiones, el episperma desarrolla una capa externa "hidratable". Por ejemplo en el tomate (*Solanum lycopersicum*), el tegumento externo presenta tres capas, dos internas parenquimáticas y una externa formada por una sustancia mucilaginosa. En condiciones de germinación, con agua suficiente, esta capa externa se hincha al absorber agua y aumenta enormemente su volumen. Esto acaba por romper las capas externas cutinizadas y la cutícula de la semilla.

En el caso de la granada (*Punica granatum*), el episperma es de tipo carnoso (Figura 12.9). La parte carnosa y jugosa de la semilla que consumimos es la epidermis, cuyas células se alargan mucho en sentido radial y se vuelven turgentes. La capa más interna está formada por esclereidas. Es la parte dura de la semilla (la "madera" de la semilla), y proporciona protección mecánica al embrión.

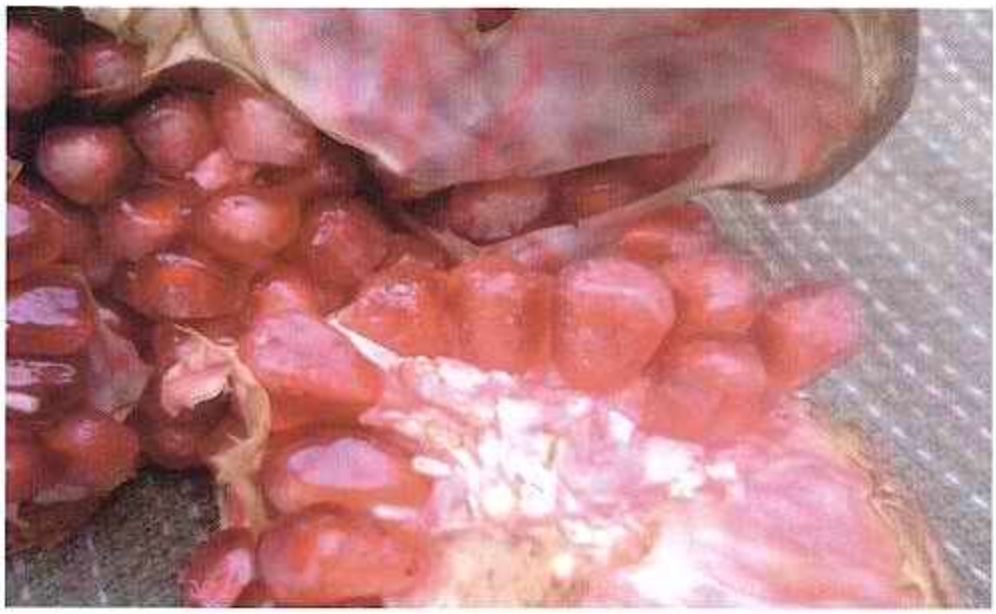


Figura 12.9: Semillas de granada (*Punica granatum*).
Imagen de Koba Chan, bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 Generic en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

12.2.3. Tejidos de reserva

Por lo general, las angiospermas almacenan sustancias de reserva (principalmente de hidratos de carbono, proteínas y lípidos) en su semilla, para favorecer su germinación una vez se den las condiciones oportunas. No obstante, existen excepciones a esta regla, como en el caso de las orquídeas, que por su tamaño extremadamente reducido no albergan ningún tipo de reserva. Las moléculas energéticas que se acumulan en los tejidos de reserva provienen de la fotosíntesis que tiene lugar en las hojas de las partes vegetativas de la planta. De ahí son transportados por el floema hasta el óvulo. A través del funículo llegan a la zona de la nucela, desde donde son descargadas a la cavidad interna del óvulo-semilla, donde se encuentran los tejidos en que se acumularán las reservas. En muchas angiospermas será el endospermo (también conocido como *albúmen* en la semilla) donde se acumulen principalmente las reservas. Pero no es el único lugar. De hecho, en las semillas de angiospermas, las sustancias de reserva pueden acumularse principalmente en tres lugares, en función de lo cual se pueden distinguir tres tipos de semillas: las semillas *albuminadas* o *endospermadas*, las semillas *perispermadas*, y las semillas *exalbuminadas* o *exendospermadas*.

En las semillas albuminadas o endospermadas, las reservas se acumulan en el endospermo. Ejemplos típicos abundan en las monocotiledóneas, en las que el endospermo está constituido por almidón y ocupa casi la totalidad de la semilla. En lugar de ser la región de almacenamiento de reservas, en monocotiledóneas el cotiledón sintetiza enzimas hidrolíticos que ayudan a movilizar las sustancias de reserva presentes en otros lugares. Ejemplos de semillas albuminadas son el trigo, la cebada, el centeno, la avena, el maíz o el coco. La semilla del cocotero (*Cocos nucifera*, Figura 12.10) presenta unas particularidades muy llamativas y dignas de mención. En primer lugar su tamaño, muy grande para ser una semilla. Pero sobre todo, el hecho de que su endospermo es parcialmente líquido (nuclear). Lo que comúnmente se conoce como *agua de coco* y en algunos lugares se usa como bebida, es en realidad la porción líquida del endospermo del

Figura 12.10: Semilla de cocotero (*Cocos nucifera*).
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

coco, de gran valor alimenticio por su concentración de nutrientes. La otra parte, sólida, es la periférica. Es blanca y comestible, tiene una textura carnosa, y es muy rica en aceites y vitaminas. Comercialmente recibe el nombre de *copra* y a partir de ella se obtiene el coco rallado, el aceite de coco, y otra serie de derivados alimentarios y cosméticos del coco.

En las semillas perispermadas, las sustancias de reserva se acumulan en el *perispermo*, un tejido de origen nucelar y diploide por tanto. Se da en semillas de Amaranthaceae, Polygonaceae y Chenopodiaceae como acelgas y remolacha azucarera (*Beta vulgaris*). En las semillas exalbuminadas o exendospermadas, el endospermo se consume durante el desarrollo del embrión. Por esta razón, las sustancias de reserva necesarias para la germinación se han de acumular en otras partes de la semilla. En los cotiledones en este caso, que adoptan por tanto una textura carnosa. Es el caso de muchas dicotiledóneas, de entre las que destacan por su importancia culinaria y valor nutritivo las leguminosas.

12.2.4. Composición de las reservas

Las reservas que acumula la semilla constan fundamentalmente de carbohidratos, proteínas y lípidos, en cantidades y localización variable según la especie. De entre los carbohidratos, el más común con diferencia es el almidón. A nivel celular, las reservas de carbohidratos se acumulan en forma de plastidios, diferenciados a amiloplastos (Figuras 12.11A y B). Las semillas ricas en almidón se denominan *amiláceas*, por tener un endospermo harinoso, amiláceo. Destacan de entre ellas las gramíneas o poaceas. También puede haber en determinadas semillas altas cantidades de polisacáridos de tipo hemicelulósico. Estos se acumulan en las paredes celulares, las cuales se hacen muy gruesas, duras y pesadas. Por ejemplo, debido a esto el endospermo de las semillas de la palmera tagua (*Phytelephas ecuatorialis*) es tan duro que se le conoce como *marfil vegetal*, y se usa como tal para numerosos objetos de artesanía (Figura 12.12).

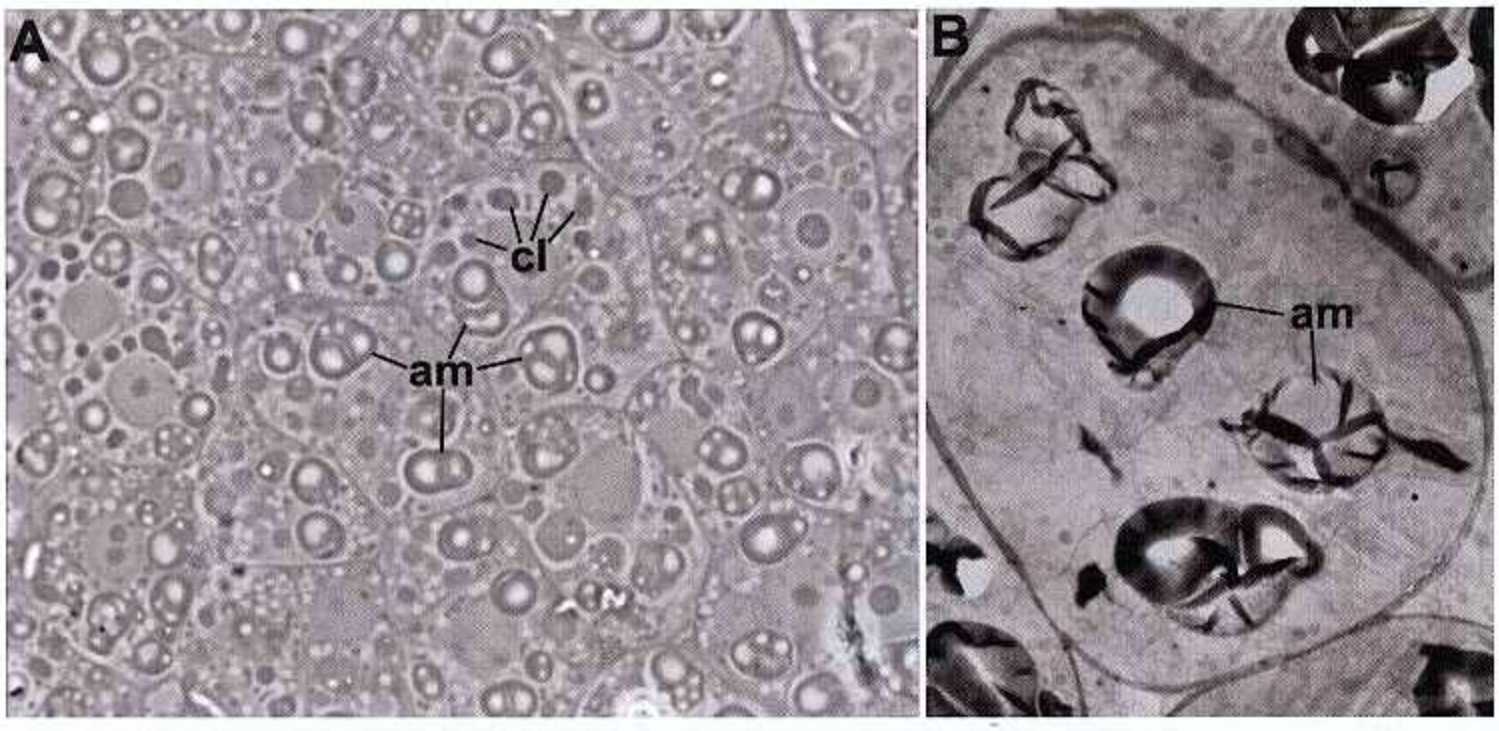


Figura 12.11: Células de cotiledón de colza (*Brassica napus*). En A se puede ver la abundancia de amiloplastos (am) y cuerpos lipídicos (cl). B es un detalle de amiloplastos cargados de almidón.
Imagen de Segui Simarro.

Figura 12.12: Frutos de *Phytelephas ecuatorialis* (A) y objetos de artesanía hechos con el endospermo de sus semillas (B y C)
Imágenes (A) de Twiga269 y (B) de Izarrak en Flickr.com bajo licencias Creative Commons Attribution, y (C) de dominio público en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

Las proteínas son otro elemento constituyente de las reservas de las semillas, aunque no en todas en iguales cantidades. Destacan sobre todo en cereales, donde se encuentran a veces en forma de una mezcla compleja de proteínas llamada *gluten*. Suelen concentrarse en los cereales en una capa denominada *aleurona*, o en los cotiledones en leguminosas. Tienen un gran valor alimenticio, hasta el punto que pueden incluso llegar a reemplazar a las proteínas de origen animal en individuos que por cualquier motivo no puedan ingerir carne.

Un ejemplo de semilla especialmente rica en proteínas es la soja (*Glycine max*), aunque también abundan en guisante (*Pisum sativum*), lenteja (*Lens culinaris*) y en general en cualquier legumbre o cereal.

En cuanto a los lípidos, generalmente se acumulan en forma de *cuerpos lipídicos* subcelulares (Figura 12.11A), que contienen grasas y aceites. Son especialmente abundantes, en forma de triglicéridos, en los cotiledones de semillas oleaginosas como las nueces, cacahuetes, avellanas, girasol y en general los frutos secos, además de la colza, la soja o la oliva. Los triglicéridos son ésteres de ácidos grasos. Éstos están presentes en diferentes proporciones y puede haber de diversos tipos. El ácido graso saturado más abundante es el palmítico. De entre los insaturados, los ácidos grasos oleico y linoleico son los más abundantes, siendo cerca del 60% del total del aceite presente en las semillas oleaginosas.

Aunque en menor cantidad, las semillas también almacenan nutrientes inorgánicos. Frecuentemente acumulan cationes inorgánicos (K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+} o Mn^{2+}) en forma de sales de mioinositol hexafosfato. A estas sales se les denomina *fitatos*, que son transportados a las vacuolas celulares, donde se acumulan.

12.3. Estructura de la semilla de gimnospermas

En gimnospermas, la semilla está desnuda, al aire sobre las escamas de sus conos, al contrario de lo que sucede en angiospermas. De hecho, el vocablo *gimnosperma* proviene de los términos griegos *gimno* (fuera o desnuda) y *sperma* (fruto o semilla). En la semilla de una gimnosperma típica como *Pinus*, podemos encontrar tejidos de origen y ploidía diferentes. En primer lugar está el tegumento externo o episperno, una envoltura que protege al resto de la semilla. El episperno está formado por la testa, que tiene tres capas y actúa como cubierta seminal. Sobre ella se sitúa el *ala* (Figura 12.13A), una expansión membranosa en forma de ala, formada por una parte adelgazada de la escama ovulífera que se desprende de ella. Esta ala ayuda a la semilla a ser dispersada

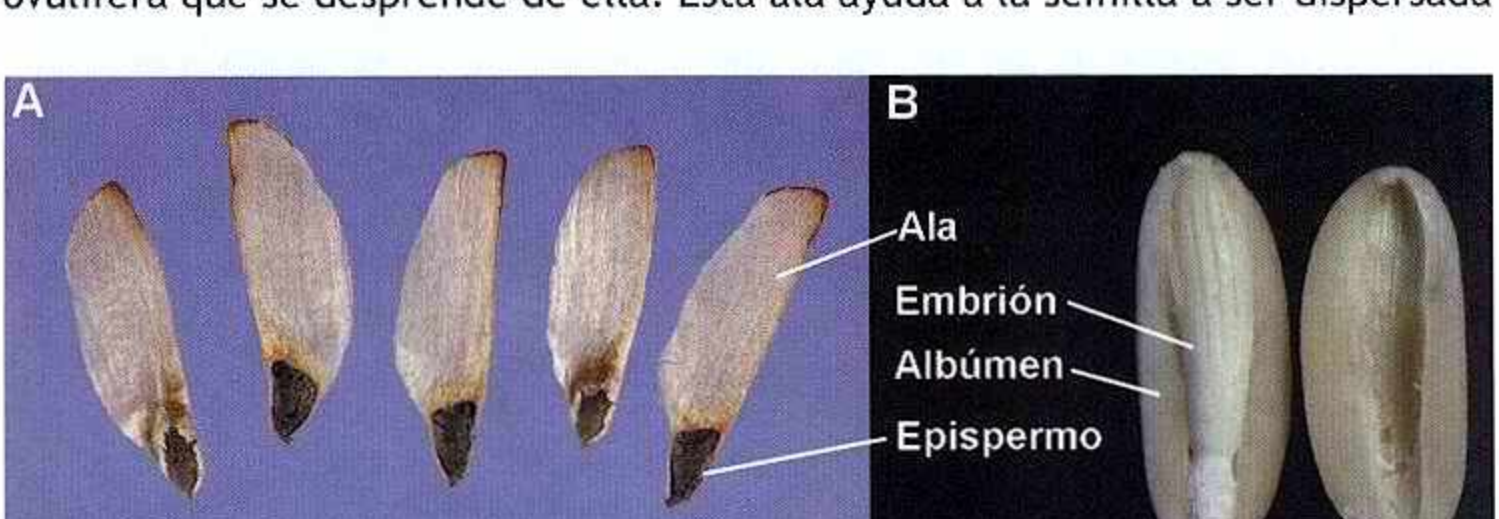


Figura 12.13: Semillas de *Pinus spp*. A muestra una semilla alada completa y B el interior de un piñón, una vez eliminado el episperno.
Imágenes: A, de dominio público en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org) y B, propia del autor.

por el viento. Tanto el tegumento como el ala tienen un origen materno, esporofítico. Serán por tanto diploides, y genéticamente idénticos al parental femenino.

El embrión (Figura 12.13B) está constituido por los cotiledones y por la *plántula*, el rudimento de lo que tras germinar dará lugar a una nueva planta. Los cotiledones se sitúan a los extremos laterales de la plántula, y pueden ser más numerosos que en las angiospermas como vimos en el tema 11. La plántula consta de *plúmula*, precursor del ápice caulinar, *talluelo* o *hipocotilo*, precursor del tallo, y *radícula*, precursora de la raíz.

Las semillas de las gimnospermas son albuminadas. Es decir, almacenan las reservas en su albumen (Figura 12.13B), almacén de sustancias de reserva de tipo amiláceo principalmente, aunque también puede presentar grasas, aceites y proteínas. El albúmen es realmente el endospermo primario, que recordemos que formaba parte del gametófito femenino. Es, por tanto, de origen gametofítico y haploide, por no darse la doble fecundación como sucede en las angiospermas.

12.4. Maduración, reposo y latencia

Una vez que la semilla ha completado su desarrollo, la semilla ha de prepararse para permanecer en reposo durante un tiempo variable, en condiciones no siempre propicias, y sin perder viabilidad para poder germinar cuando llegue el momento. Se cree que el reposo, entendido como la incapacidad temporal de una semilla para germinar, sería una estrategia adaptativa de las plantas para favorecer la dispersión de las semillas y evitar que germinen antes de hora, justo debajo de la planta o el árbol que las originó, o incluso todavía en él, dentro del fruto. Gracias al reposo, la semilla tiene un cierto tiempo para ser dispersada sin germinar.

Al proceso de preparación para el reposo se le denomina *maduración de la semilla*. En la maduración, la semilla sufre una serie de importantes cambios metabólicos. Aparte de las proteínas que se acumulan en la semilla como sustancias de reserva, esta también presenta otra serie de proteínas relacionadas con la maduración, y más concretamente con la resistencia del embrión a la desecación. Entre este grupo de proteínas se encuentran las LEA (late embriogenesis abundant), cuya expresión se activa mediante ácido abscísico (ABA), una vez finaliza la fase de acumulación de reservas. Junto con estas proteínas, se sintetizan también oligosacáridos como la rafinosa, que ayudan también a que el embrión permanezca viable durante la etapa de reposo, por conferirle resistencia a la desecación y evitar la cristalización de las sales y proteínas del citoplasma al disminuir el contenido en agua. Una vez sintetizadas todas estas moléculas, los niveles de ABA intracelular bajan y comienza la primera fase de la maduración, la fase de pérdida generalizada de agua (deshidratación). Tras ella, vendrán unas fases de diferenciación de la cubierta seminal, interrupción

de la transcripción y la síntesis proteica, y reducción de la respiración, entre otras actividades del metabolismo intermedio.

Una vez alcanzado el estado de reposo, o de actividad metabólica basal, la semilla permanece en él hasta el momento de la germinación. En todo este tiempo, la semilla puede no germinar porque las condiciones no sean las propicias para ello. En este caso, al reposo se le denomina *quiescencia*. La causa más común de la quiescencia suele ser la falta de agua, tanto en condiciones naturales, como cuando en condiciones artificiales de almacenamiento se le priva de ella para conservarla. Por otra parte, puede que la semilla no germine a pesar de encontrarse en un lugar óptimo en cuanto a temperatura y humedad, y que sean otras causas, endógenas o exógenas, las responsables. En este caso, al reposo se le denomina *latencia*. Si la latencia se debe a causas endógenas, propias de la semilla, se le denomina *latencia primaria*. Ésta puede venir dada por el embrión, si no está preparado para germinar o está fisiológicamente "desactivado", y se conoce como *latencia embrionaria*. Puede estar también impuesta por la cubierta seminal. En este caso, el embrión está preparado para germinar, pero hay una serie de factores presentes en la cubierta seminal que le impiden germinar. Si la latencia se debe a causas exógenas, por necesitar unas condiciones ambientales especiales típicas de su hábitat, fuera del cual no germina, se le denomina *latencia secundaria* o *exógena*.

12.4.1. Causas de la latencia

La latencia embrionaria puede desencadenarse por la presencia de factores inhibidores endógenos en el propio embrión, bien en el eje embrionario o en los cotiledones, que aseguran que un embrión no germine hasta que esté totalmente preparado para ello. Otra causa puede ser la necesidad de pasar por un periodo de interrupción del crecimiento y de disminución del metabolismo previo a la germinación, como estrategia adaptativa de supervivencia frente a condiciones desfavorables.

En la latencia impuesta por la cubierta seminal, la causa más común es la impermeabilidad de las cubiertas seminales al agua. De forma natural, esta impermeabilidad va desapareciendo por exposición a agentes ambientales como microorganismos que promuevan su degradación, sustancias presentes en el suelo como las saponinas, o por el efecto de las fluctuaciones de la temperatura ambiental. El efecto combinado de todos ellos va poco a poco aumentando la permeabilidad hasta que la semilla alcanza un grado de rehidratación suficiente para germinar. Un ejemplo de semillas con este tipo de latencia es el de las leguminosas.

Otra causa frecuente es la presencia de sustancias inhibidoras de muy distinto tipo en diferentes tejidos de la semilla. Una de las más frecuentes es el ABA. Hay especies, denominadas *pirófitas*, que presentan inhibidores termolábiles en su cubierta, de modo que tras exposición a altas temperaturas, como las que se alcanzan durante un incendio forestal, los inhibidores quedan inactivados y

la semilla puede germinar. Otras especies presentan inhibidores en su cubierta que pueden ser degradados por los ácidos del tracto digestivo animal. Son lógicamente semillas de especies de dispersión animal, que basan su estrategia en que el animal coma el fruto, la semilla recorra todo su tracto digestivo, y retorne al exterior junto con las heces del animal, pero ya sin inhibidores, apta para germinar. Las restricciones de la cubierta a la germinación pueden ser también de tipo mecánico, como en el caso de las semillas duras, que impiden físicamente el desarrollo del embrión, impidiendo que se expanda la radícula. En leguminosas la restricción la impone la cubierta seminal, mientras que en otras especies como la lechuga, la restricción puede venir impuesta por el endospermo. En la práctica agrícola, todas estas restricciones impuestas por la cubierta seminal pueden solucionarse en gran medida con la escarificación total o parcial. Es decir, con la eliminación mecánica total o parcial de la cubierta seminal.

Otras causas de latencia inherentes a la semilla son la difusión lenta del agua a través del endospermo, como en cereales, la permeabilidad baja o nula de las cubiertas seminales al oxígeno, la presencia de múltiples capas en el epispermo, la presencia de una capa mucilaginosa sobre la cubierta seminal, o un consumo elevado de oxígeno por parte de los diferentes componentes de la cubierta, lo cual reduce la disponibilidad para el embrión.

En la latencia exógena influyen sobre todo los requerimientos de luz y temperatura. Se presenta en semillas capaces de germinar en unas condiciones concretas de humedad, temperatura media, disponibilidad de oxígeno u otras, habituales en su hábitat natural, pero que permanecen latentes por estar desplazadas fuera de dicho hábitat. Un ejemplo de este tipo de latencia es el que se da en muchas malas hierbas, cuyas semillas solo germinan si están en superficie, expuestas a la luz solar. Las subterráneas, expuestas a menos luz o a total oscuridad, no germinan a menos que por remoción del terreno salgan a la superficie. En este caso la latencia exógena vendría impuesta por la luz. En otros casos, una latencia semejante viene impuesta por la disponibilidad de oxígeno.

12.4.2. Longevidad

Una vez entra en reposo, la semilla tiene un tiempo determinado para dispersarse y germinar. En algunas especies, la semilla ha de germinar en un periodo relativamente corto de tiempo tras su diseminación, o acaba pudriéndose rápidamente. Por ejemplo las del sauce, que solo resiste unos días tras desprenderse del árbol. En otras especies, la germinación puede esperar decenas e incluso cientos de años. En casos extremos, como las del loto oriental, las semillas son capaces de germinar hasta 3.000 años después de ser dispersadas. Es decir, las semillas presentan un periodo de viabilidad óptima tras el cual la viabilidad disminuye, y pueden desde producir plantas débiles o con problemas, a sencillamente no germinar. A este periodo de viabilidad óptima se le denomina *longevidad* de la semilla, y puede tener una duración muy variable según la

especie y sus condiciones de diseminación sobre todo. Hay una serie de factores que determinan la longevidad de la semilla:

- *Humedad en el momento de la diseminación*. Depende de la presencia de una mayor o menor capa de solvatación rodeando las moléculas con actividad biológica y creando el entorno bioquímico para dicha actividad. También depende de la posibilidad de redistribución del contenido hídrico intracelular de la semilla, de forma que las moléculas permanezcan en un estado inactivo pero capaz de reasumir su función biológica una vez se rehidrate la semilla.
- *Resistencia térmica al frío*. Depende del contenido en agua previo de la semilla, de la naturaleza (composición lipídica y proteica) de las membranas celulares, y de la tolerancia del citoplasma de la célula al frío. Esto a su vez viene directamente relacionado con el siguiente punto.
- *Composición de las semillas*. La composición de la célula, y más concretamente la de su citoplasma, en ciertas moléculas (azúcares y polisacáridos de reserva sobre todo), con actividad crioprotectora, impiden o minimizan los daños provocados por las bajas temperaturas. La composición lipídica, como acabamos de ver, también influye. Al igual que el tipo de compuestos secundarios que se acumulan en las vacuolas.
- *Grado de dureza e impermeabilidad de la cubierta seminal*, como barrera protectora frente a ataques de patógenos y evaporación de agua.
- *Tasa metabólica en el momento de la diseminación*. Depende de la capacidad que tenga la semilla para interrumpir o disminuir el metabolismo respiratorio a niveles basales pero compatibles con la vida. Está relacionada con niveles bajos de humedad.

Podríamos por tanto concluir que una hipotética semilla longeva tendría las siguientes características: cubierta altamente impermeable, bajo contenido inicial de agua, y en forma de capa de solvatación molecular, alta tolerancia a la deshidratación y a las bajas temperaturas, presencia de periodo de latencia, reservas de tipo no lipídico, presencia de metabolitos secundarios que le confieran resistencia antimicrobiana, membranas celulares ricas en ácidos grasos no saturados, resistencia al deterioro genético, tasa metabólica baja y presencia de agentes crioprotectores.

12.5. Dispersión de las semillas

Cuando la semilla está ya perfectamente formada, madura, y en reposo, llega el momento de su dispersión. Diseminar las semillas es clave para que las especies vegetales conquisten nuevos hábitats, pero también para evitar que aumente la presión en un determinado terreno por convivir las plantas progenitoras con sus descendientes a muy poca distancia. En pocas palabras, es necesaria para la perpetuación de las especies.

Al igual que vimos en el tema 10 que sucedía con el polen, las semillas también se valen de diferentes vectores, bióticos y abióticos para su diseminación. La especialización de una determinada especie para que sus semillas sean diseminadas por un determinado vector hace que éstas adopten formas, tamaños, colores y texturas particulares, a veces muy curiosas, y que en algunos casos desarrollen estructuras especiales *ex profeso* para un tipo de dispersión particular. Es decir, hay una estrecha relación entre la estructura de la semilla y su tipo de dispersión. Existen principalmente tres tipos de dispersión, mediada por el viento, el agua y los animales. Los veremos a continuación.

12.5.1. Dispersión por viento

El principal agente dispersor de las semillas de plantas superiores es el viento. A la dispersión por viento se le denomina *anemocoria*. Las semillas de las plantas anemócoras se caracterizan por su reducido tamaño y peso, condiciones necesarias para mantenerse suspendidas en el aire el mayor tiempo posible. Ejemplos de este tipo de semillas los encontramos en la bolsa de pastor (*Capsella bursa pastoris*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), la albahaca (*Ocimum basilicum*, Figura 12.3A), las amapolas (*Papaver spp.*) o las orquídeas (Figura 12.3B). La cubierta seminal puede además presentar ornamentaciones o estructuras que favorezcan la flotabilidad o el arrastre por el viento. Algunas de estas estructuras son las alas membranosas derivadas del episperma, muy frecuentes en gimnospermas (Figura 12.13A).

En una angiosperma anemócora, no tendría sentido desarrollar este tipo de alas en la semilla, pues éstas vienen siempre dentro de frutos. Por tanto lo que hacen es desarrollar frutos "aerodinámicos", con una alta capacidad de flotar y planear en el aire. Es el caso de los frutos de árboles como la tipa (*Tipuana tipu*), los fresnos (*Fraxinus spp.*, Figura 12.14A), o los olmos (*Ulmus spp.*, Figura

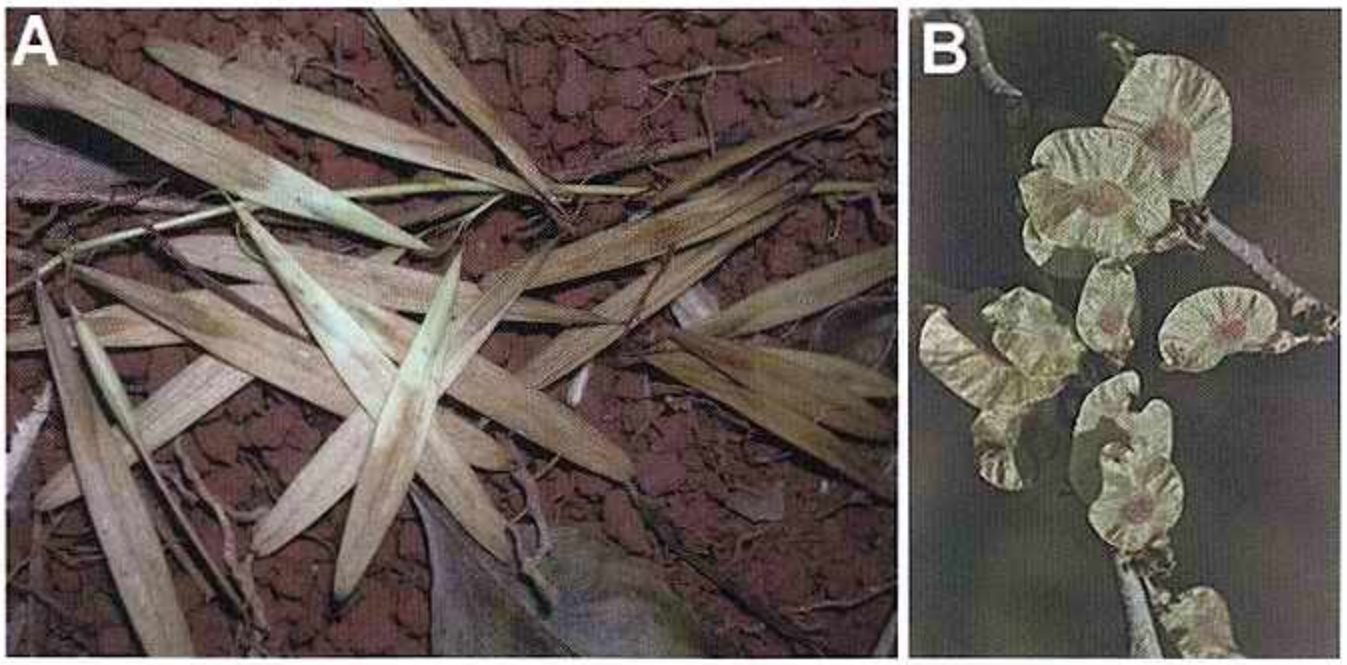


Figura 12.14: Frutos laminares de fresno (*Fraxinus sp.)* y olmo (*Ulmus sp.*).
Imágenes de Forest & Kim Starr (A), bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported, y del Ohio Department of Natural Resources, reproducida con permiso, ambas en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

12.14B), cuyo pericarpo (pared del fruto) se expande formando una superficie laminar plana y delgada. Otros árboles como los álamos (*Populus spp.*, Figura 12.15A y B) y los sauces (*Salix spp.*, Figura 12.15C) desarrollan semillas con pelos, largas fibras que forman madejas algodonosas que aumentan la superficie de la semilla sin apenas aumentar su volumen.

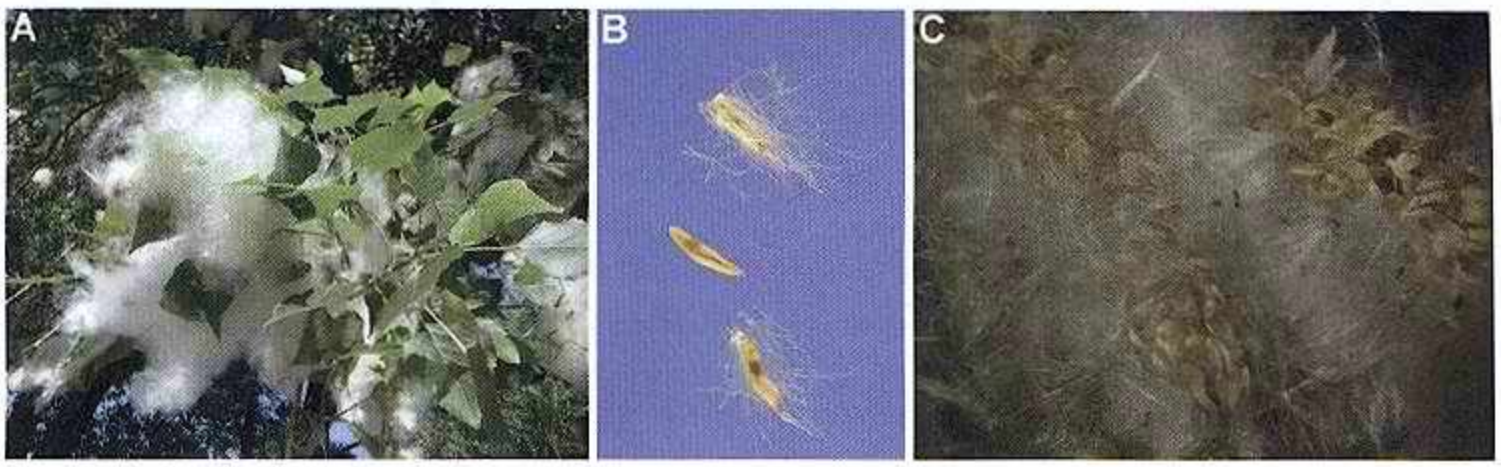


Figura 12.15: Semillas de (A y B) álamo (*Populus spp.*) y (C) sauce (*Salix spp.*).
Imágenes de George Chernilevsky (A), Steve Hurst (B), ambas de dominio público, y de BCB (C), bajo licencia Free Art License (http://artlibre.org), todas en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

Otras estructuras típicas de la anemocoria son los *vilanos*, una especie de penachos plumosos, derivados de los sépalos, que actúan de "paracaídas", elevando enormemente la flotabilidad del fruto que llevan colgando. Se da generalmente en las asteráceas y apocináceas, como *Asclepia* (Figura 12.16).

Un caso particularmente curioso en la utilización del viento para la dispersión es el de la barrilla (*Salsola kali*). Esta planta, de porte globoso, se rompe por la base, se seca y rueda toda ella empujada por el viento. Es la típica bola vegetal seca que muchos hemos visto rodar por el desierto de Arizona en las películas

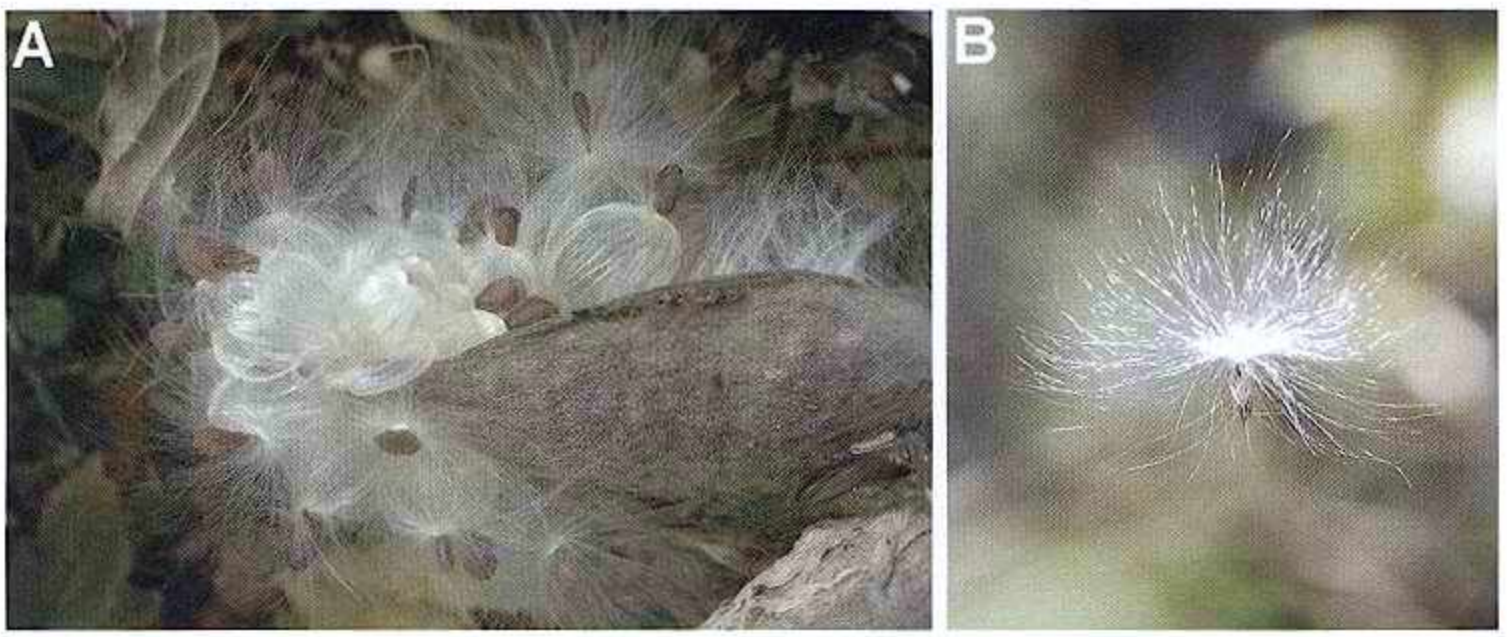


Figura 12.16: Vilanos de *Asclepia challiyil*.
Imágenes de Tracy (A) y Eswaramangalath Vipin (B) bajo licencia Creative Commons Attribution 2.0 Generic en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

del oeste americano. Durante su periplo, va soltando los cientos de miles de pequeñas semillas milimétricas que produce antes de secarse. Algo parecido sucede con *Eryngium campestre*.

12.5.2. Dispersión por agua

Otro medio de dispersión de las semillas es el agua. A la dispersión por agua se le denomina *hidrocoria*. Lógicamente, es el vector de dispersión obligado de las plantas acuáticas. También es utilizado por muchas malezas en campos de cultivo donde se riega por inundación. Para especies que habiten en las laderas de las montañas, la lluvia y su efecto de arrastre puede también ser un efectivo mecanismo de dispersión. Pero quizás el ejemplo más relevante de este tipo de dispersión es el del cocotero (*Cocos nucifera)*, cuyas semillas se caracterizan por presentar un gran hueco en su interior (Figura 12.10), lo cual las hace flotar. Los cocoteros a menudo están cerca de la costa, y utilizan las corrientes marinas para dispersar sus semillas flotantes (los cocos) a otras playas, islas e incluso en ocasiones continentes.

12.5.3. Dispersión por animales

El tercer medio de dispersión de las semillas son los animales. A la dispersión por medio de animales se le denomina *zoocoria*. Los animales a cargo de este proceso suelen ser ganado, pájaros, roedores u hormigas. Existen dos modos de utilizar a los animales para el transporte de semillas. La vía más frecuente, denominada *endozoica*, consiste en estimular al animal a que consuma el fruto dentro del cual va la semilla, o la planta entera en el caso de rumiantes que se alimentan de forraje. En el primer caso, la estrategia es producir frutos de sabor agradable, generalmente dulce, y de colores atractivos. Veremos numerosos ejemplos de este tipo de frutos en el próximo tema. Una vez han ingerido el fruto, la semilla pasa a través del tracto digestivo del animal. El fruto es digerido y asimilado por el animal, mientras que la semilla, gracias a su epispermo resistente a los ácidos gástricos, atraviesa el tracto inalterada y es liberada con las heces. En algunos casos, dichos ácidos ayudan a la posterior germinación debilitando parcialmente la cubierta o bien inactivando alguno de los inhibidores de la germinación de los que hablamos en el apartado 12.4.1.

La segunda vía de diseminación animal de las semillas se denomina *ectozoica*. En este mecanismo, los animales transportan las semillas en su superficie debido a que éstas se quedan de algún modo adheridas al animal. Para ello, muchas semillas o los frutos que las contienen desarrollan pelos, ganchos, espinas o barbas que contribuyen a su adherencia al pelaje de los mamíferos o a las plumas de las aves. Un ejemplo muy ilustrativo de la capacidad de agarre de los frutos para su transporte ectozoico es el del género *Xanthium* (Figura 12.17). En estos frutos, las semillas van dentro de unos frutos de tipo aquenio, de forma ovalada y recubierto por numerosas espinas rígidas y terminadas en un pequeño gancho. Estos ganchos son capaces de agarrarse a virtualmente cualquier

elemento que les roce, desde el pelaje de cualquier animal o las plumas de un pájaro, hasta cualquier prenda de ropa de un ser humano. Otros ejemplos los encontramos en el chamaco (*Datura ferox*, Figura 12.18A) o el carretón (*Medicago polymorpha*, Figura 12.18B).

Figura 12.17: Fruto de *Xanthium strumarium*.
Imagen de Franco Folini bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 Generic en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

Figura 12.18: Frutos de *Datura ferox* (A) y *Medicago polymorpha* (B).
Imágenes de Solanum (A) y Tracey Slotta (B), de dominio público en Wikimedia Commons.

Otro importante vector de dispersión ectozoica son las hormigas. Las semillas que utilizan la dispersión por hormigas suelen presentar en su superficie una estructura denominada *eleosoma* (Figura 12.19). Se trata de un depósito de consistencia carnosa, cuyas células acumulan aceites o sustancias grasas, muy apetecibles por las hormigas. Éstas transportan la semilla a su nido y consumen el eleosoma, dejando intacto el resto de la semilla, que queda bajo tierra y listo para germinar.

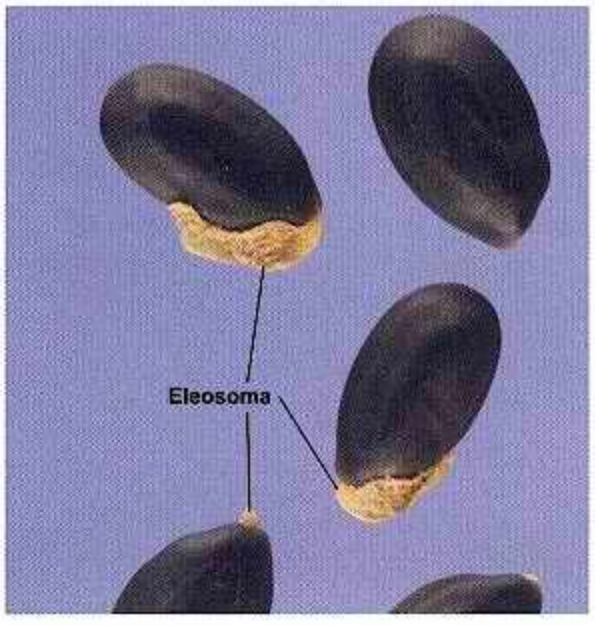


Figura 12.19: Eleosomas en Semillas de *Acacia dealbata*.
Imagen de Steve Hurst de dominio público en Wikimedia Commons.

Figura 12.20: Fruto de *Ricinus communis*.
Imagen de Syp, de dominio público en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

12.5.4. Otros mecanismos de dispersión

Hasta ahora hemos visto estrategias de dispersión pasiva de las semillas. Sin embargo, y pese a ser seres estáticas, algunas plantas han desarrollado diversos mecanismos de dispersión activa de sus semillas. No se trata de estrategias generalizadas ni generalizables. Sin embargo, algunas, por su curiosidad, merecen la pena ser conocidas. El fruto del ricino (Ricinus communis, Figura 12.20) es globular y con abundantes púas. Pese a tener el aspecto típico de una dispersión ectozoica, lo cierto es que dispersa sus semillas al secarse, creando una tensión progresiva en su cubierta, que finalmente provoca un efecto de resorte que lanza la semilla a distancias de incluso más de diez metros. Algo parecido sucede en la mandioca brava (*Manihot grahamii*). Otras plantas como el cacahuete (*Arachis hypogaea*) y el trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) entierran sus frutos tras la fecundación, mediante lentos movimientos condicionados a la percepción de la gravedad (geotropismo). y así éstos maduran debajo del suelo, quedando las semillas naturalmente enterradas. Otro trébol (*Trifolium polymorphum*) se asegura una doble estrategia de dispersión por herbívoros y mantenimiento de individuos en el lugar de origen mediante la producción de legumbres en sus partes aéreas y a la vez bajo tierra (legumbres subterráneas indehiscentes).

12.6. Germinación

La germinación es el proceso final del ciclo de la semilla. Una vez todos los condicionantes endógenos (ausencia de inhibidores, suficiente viabilidad, etc.) y exógenos (fundamentalmente condiciones adecuadas de luz, temperatura y oxígeno) son propicios, el embrión de la semilla sale de la fase de reposo y retoma un crecimiento que dará lugar a un nuevo individuo.

El primer paso de la germinación consiste en la rehidratación de la semilla (*imbibición*). Ésta comienza a captar agua del entorno para volver a unos niveles hídricos adecuados sobre todo en el embrión, aunque también en las diferentes capas que lo rodean. De esta forma, la semilla se hincha, llegando incluso a rasgarse el episperma, lo cual favorece la posterior emergencia del embrión.

Además de la imbibición, y en paralelo a ella, se inicia el metabolismo respiratorio, la actividad enzimática y la síntesis proteica. Al principio, la síntesis proteica es muy activa y se basa en la traducción de los ARN mensajeros preexistentes en la semilla. Conforme se retoma la transcripción, se aportan nuevos mensajeros para obtener enzimas para la movilización de reservas, la reparación de orgánulos dañados por el reposo, la síntesis de nuevos ribosomas, factores de transcripción, etc. Los enzimas hidrolíticos (amilasas, glucanasas, maltasa, peptidasas y lipasas) descomponen los nutrientes almacenados en los tejidos de reserva en sus componentes esenciales (azúcares, aminoácidos y ácidos grasos). Éstos son transportados hacia las zonas de crecimiento del embrión. La disponibilidad de nutrientes en estas zonas permite su crecimiento en tamaño por medio de divisiones celulares.

La radícula es la primera estructura del embrión que emerge de la semilla, atravesando el micrópilo y perforando la testa (Figura 12.21). Además de crecer en longitud, desarrolla pelos radiculares laterales que aumentan su superficie de absorción de agua, al tiempo que comienzan a anclar el embrión al sustrato. Seguidamente se alarga el hipocotilo, empujando a la plúmula y demás partes aéreas de la plántula hacia la superficie. A partir de aquí, se pueden dar dos maneras distintas de germinar, en función de la posición en que queden los cotiledones.

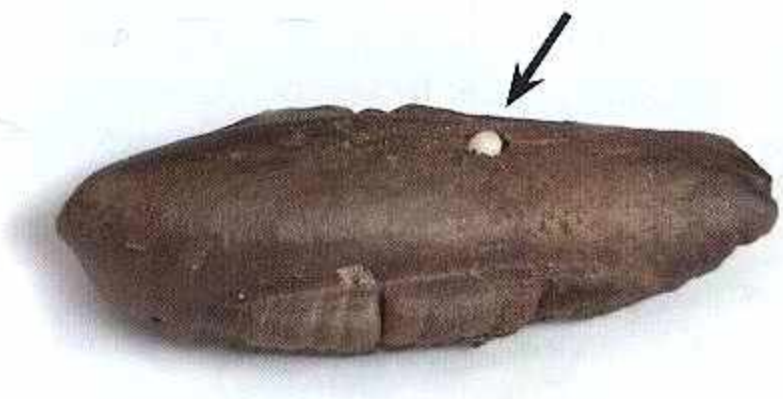


Figura 12.21: Emergencia de la raíz (flecha) en la zona superior de una semilla (dátil) de palmera datilera (*Phoenix dactylifera*).
Imagen de Amada44 de dominio público en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

Figura 12.22: Germinación de semilla de haya blanca (*Gmelina leichhardtii*).
Imagen de Peter Woodard bajo licencia Creative Commons CC0 Waiver en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

Germinación epigea: La testa se desprende relativamente pronto, y el hipocotilo se desarrolla rápidamente, generando un tallo que emerge del suelo (Figura 12.22). En el tallo van los cotiledones, que se abren y actuarán como hojas fotosintéticas hasta que comiencen a aparecer los verdaderos nomófilos.

Germinación hipogea: La testa no se desprende tan pronto. Los cotiledones, que actúan como tejidos de reserva, permanecen enterrados en el suelo. Al no haber cotiledones fotosintéticos, la plántula ha de servirse de las reservas de los cotiledones hasta que se desarrollen las hojas verdaderas, momento en que comenzará la fotosíntesis. El hipocotilo se desarrolla menos que en el caso anterior. Es el modo de germinación de las leguminosas y de muchas monocotiledóneas, como las gramíneas (Figura 12.23) por ejemplo, o las arecaceas (Figura 12.24).

Figura 12.23: Germinación de semillas de centeno (*Secale cereale*).
Imagen de M. Kirchherr de dominio público en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

Figura 12.24: Germinación de semilla de cocotero (*Cocos nucifera*).
Imagen de Wmpearl de dominio público en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org).

12.7. Control hormonal del desarrollo del embrión y la semilla

Todos los procesos de desarrollo del embrión y la semilla vistos en el tema anterior y en este se dan de forma secuencial y coordinada gracias a la acción promotora o inhibidora del crecimiento, según el caso, de determinados factores reguladores del crecimiento (fitohormonas). Veremos a continuación algunos de ellos.

Las auxinas, y mas concretamente en ácido indol-acético (IAA), la principal auxina natural de las plantas, tienen un papel destacado en las primeras etapas del desarrollo del embrión. En concreto, las auxinas son las responsables de la transición que experimenta el embrión globular hacia la simetría bilateral del embrión en forma de corazón. Su patrón de expresión temporal está estrechamente regulado, de modo que si el embrión no dispone de unos niveles adecuados de auxinas durante su desarrollo, puede sufrir problemas, fundamentalmente en la elongación necesaria durante las fases torpedo y cotiledonar. El embrión zigótico es considerado como una fuente de producción de IAA que exporta al resto de la planta. El embrión produce IAA en respuesta a señales reguladoras provenientes del resto de tejidos de la semilla.

El ácido abscísico (ABA) es otra fitohormona con un papel destacado en el desarrollo del embrión y la semilla. De forma análoga a lo comentado para el IAA, ABA presenta también patrones de expresión regulados en el tiempo. Sin embargo, y a diferencia del IAA, el ABA es una hormona que se sintetiza en las partes vegetativas de la planta y es transportada a la semilla, donde se almacena, principalmente en el endospermo y la testa, que llegan a acumular hasta un

50% del total de ABA de la semilla. Por este motivo se cree que la semilla actúa de reservorio de ABA, desde donde esta hormona es importada al embrión para ejercer sus funciones. De entre estas, destaca su papel morfogénico durante las primeras etapas del desarrollo del embrión, en particular en el mantenimiento de la integridad morfológica del embrión. Pero sobre todo, el ABA tiene importancia durante las etapas finales de maduración, almacenamiento de nutrientes y desecación . El ABA es un inhibidor indirecto de la actividad hidrolítica de las amilasas. También inhibe la elongación del embrión al impedir la creación de las condiciones para la entrada de agua necesaria para dicha elongación.

El etileno es otra de las hormonas implicadas en el desarrollo de la semilla, y en particular en el desarrollo del embrión. En embriones de colza, la expansión lateral de los cotiledones está mediada por la acumulación local de etileno alrededor del día 20 de cultivo. Más adelante, sobre el día 35 tras la polinización aparece un segundo pico de acumulación de etileno, durante la fase de desecación del embrión. En embriones de colza obtenidos mediante técnicas biotecnológicas in vitro a partir de microsporas (androgénicos) (VER TEMA 19), este segundo pico de etileno apenas se observa, y los embriones no entran en reposo y germinan directamente. Por este motivo se cree que el etileno también está relacionado con las últimas fases de la embriogénesis, y más concretamente con la desecación y latencia del embrión zigótico.

Las giberelinas (GAs) tienen un efecto opuesto al ABA. Esto es, estimulan la germinación de las semillas en muchas especies. En realidad, parece ser que las etapas de reposo y germinación de la semilla vienen determinadas por los niveles relativos de ABA y GAs. Así, cuando el equilibrio ABA/GAs se decanta del lado del ABA, la semilla permanece en reposo, y se dan los procesos relativos al reposo antes mencionados. Si el equilibrio revierte del lado de las GAs, la semilla entra en germinación. Lógicamente si el resto de condicionantes externos son los propicios. En la germinación, las GAs tienen un papel relevante en la movilización de las reservas necesarias para la germinación. Por ejemplo, en cereales las GAs se sintetizan en el coleóptilo y el escutelo del embrión, se liberan al endospermo y llegan a la capa de aleurona. Allí, las GAs inducen la síntesis de enzimas hidrolíticos (amilasas y glucanasas principalmente) que son secretados al endospermo. En el endospermo, estos enzimas hidrolizan el almidón en azúcares sencillos, que a través del escutelo son aportados al embrión para su crecimiento.

Los brasinosteroides son un grupo de factores de crecimiento semejantes a las homonas esteroides animales, presentes en multitud de especies, desde algas a angiospermas. Hay brasinosteroides en la mayoría de órganos de la planta, pero donde mayor parece su concentración es en tejidos reproductivos como el polen o los de la semilla inmadura. Incluso a muy bajas concentraciones, los brasinosteroides muestran actividad promotora del crecimiento, elongación y diferenciación celular, entre otras. Se sabe que los brasinosteroides tienen un papel promotor del desarrollo del embrión porque al aplicarse de forma exógena aumenta la frecuencia de inducción de embriogénesis tanto a partir de

microsporas en diversas variedades de *Brassica napus*, como a partir de células somáticas en diversas especies de coníferas y arroz, así como de regeneración de ápices en diversas variedades de *Brassica oleracea* y lechuga.

Las proteínas de arabinogalactano (AGPs) son glicoproteínas de la matriz extracelular, con un elevado grado de glicosilación en forma de residuos de arabinosa y galactosa (arabinogalactanos). Están presentes en diversos tejidos reproductivos, incluyendo los ovulos. Dentro de los óvulos, estas sustancias son generadas de forma natural por el endospermo de la semilla, de donde son transportadas al embrión. Aunque tradicionalmente no han sido considerados como fitohormonas, lo cierto es que últimamente están siendo implicadas en cada vez más procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo de la planta. Se sabe que influyen en el desarrollo del embrión, concretamente durante las primeras etapas de la embriogénesis.

En ensayos in vitro con embriones androgénicos de especies como trigo o maíz, se ha evidenciado que la presencia en el medio de AGPs y de arabinogalactanos promueve la aparición de dichos embriones, y es esencial para su viabilidad y desarrollo. En colza, se ha demostrado que las AGPs están implicadas en diversos procesos cruciales para el desarrollo de los embriones androgénicos, como la formación de los patrones embriogénicos tempranos, y el posterior crecimiento bipolar a lo largo del eje apical-basal del embrión. Su papel como promotor de la embriogénesis no solo androgénica, sino también zigótica, quedó demostrado claramente cuando se observó que las AGPs presentes en medios de cultivos con microsporas androgénicas de maíz eran capaces de promover también la embriogénesis zigótica in vitro.

12.8. Resumen

La semilla es una estructura de forma y tamaño muy variable. Es el recipiente en el que se forma, protege y transporta el embrión hasta el momento de la germinación. En este tema hemos visto que la semilla presenta tres grandes partes, el epispermo o cubierta seminal, los tejidos de reserva y el embrión, y hemos profundizado en la estructura y función de cada una de estas partes, tanto en angiospermas como en gimnospermas. Junto con el desarrollo del embrión, un papel fundamental de la semilla es la acumulación de sustancias nutritivas de reserva para asegurar el aporte de nutrientes al embrión cuando llegue el momento de la germinación. Durante la etapa de la maduración, la semilla almacena reservas de tipo principalmente amiláceo, pero también de naturaleza proteica y lipídica, en tejidos especializadas para ello. En muchas especies estos tejidos son del endospermo. En otras, de los cotiledones.

Una de las principales características de las semillas es su capacidad para reducir su metabolismo y permitir al embrión entrar, tras la maduración, en una fase de reposo hasta que se den las condiciones ambientales adecuadas para retomar la actividad y germinar. Al tiempo que una semilla es capaz de permanecer en latencia sin perder capacidad germinativa se le denomina longevidad.

La longevidad es distinta para cada especie, y depende también del modo de dispersión que adopte para las semillas. De forma semejante a lo que vimos con la polinización, las plantas también han desarrollado muy variadas estrategias para que sus semillas sean dispersadas por agentes físicos (viento, agua) o bióticos, animales.

La última etapa dentro del ciclo de la reproducción de las plantas es la germinación del embrión. Según el lugar principal de almacenamiento de las sustancias de reserva de las semillas, la germinación puede ser hipogea, cuando los cotiledones con función almacenadora quedan bajo tierra, o epigea si los cotiledones emergen de tierra y crecen como hojas fotosintéticas, antes de dar paso a la aparición de los verdaderos nomófilos.

12.9. Información adicional

- Borderies G., le Bechec M., Rossignol M., Lafitte C., Le Deunff E., Beckert M., Dumas C., Matthys-Rochon E. 2004. Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. European Journal of Cell Biology, 83: 205-212.
- Font Quer P. 1975. Diccionario de botánica. Editorial Labor, Barcelona.
- García Breijo F.J. Curso online de Biología y Botánica.
  Disponible en: http://www. etsmre upv.es. biología.
  Tema 16: Latencia en yemas y semillas.
  Tema 17: Maduración y germinación de las semillas.
- Hays D.B., Reid D.M., Yeung E.C., Pharis R.P. 2000. Role of ethylene in cotyledon development of microspore-derived embryos of *Brassica napus*. Journal of Experimental Botany, 51: 1851-1859.
- Hays D.B., Mandel R.M., Pharis R.P. 2001. Hormones in zygotic and microspore embryos of *Brassica napus*. Plant Growth Regulation, 35: 47-58.
- Letarte J., Simion E., Miner M., Kasha, K.J. 2006. Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum L.)* microspore culture. Plant Cell Reports, 24: 691-698.
- Moore, T.C. 1989. Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer Verlag, New York.
- Núñez M., Siqueira W.J., Hernández M., Zullo M.A.T., Robaina C., Coll F. 2004. Effect of spirostane analogues of brassinosteroids on callus formation and plant regeneration in lettuce (Lactuca sativa). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 78: 97-99.

- Paire A., Devaux P., Lafitte C., Dumas C., Matthys-Rochon E. 2003. Proteins produced by barley microspores and their derived androgenic structures promote in vitro zygotic maize embryo formation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 73: 167-176.
- Ramesar-Fortner N.S., Yeung E.C. 2006. Physiological influences in the development and function of the shoot apical meristem of microspore-derived embryos of *Brassica napus* 'Topas'. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique, 84: 371-383.
- Reproduccion sexual - Hipertextos del Área de la Biología (recurso online). http://www.biologia.edu.ar/reproduccion/sexual.htm
- Sasaki H. 2002. Brassinolide promotes adventitious shoot regeneration from cauliflower hypocotyl segments. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 71: 111-116.
- Strassburger E. 1994. Tratado de Botánica. 8ª edición. Omega, Barcelona.
- Suárez M.F., Bozhkov P.V. 2008. Plant embryogenesis. Totowa, NJ: Humana Press.
- Tang X.C., He Y.Q., Wang Y., Sun M.X. 2006. The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. Journal of Experimental Botany, 57: 2639-2650.
- The Life Cycle of Plants (recurso online). http://www2.bgfl.org/bgfl2/custom/resources_ftp/client_ftp/ks2/science/plants_pt2/index.htm
  En este portal se incluyen diversas animaciones relativas al ciclo vital de las plantas. Hay dos en concreto útiles para ilustrar dos de los aspectos tratados en este tema:
  - Seed Growth
  - Seed dispersal

TEMA 13. El fruto

En este último tema dedicado a la biología reproductiva de las plantas, vamos a ver los aspectos más relevantes del fruto, estructura auxiliar en el ciclo sexual vegetal, pero cuyo papel no por ello es irrelevante. La presencia de fruto es otra de las diferencias entre las angiospermas y el resto de las plantas. Es también parte, junto con las flores, del éxito evolutivo de las angiospermas. De hecho, el fruto contribuye decisivamente a la correcta protección, diseminación y germinación de las semillas. Igual que vimos que muchas flores son un eficaz instrumento para atraer vectores bióticos para la polinización, muchos frutos tienen como función principal atraer de forma activa animales para la dispersión de las semillas. Otros frutos, como vimos en el tema anterior, están diseñados para aferrarse al pelaje o plumaje de los animales, o para aumentar su flotabilidad en el aire y ser así más eficazmente dispersados por el viento. Aparte de su función biológica, los frutos tienen un peso enorme en la alimentación humana, tanto para su consumo en fresco como para su procesado industrial. Tienen por tanto un gran impacto en la agricultura y la economía.

Al igual que vimos que la semilla es en origen un óvulo, el fruto corresponde al ovario transformado y maduro. Después de la doble fecundación en las angiospermas, comienza la transformación de ovario a fruto. En ocasiones, al ovario también se le puede agregar algún otro tejido floral del cáliz o el receptáculo como elemento constituyente del fruto.

Las gimnospermas presentan los óvulos desnudos, no incluidos en un ovario. Por tanto las semillas que producen están también desnudas, y no se puede hablar de frutos en estas plantas. Sin embargo, algunas gimnospermas, al igual que ciertas angiospermas que veremos más adelante en este tema, presentan estructuras que se asemejan a frutos o son en ocasiones confundidos con ellos.

Figura 13.1: Pseudofrutos de (A) ciprés (*Cupressus sempervirens*) y (B) enebro (*Juniperus californica*).
Imagen A de dominio público y B de Clinton Steeds bajo licencia Creative Commons Attribution 2.0 Generic, ambas en Wikimedia Commons.

A estas estructuras se les denomina *falsos frutos* o *pseudofrutos*. Por ejemplo, el cono o estróbilo femenino de las coníferas (Figura 8.5) no es un fruto, sino una inflorescencia, aunque contenga las semillas en sus escamas ovulíferas, las proteja hasta que se abren e incluso ayude a su dispersión.

En algunos casos (por ejemplo en el ciprés, Figura 13.1A), estas escamas pueden llegar a soldarse y formar estructuras con apariencia de frutos, llamadas *gálbulos* o *arcéstidas*, que pueden incluso ser carnosos (como los del enebro, Figura 13.1B). En el tejo, las semillas aparecen rodeadas por un desarrollo carnoso procedente de su base, que puede confundirse con un fruto, pero que en realidad se trata de una estructura denominada arilo. Las gimnospermas, en definitiva, carecen de fruto. Así pues, en este tema nos centraremos en los frutos verdaderos, los presentes en angiospermas.

13.1. Morfología externa del fruto

Al igual que las semillas que contienen, los frutos son enormemente variables en cuanto a forma, tamaño color y textura (Figura 13.2). Podemos encontrar frutos que apenas alcancen un milímetro, como los de algunas gramíneas, los aquenios de la fresa (ver apartado 13.3.1.3.1 y Figura 13.19) o los utrículos de

Figura 13.2: Diversidad morfológica de los frutos. Imagen de un puesto de frutería en el mercado de la Boquería, en Barcelona.
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

Lemna y *Wolffia* (ver apartado 13.3.1.3.6). En el extremo opuesto podemos encontrar frutos de dimensiones considerables y varios kilogramos de peso, como los de algunas variedades de calabaza, piña, melón o sandía, que puede incluso exceder los veinte kilogramos en algunos casos. En cuanto a longitud, hay leguminosas como *Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*, cuyas vainas pueden exceder el metro de longitud (Figura 13.3).

La forma también puede ser altamente variable. Aunque la más común es la esférica o ligeramente ovalada, se pueden encontrar formas desde extremadamente alargadas (Figura 13.3) hasta totalmente aplanadas (Figura 12.14B), pasando por formas muy complejas o totalmente irregulares, como el fruto de *Anona reticulata* (Figura 13.4A) o "raras", como el de *Pandanus utilis* (Figura 13.4B). La superficie externa de la mayoría de los frutos, y sobre todo de los carnosos, suele ser lisa (Figura 13.2). No obstante, también hay una gran variabilidad: verrugosas (Figura 13.4A), rugosas (Figura 13.4B), pubescentes (Figura 13.7A), espinosas (Figuras 13.22, 27 y 31), etc.

Figura 13.3: Frutos alargados de *Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*.
Imagen de Forest & Kim Starr bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported, en Wikimedia Commons.

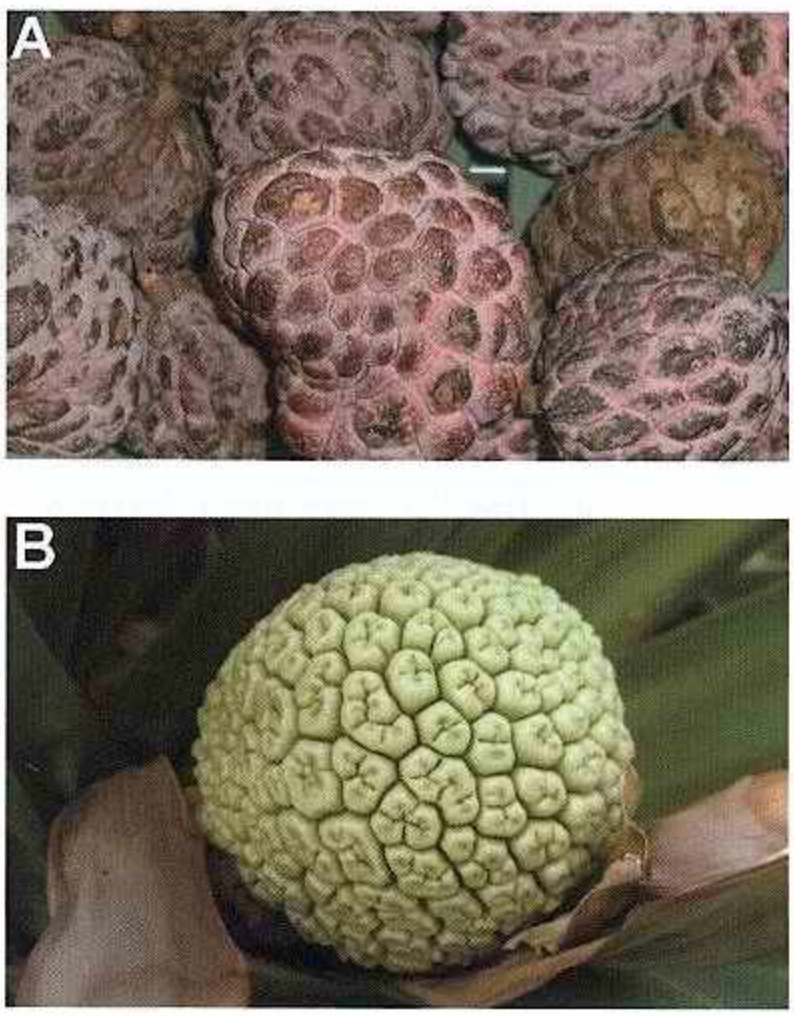


Figura 13.4: Frutos de (A) *Anona reticulata* y (B) *Pandanus utilis*.
Imagen A de Tree-species y B de Auswandern Malaysia, en Flickr.com bajo licencia Creative Commons Attribution

13.2. Anatomía del fruto

Anatómicamente, un fruto típico está formado por la semilla, dentro de un tejido denominado *pericarpo* (o pericarpio), derivado exclusivamente de la pared del ovario, modificada tras la fecundación. Sin embargo, en los casos de frutos de ovario ínfero hay también presentes en el fruto otra serie de tejidos extracarpelares asociados. Por ello, en un intento de uniformizar el concepto, se tiende a utilizar el término *pared del fruto* para aludir a toda aquella parte del fruto que rodea a las semillas, independientemente de su ontogenia. A su vez, la pared del fruto consta de tres partes diferenciadas (Figura 13.5) que rodean la semilla, el *endocarpo* (o endocarpio), *mesocarpo* (mesocarpio) y el exo*carpo o epicarpo* (o epicarpio).

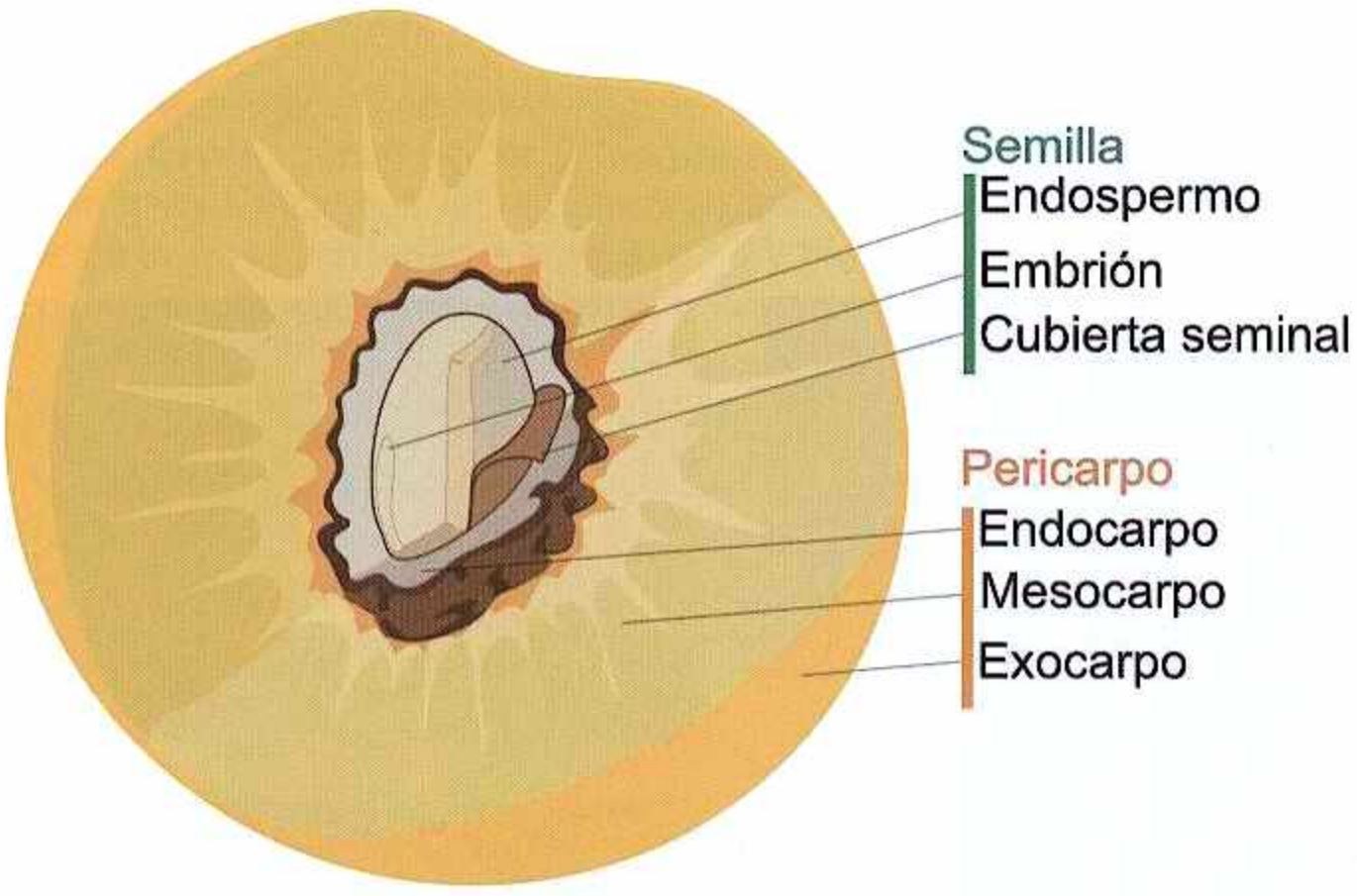


Figura 13.5: Anatomía de un fruto típico (drupa).
Imagen de LadyofHats, de dominio público en Wikimedia Commons.

El endocarpio es la parte más interna, la que está en contacto directo con la semilla rodeándola. Correspondería, pues, a la cara interna (adaxial) de la hoja carpelar original del ovario. Puede constar de una o varias capas de tejido. En algunas especies, por ejemplo las del género *Prunus* (Figuras 13.5 y 13.12D), se puede lignificar, dando lugar al hueso (*pireno*) duro y resistente que cubre la semilla. En otras puede desarrollar una textura carnosa y suculenta, como en el caso de la uva (*Vitis vinifera*) o el del los cítricos (*Citrus* sp., Figura 13.8), aunque en estos últimos lo que realmente se desarrollan son una especie de vesículas carnosas engrosadas.

El mesocarpio es la capa intermedia del pericarpio. Deriva del mesófilo de la hoja carpelar. Su presencia es muy escasa en los frutos secos y abundante en los carnosos. En el mesocarpo se localizan gran parte de los compuestos que darán el sabor, aroma y textura final del fruto maduro.

El epicarpio o exocarpio es la parte más externa del fruto. Deriva de la cara externa (abaxial) de las hojas carpelares. En algunos casos consta únicamente de la epidermis, y en otros comprende también los tejidos subyacentes. Por ser la parte externa, visible del fruto, en la superficie del epicarpio se concentran los atractivos visuales (color, brillo, textura, etc.) destinados a llamar la atención del animal que tendrá que acercarse a consumir el fruto, atraído por su aspecto. La consistencia del epicarpio permite también dividir los frutos en secos (con epicarpio duro) o carnosos (con epicarpo carnoso).

13.3. Tipos de fruto

De acuerdo con F. Ehrendorfer, en la clasificación de los frutos que hace en el *Tratado de Botánica* de E. Strasburger, la plasticidad y relativa "juventud" filogenética de los frutos en angiospermas haría muy complejo tratar de clasificarlos en base a criterios naturales. Por ello, propone una clasificación basada en la anatomía, morfología y ecología (modos de diseminación principalmente) del fruto. De acuerdo con esto, la primera distinción importante entre los frutos tendría que ver con su origen carpelar. Así, se distinguirán (1) *frutos cori-cárpicos* (o *apocárpicos*), que provienen de gineceos mono o pluricarpelares, pero cuyos carpelos están libres, no soldados, formando cada uno de ellos un pistilo independiente y después un fruto; (2) *frutos cenocárpicos*, cuyos carpelos están fusionados formando una única cavidad, y (3) *infrutescencias*, frutos compuestos formados por el conjunto de los ovarios transformados de las flores que compusieron originalmente la inflorescencia. A su vez, dentro de cada una de estas divisiones se podrían contemplar frutos dehiscentes e indehiscentes, según se abra o no la pared del fruto en el momento de la maduración a lo largo de líneas o suturas definidas, o incluso se desprenda, para permitir la liberación de las semillas. También podríamos encontrar dentro de estos grupos frutos secos y carnosos, en función de la textura de dicho pericarpo en el fruto maduro (formado por células muertas y de aspecto seco, o por células vivas y de aspecto suculento, jugoso), y frutos unispermos y plurispermos, según contengan una o más semillas.

Esta clasificación, aunque bastante lógica, resulta en la práctica algo enrevesada, excediendo el nivel de complejidad que se pretende tenga este libro. La describimos para ilustrar en base a qué parámetros se elaboran las clasificaciones de los frutos. Sin embargo, en este libro optaremos por mostrar una clasificación más sencilla y comprensible (Figura 13.6), basada fundamentalmente en criterios morfológicos y anatómicos, y dejando de lado criterios como el origen o modo de diseminación. Es importante reseñar que puede haber distintas clasificaciones de los frutos en función de los criterios que se utilicen para ello. La que mostramos a continuación es una clasificación simplificada de los

principales tipos de fruto basada en la que utilizan diversos libros de texto de botánica general y la mayoría de los manuales de identificación de plantas. Serán algunos los frutos concretos que no se ajusten totalmente a las grandes categorías que estableceremos a continuación. Esto será especialmente evidente en casos como las bayas y las drupas. Este hecho resulta inevitable en una clasificación simplificada como la que aquí se plantea. Pero también refleja dos aspectos importantes. En primer lugar, la enorme variabilidad de los frutos de las angiospermas, que hace casi imposible encontrar criterios que los engloben a todos sin generar ambigüedades. En segundo lugar, la dinámica inherente al conocimiento científico, que hace que determinados conceptos estén en constante revisión y evolución, hasta que finalmente son aceptados por la gran mayoría de la comunidad científica. Veremos a continuación varios ejemplos de esto.

<table>
<tr><td colspan="3">Frutos simples</td><td rowspan="2">Frutos agregados</td><td rowspan="2">Frutos múltiples</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Carnosos</td><td colspan="2">Secos</td></tr>
<tr><td>Dehiscentes</td><td>Indehiscentes</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Baya</td><td>Legumbre</td><td>Aquenio</td><td>Polidrupa</td><td>Sorosis</td></tr>
<tr><td>Drupa</td><td>Silicua</td><td>Antocarpo</td><td>Poliaquenio</td><td>Sicono</td></tr>
<tr><td>Pomo</td><td>Cápsula</td><td>Cariópside</td><td>Cinorrodon</td><td></td></tr>
<tr><td></td><td>Folículo</td><td>Esquizocarpo</td><td rowspan="4"></td><td rowspan="4"></td></tr>
<tr><td rowspan="3"></td><td rowspan="3"></td><td>Sámara</td></tr>
<tr><td>Utrículo</td></tr>
<tr><td>Nuez</td></tr>
</table>

Figura 13.6: Clasificación de los frutos.

Una primera división de los frutos nos llevaría a establecer tres grandes categorías en función de cuantos ovarios y flores estén implicados en la formación del fruto, entendiendo como tal todo aquello que constituye una unidad de diseminación, independientemente de que presente tejido exclusivamente ovárico o de que intervengan también partes extracarpelares. Así pues, tendríamos (1) frutos simples, (2) frutos agregados o compuestos, y (3) frutos múltiples.

13.3.1. Frutos simples

Se trata de frutos únicos provenientes de una única flor con un único ovario, sin tener en cuenta el número de carpelos fusionados que compongan el ovario.

13.3.1.1. Frutos carnosos

En este caso, el fruto maduro presenta una pared blanda o carnosa en su totalidad o en su mayor parte. El fruto puede también contener tejidos extracar-

pelares, provenientes de otras partes de la flor pero que forman parte de la unidad de dispersión.

13.3.1.1.1. Baya

Las bayas son frutos de colores en general llamativos, de epicarpo muy delgado, a veces algo duro, y mesocarpo y endocarpo carnosos y a menudo jugosos. Puede contener desde una hasta muchas semillas. A este tipo de frutos pertenecen muchos de los frutos denominados *frutas*, como el kiwi, la uva, (Figuras 13.7A y B), la papaya o el caqui, entre otros muchos. Otros ejemplos de bayas no considerados como fruta son solanáceas como el tomate, la berenjena (Figuras 13.7C y D) o el pimiento, los dátiles de las palmeras, los frutos de *Berberis*, de algunas anonáceas o *Actaea*. En función del número de carpelos que compongan originariamente el ovario, podremos encontrar *bayas monocarpelares* como los frutos de *Berberis*, *bayas bicarpelares*, como el tomate, *bayas tricarpelares*, como en el caso del dátil, o *bayas pluricarpelares*, como en el caqui. Existen variantes específicas de bayas a las que por sus peculiaridades se les han asignado nombres específicos:

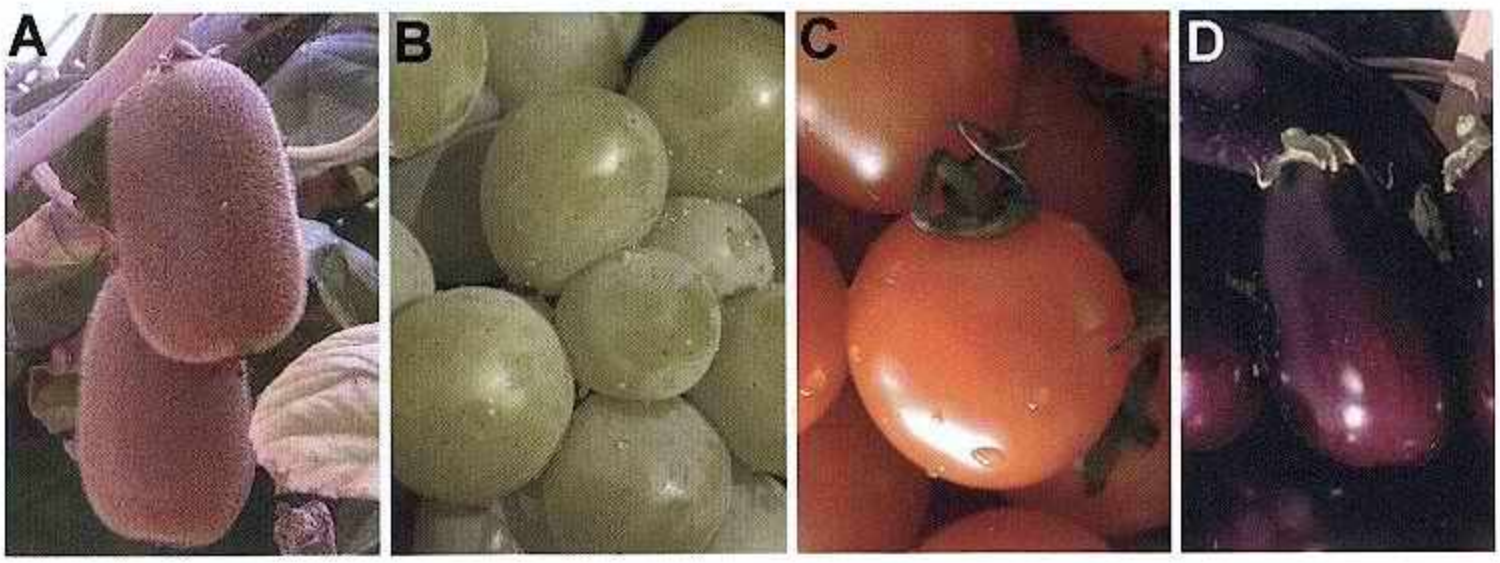


Figura 13.7: Frutos de tipo baya. A: kiwi (*Actinidia deliciosa*). B: uva (*Vitis vinifera*). C: tomate (*Solanum lycopersicum*). D: berenjena (*Solanum melongena*).
Imágenes de dominio público, todas en Wikimedia Commons.

Hesperidio: Son bayas procedentes de ovarios cenocárpicos de tipo sincárpico. El epicarpo es delgado, glandular y rico en aceites y esencias que dan al fruto un aroma muy característico. Presentan un mesocarpo esponjoso y un endocarpo muy engrosado, membranoso y repleto de vesículas filamentosas cargadas de pulpa líquida y con grados variables de acidez y dulzor. Estamos hablando esencialmente de los cítricos (Figura 13.8). Naranjas, limones, pomelos o mandarinas son hesperidios, en los que el epicarpo sería la cubierta naranja de las naranjas o amarilla de los limones, el mesocarpo sería la corteza blanquecina y de textura semejante al corcho que hay por debajo, y el endocarpo sería la pulpa, cargada de zumo y separada en gajos membranosos por los septos antes mencionados.

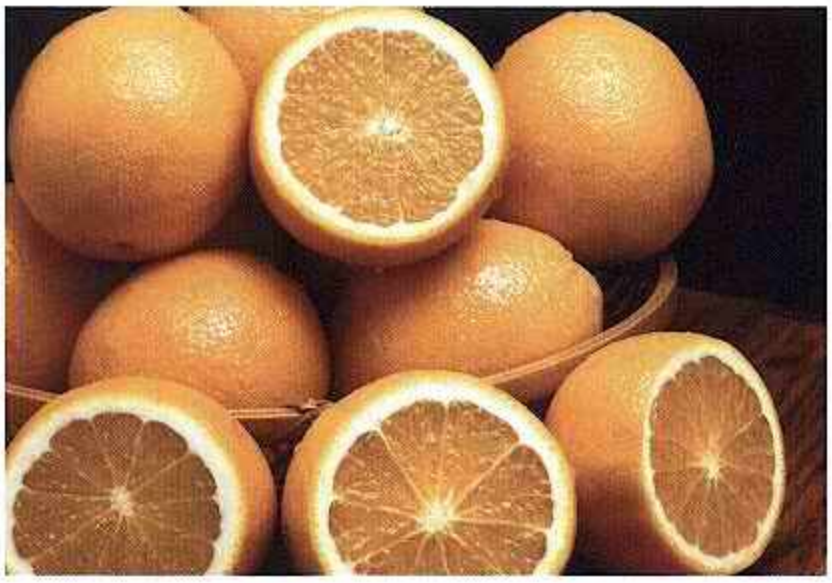


Figura 13.8: Bayas tipo hesperidio: naranjas.
Imágenes de dominio público en Wikimedia Commons.

Pepónide: Bayas procedentes de ovarios ínferos y sincárpicos, formados por entre tres y cinco carpelos, y cuyas placentas se desarrollan enormemente, pudiendo ocupar casi todo el lóculo. Estamos hablando básicamente de las cucurbitáceas como la sandía, el melón, el pepino, el calabacín, y los distintos tipos de calabazas. Dentro de este grupo podemos encontrar los frutos más grandes que se conocen (Figura 13.9). Algunos de estos tipos presentan un epicarpo endurecido, a veces incluso leñoso, como en la calabaza vinatera (*Lagenaria siceraria*). En otros casos de calabazas puede también reabsorberse el contenido de los lóculos quedando las semillas dentro de una gran cavidad central.

Figura 13.9: Exposición de calabazas (*Cucurbita pepo*) gigantes. Obsérvese el peso (señalado por la flecha) de la primera de la izquierda, cercano a 70 kg.
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

Balausta: Es el caso particular de la granada (*Punica granatum*). Pese a que algunos autores la consideran una baya estrictamente, lo cierto es que presenta una serie de diferencias que hacen que muchos otros autores la definan como un tipo especial, la balausta (Figura 13.10). Estas diferencias comprenden la presencia de un cáliz persistente, un endocarpio semejante al del pomo (apartado 13.3.1.1.3), varias particiones membranosas internas, semillas con un episperma vesícular jugoso (la parte comestible de la granada), y un exocarpio correoso similar al de los hesperidios, que puede llegar a presentar un aspecto apergaminado en el fruto maduro de algunas variedades.

Pseudobaya: se denomina así a aquellas bayas que provienen de ovarios ínferos, como la guayaba (*Psidium guajaba*), el higo chumbo (*Opuntia ficus-indica*, Figura 13.11) o la banana (*Musa x paradisiaca*). La banana es un fruto partenocárpico (apartado 13.5), que cuaja sin fecundación, y por tanto sin semillas.

Figura 13.10: Baya tipo balausta: granada.
Imagen de retyen Flickr CC BY.jpgJohannrela bajo licencia Creative Commons Attribution 2.0 Generic, en Wikimedia Commons.

Figura 13.11: Pseudobaya de higo chumbo.
Imagen de Retyen bajo licencia Creative Commons Attribution, en Flickr.com.

13.3.1.1.2. Drupa

Son frutos de mesocarpo carnoso y epicarpo delgado, que presentan solo una semilla (uniseminados), y su endocarpo es de consistencia ósea. Por ello a estos frutos se les conoce popularmente como *frutos de hueso*. Ejemplos hay diversos en la familia de las rosáceas, y en concreto dentro del género *Prunus*, como el albaricoquero (*P. armeniaca*, Figura 13.12A), cerezo (*P. cerasus*, Figura 13.12C), melocotonero (*P. persica*, Figura 13.12D) o ciruelo (*P. domestica*). Otros ejemplos: aceitunas, mangos (Figura 13.12B) o almendras.

Algunos botánicos incluyen también en las drupas a las nueces, las pecanas, los dátiles, las nueces de macadamia y los pistachos. Los motivos para esta inclusión son su cubierta externa carnosa, verde y su endocarpo duro, incluso pétreo rodeando la semilla. De todos modos, existe una cierta controversia en

el encuadre de algunos de estos frutos en una u otra categoría. Por ejemplo, la Sociedad de la Macadamia de California considera que las nueces de macadamia son folículos. Algunos autores evitan la polémica de forma elegante denominándo a estos frutos *núculas* (nueces) *drupáceas*.

Figura 13.12: Frutos tipo drupa: A: albaricoque. B: mango. C: cereza. D: melocotón cortado, donde se observa el endocarpo óseo recubriendo la semilla.
Imágenes de dominio público en Wikimedia Commons.

13.3.1.1.3. Pomo

Son frutos procedentes de ovarios ínferos, en los que el receptáculo floral forma gran parte de la pared comestible del fruto (*hipanto*), y rodea a los cinco ovarios procedentes de cinco carpelos independientes de consistencia coriácea o apergaminada. Ejemplos: rosáceas como el manzano (*Malus domestica*, Figura 13.13), el peral (*Pyrus communis*), el níspero (*Mespilus germanica*) o el membrillo (*Cydonia oblonga*).

13.3.1.2. Frutos secos dehiscentes

Los frutos secos son aquellos en los que el pericarpio se seca y adquiere un aspecto coriáceo, apergaminado o incluso leñoso en el fruto maduro. Dentro de los frutos secos, podremos distinguir entre *dehiscentes* e *indehiscentes*. Los frutos secos indehiscentes son aquellos que no se abren al llegar al estado maduro para liberar las semillas. Lo veremos en la próxima sección. Por el contrario, en los dehiscentes la semilla está separada del pericarpio, y el fruto maduro se abre a lo largo de unas líneas de dehiscencia definidas para liberar las semillas. Dentro de los dehiscentes, podemos distinguir varios tipos, que veremos a continuación.

13.3.1.2.1. Legumbre

Es el fruto típico de las leguminosas o fabáceas, la tercera familia más grande del reino vegetal. El fruto es una vaina que consiste en una única hoja carpelar alargada y modificada, que se funde en los bordes. Pueden tener forma alargada, redondeada o de riñón (reniforme), como en *Melilotus albus* o *Medicago lupulina* (Figura 13.14). Otros ejemplos son los frutos de los géneros *Cercis*, *Erythrina*, *Bauhinia* o *Wisteria* entre otros muchos.

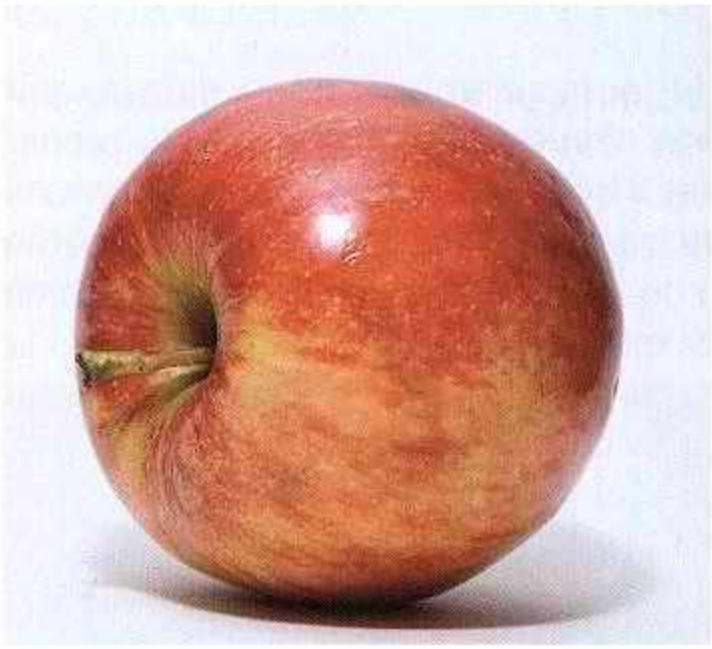


Figura 13.13: Pomo: manzana
Imagen de Abhijit Tembhekar bajo licencia Creative Commons Attribution 2.0 Generic, en Wikimedia Commons.

Figura 13.14: *Medicago lupulina*
Imagen de Forest & Kim Starr bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported, en Wikimedia Commons.

Existen también *legumbres indehiscentes*, que no se abren para dispersar las semillas. Derivan de ovarios súperos unicarpelares. Suelen ser espiraladas, contener varias semillas y son propias de especies como *Enterolobium contortisiliquum* (Figura 13.15).

Figura 13.15: Legumbre de *Enterolobium contortisiliquum*
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

Existe un tipo particular de legumbre denominado *lomento*, que se caracteriza por ser indehiscente y septado, con tabicación transversal. Cuando el fruto está maduro, el fruto se separa en distintas partes articuladas, de modo que cada parte contiene una semilla. Es el caso de por ejemplo *Adesmia muricata o Desmodium cuspidatum*. El *lomento drupáceo* es un tipo de lomento también indehiscente, septado y articulado, pero que presenta una continuidad en el mesocarpo (carnoso) y epicarpo (coriáceo o apergaminado). Es el caso de especies de *Prosopis* como el algarrobo (*Prosopis flexuosa*).

13.3.1.2.2. Silicua

Fruto dehiscente, seco, delgado y alargado, que por su apariencia externa podría recordar a las vainas de las legumbres. Sin embargo, las silicuas proceden de dos carpelos (uno en las legumbres), son biloculares y presentan una membrana (falso tabique o *replo*) que separa ambos lóculos, y del cual están suspendidas las semillas. Es el fruto típico de la familia de las crucíferas, como *Arabidopsis thaliana* (la planta modelo por excelencia a nivel experimental) la col (*Brassica oleracea*), las distintas mostazas (*B. alba, B. nigra* y *B. juncea*) o la colza (*Brassica napus*, Figura 13.16), una de las oleaginosas más importantes. La *silícula* sería una versión reducida (menos alargada) de la silicua, que se da en *Lobularia, Lepidium* y la bolsa de pastor (*Capsella bursa-pastoris*).

Figura 13.16: Silicua en colza.
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

13.3.1.2.3. Cápsula

Fruto pluricarpelar, sincárpico, cuya vaina puede abrirse a lo largo de varias líneas de dehiscencia definidas por las suturas carpelares. Así la dehiscencia puede ser *septicida, poricida, loculicida, septifraga, ventricida* o *circuncisa* (ver apartado 13.7) en función de la especie. La dehiscencia es tan variada porque las cápsulas son comunes en familias de plantas muy diferentes, como los distintos árboles y arbustos de los géneros *Catalpa, Jacaranda, Pittosporum, Aesculus, Ricinus y Eucalyptus*, o plantas suculentas de los géneros *Agave* y *Yucca*. Un ejemplo típico es la adormidera (*Papaver somniferum*, Figura 13.17), que produce una cápsula de dehiscencia poricida en la que las pequeñas semillas van saliendo por los poros de la cápsula al ser ésta agitada por el viento.

Cabe señalar que algunas especies presentan cápsulas indehiscentes, en las que los carpelos no se separan y las semillas no se liberan. Dos ejemplos son los baobab de Sudáfrica (*Adansonia digitata*) y dos especies de gardenias sudafricanas (*Gardenia thunbergii* y *G. volkensii*). En el caso de estas gardenias, la dispersión se produce al ser las cápsulas consumidas por herbívoros, que dispersan las semillas con sus heces.

13.3.1.2.4. Folículo

Consiste en un ovario monocarpelar que al madurar se abre a lo largo de su única sutura. El folículo se puede presentar en forma de ovarios únicos (como en *Asclepias syriaca*, Figura 13.18) en grupos de dos, como en adelfa (*Nerium oleander*), o de hasta cinco en peonía (*Paeonia suffruticosa*) o en el género *Brachychiton*.

Figura 13.17: Cápsulas en adormidera
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

Figura 13.18: Folículos cerrados (izquierda) y abiertos (maduros) de *Asclepias syriaca*.
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

13.3.1.3. Frutos secos indehiscentes

Los frutos secos indeshiscentes contienen generalmente una sola semilla, en estrecho contacto con el pericarpo. En estos frutos, el pericarpio no se llega a abrir en el fruto maduro.

13.3.1.3.1. Aquenio

Los aquenios son frutos nuculares generalmente pequeños, secos e indehiscentes, procedentes de carpelos únicos. Contienen una sola semilla, no adherida a la pared del fruto. Los aquenios suelen por lo general encontrarse en grupos (*poliaquenios*), dispuestos en la superficie de receptáculos inflorescentes engrosados y planos, cóncavos o convexos. Los poliaquenios son relativamente frecuentes, aunque quizás el ejemplo más típico sea la fresa (*Fragaria spp.*, Figura 13.19), formada por un engrosamiento del receptáculo de la inflorescencia, que se torna carnoso y jugoso. Sobre la superficie de éste se disponen cada una de las flores que se transformarán en frutos, dando cada uno de estos un

aquenio. Es decir, los aquenios serán cada una de las diminutas motas ovaladas que se disponen sobre la superficie de la fresa (Figura 13.19). Algunos autores engloban a los aquenios junto con otros frutos dentro del término *núcula* (especie de nuez pequeña).

Otro grupo representativo son las compuestas (Compositae o Asteraceae), en el que destaca el girasol (*Helianthus annuus*). En el girasol, cada uno de los frutos (las pipas del girasol) sería un tipo especial de aquenio denominado *cipsela*. La diferencia con los aquenios propiamente dichos sería que las cipselas provienen de ovarios ínferos y están formadas en general por dos carpelos y no uno.

Figura 13.19: Aquenios sobre fresa.
Imagen de Rob Owen-Wahl bajo licencia SXU, en www.stock.xchng.hu.

13.3.1.3.2. Antocarpo

El antocarpo (también denominado *diclesis*) es el conjunto formado por un aquenio (seco, de ovario súpero y uniseminado) en el que la base del perianto de las flores (que son apétalas y tienen un cáliz tubular petaloide) se endurece y rodea de forma persistente al aquenio. Este conjunto es el que constituye la unidad de dispersión. Es frecuente en la familia de las nictagináceas (*Mirabilis, Pisonia*). En algunos miembros de esta familia, la base persistente del cáliz presenta apéndices glandulares que producen sustancias pegajosas que ayudan a la dispersión adheriéndose al cuerpo de los animales. Por ejemplo, *Pisonia umbellifera* es un árbol cuyos numerosos antocarpos (Figura 13.20) son muy pegajosos y se adhieren a las plumas de las aves marinas. Este es un método muy eficaz para la dispersión hacia los atolones e islas lejanas de la región del Pacífico Sur. Sin embargo, en ocasiones es tal la cantidad de antocarpos que quedan pegados al plumaje de las aves marinas que a éstas se les hace muy difícil o imposible el vuelo. Al no poder deshacerse de los antocarpos, cuyo adhesivo es resistente al agua, el ave acaba ahogándose en el agua y siendo devorada por los cangrejos de playa.

Figura 13.20: Antocarpos de *Pisonia umbellifera*.
Imagen de Forest & Kim Starr bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported, en Wikimedia Commons.

13.3.1.3.3. Cariópside o grano

Son frutos secos indehiscentes pequeños o muy pequeños, en los que la cubierta de la semilla única que contienen se funde completamente con el pericarpio. La capa externa del pericarpo se conoce como la cáscara o *salvado*, mientras que el interior se llama el *germen*, pues es donde va la semilla y por tanto el embrión. El grano en sí es en realidad un fruto, pero el hecho de tener un pericarpio tan delgado hace que a menudo se confunda con la semilla que contiene y que ocupa la mayor parte del volumen del fruto. Este es el fruto característico de la gran familia de las gramíneas (Poaceae), y constituyen la primera fuente de alimentos para la población mundial. Ejemplos concretos de grano esenciales para la alimentación humana y animal son el maíz (Figura 13.21), el trigo, el arroz, el centeno, la cebada, la avena, o el sorgo. Existen además muchas otras gramíneas de uso no alimentario.

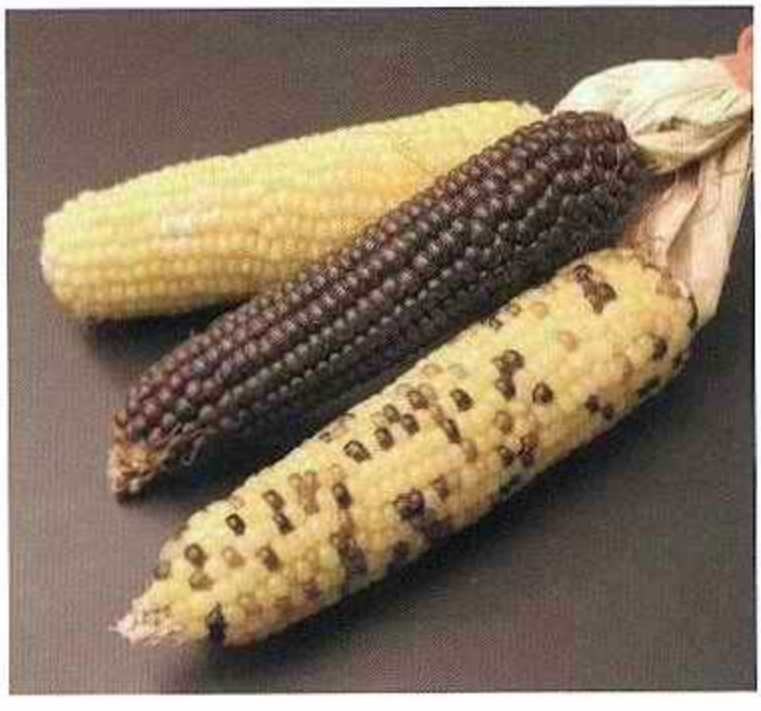


Figura 13.21: Diferentes tipos de grano en maíz.
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

13.3.1.3.4. Esquizocarpo o fruto fragmentable.

Es un fruto seco pluriseminado y procedente de un ovario pluricarpelar y sincárpico. Se define como parcialmente dehiscente porque al alcanzar la madurez, cada uno de los carpelos originales del fruto se separa de los demás, constituyendo cada uno una unidad de diseminación a la que se denomina *mericarpo*. Cada mericarpo contiene una sola semilla, y al fragmentarse permanece indehiscente. Este es el fruto característico de umbelíferas o apiáceas como la zanahoria (*Daucus carota*), el apio (*Apium graveolens*) o el hinojo (*Foeniculum vulgare*). Uno de los esquizocarpos más peligrosos (desde un punto de vista humano) es el abrojo (*Tribulus terrestris*, Figura 13.22). Una vez seco, el fruto espinoso se divide en mericarpos indehiscentes. Las espinas de cada mericarpo están dispuestas de modo que al caer al suelo una de ellas siempre estará orientada hacia arriba. Esto supone un peligro para los amantes del senderismo, pues estas espinas son lo suficientemente largas y duras como para atravesar fácilmente y sin romperse un pie descalzo, e incluso una suela no muy gruesa de zapato, y hasta un neumático de goma.

Figura 13.22: Esquizocarpo en abrojo.
Imagen de Forest & Kim Starr bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported, en Wikimedia Commons.

13.3.1.3.5. Sámara

La sámara es un fruto pequeño, comúnmente producido por árboles de dispersión anemócora. Para ello, las sámaras van provistas de prolongaciones membranosas en forma de ala, que permiten permanecer en el aire por más tiempo antes de alcanzar el suelo, gracias al movimiento rotatorio del ala similar al de las aspas de los helicópteros. Así se facilita la dispersión a más largas distancias. Las sámaras se asemejan morfológica y funcionalmente a las semillas aladas de los pinos. Sin embargo, son auténticos frutos, pues las semillas están cubiertas por un verdadero pericarpio. Son típicas de árboles como el fresno (*Fraxinus spp.*) o el olmo (*Ulmus spp.*). Hay casos en los que se producen frutos con varias sámaras (*polisámara*) como unidad de dispersión. Por ejemplo, en

el ailanto (*Ailanthus altisima*), la polisámara consta de hasta 5 sámaras, y de dos (sámara doble) en algunas especies de arce como *Acer saccharum* (Figura 13.24). El fruto del arce es otro caso interesante de discrepancias en cuanto a su clasificación. Por un lado, sus frutos maduros se dividen en dos carpelos indehiscentes con semilla, razón por la cual algunos autores los engloban dentro del grupo de los esquizocarpos (ver apartado 13.3.1.3.4). Pero por otro lado, cada uno de estos carpelos desarrolla un apéndice membranoso en forma de ala que los hace corresponder al grupo de las sámaras. También en este caso, la opción más conciliadora llega de mano de aquellos que definen un grupo especial de sámaras, las *sámaras esquizocárpicas*.

13.3.1.3.6. Utrículo

Se trata de frutos pequeños, de forma globosa, de semilla única y derivados de ovarios súperos y sincárpicos. Se caracterizan por presentar una pared del fruto muy delgada. Ejemplos de utrículos se dan en *Lemna* y *Wolffia*, plantas acuáticas de apenas pocos milímetros, y cuyos frutos son los más pequeños que se conocen (en torno a 0,2 mm). Otros ejemplos podemos encontrarlos en los géneros *Chenopodium* o *Amaranthus*, donde se agrupan en grandes cantidades, o en *Trifolium* y *Melilotus* (Figura 13.25).

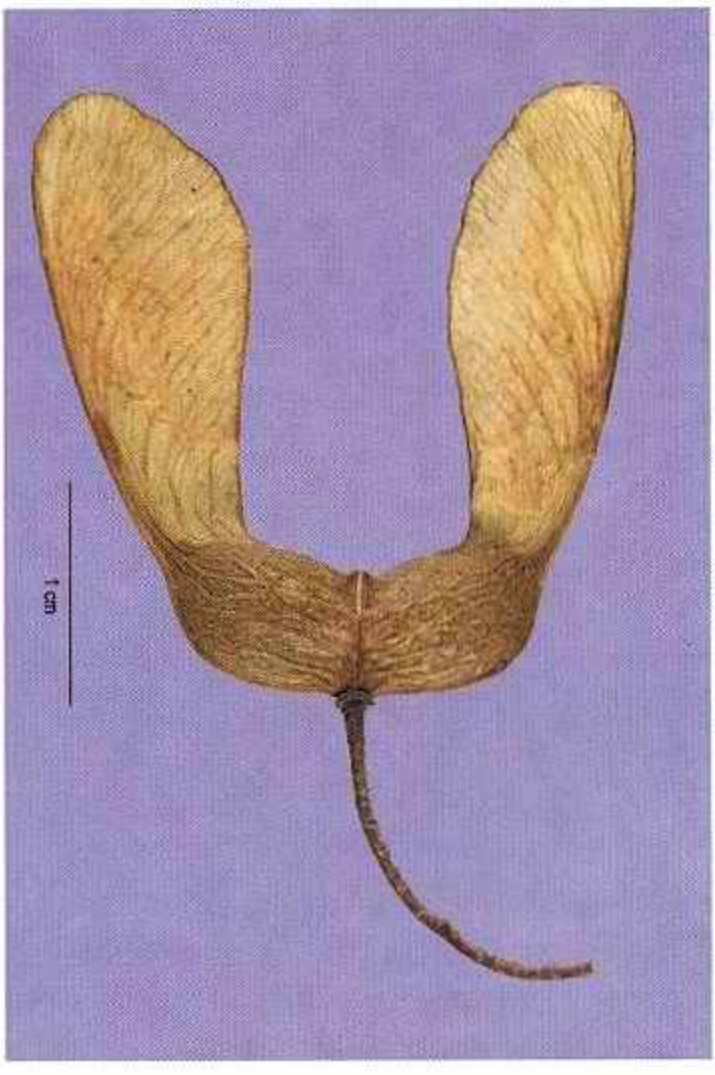


Figura 13.24: Sámara doble en *Acer saccharum*.
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

Figura 13.25: Utrículos en *Melilotus indica*.
Imagen de Forest & Kim Starr bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported, en Wikimedia Commons.

13.3.1.3.7. Nuez

Las nueces en general son frutos grandes, de semilla única, con el pericarpio muy duro, y usualmente englobado dentro de una cáscara o un involucro cóncavo. Es el fruto típico de las fagáceas. Muchos de ellos comprenden los frutos que vulgarmente se conocen y comercializan como "frutos secos", aunque ya hemos visto que botánicamente, los frutos secos engloban muchos más tipos. Dentro de las nueces podemos distinguir varios subtipos de morfología variable, que veremos a continuación.

- *Bellota* (Figura 13.26): Nuez de forma ovalada y superficie lisa, con un involucro acrescente en forma de copa (denominado *cúpula*), que recubre su extremo proximal, formando una especie de "boina" sobre el fruto. Algunos autores definen la bellota como *glande*. La bellota es típica de las distintas especies de *Quercus* (Figura 13.26). Aunque actualmente no es muy utilizada para el consumo humano, sí constituye una parte importante de la dieta de algunos animales de granja. Por ejemplo, el cerdo.
- *Castaña*: La castaña es cada una de las distintas nueces englobadas dentro de un involucro cóncavo y recubierto de largas espinas. El involucro puede cubrir el o los frutos en gran parte o en su totalidad, y se abre en el fruto maduro, dejando expuestas la o las castañas. Algunos autores lo denominan *trima*. La castaña es el fruto típico de especies de haya (*Fagus*) o de castaño (*Castanea*, Figura 13.27).
- *Avellana*: Es la nuez típica de las especies del género *Corylus*. Tiene una forma semejante a la bellota, aunque por lo general ligeramente más achatada, y de aspecto mucho más coriáceo. Aparece en un involucro de tipo foliáceo (como en *C. americana* o *C. avellana*, Figura 13.28) o tubular (como en *C. cornuta*). Algunos autores la denominan *diclesio*.
- *Nueces* (propiamente dichas) de las Juglandaceas como *Juglans regia* (nogal, Figura 13.29) y *Carya illinoinensis* (nuez pecana). Pese a su similitud con los tipos antes mencionados, muchos autores colocan a estas nueces en la categoría de las drupas (ver apartado 13.3.1.1.2), mientras que otros consideran que son verdaderos frutos secos. De nuevo, estamos ante un fruto que presenta características suficientes como para ser englobado en dos tipos de frutos distintos. En los verdaderos frutos secos, la capa dura indehiscente que rodea la semilla es la pared del ovario (pericarpio), y la cáscara exterior está formada por tejidos involucrales procedentes de otras partes de la flor distintas al ovario. De acuerdo con esto, estas nueces no serían frutos secos, pues su capa exterior verde (cáscara) procede del pericarpio, y la parte dura que rodea la semilla procede del endocarpio. Es por ello que se tiende a clasificar a estos frutos dentro de las drupas secas, en lugar de frutos secos verdaderos. Por ejemplo, en la clasificación de Richard Spjut de 1994 (ver sección 13.10, Información adicional), estas nueces se clasifican

como *pseudodrupas*. Sin embargo, otros investigadores afirman que la cáscara de la nuez se compone no solo del pericarpio, sino también de tejidos involucrales del perianto. Por tanto, contiene también parte de perianto, y por tanto la cáscara se debería considerar involucro, y al conjunto fruto seco. De todos modos, no hay que olvidar que ciertos aspectos concretos del conocimiento científico no están totalmente aceptados por toda la comunidad científica, y son periódicamente revisados en base a los nuevos datos que al respecto van surgiendo. Por tanto, no sería de extrañar que en los próximos años se cambiara de grupo una o varias veces más, hasta que las pruebas a favor de su inclusión en uno u otro grupo sean incontrovertibles.

Figura 13.26: Bellota en *Quercus alba*
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

Figura 13.27: Castaña de *Castanea sativa*
Imagen de Willow bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 Generic en Wikimedia Commons.

Figura 13.28: Avellana de *Corylus avellana*.
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

Figura 13.29: Nuez de nogal.
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

13.3.2. Frutos agregados o colectivos

Los frutos colectivos son aquellos que se forman a partir de un conjunto de ovarios que maduran conjuntamente, permaneciendo unidos. Tienen su origen en una flor única, individual, con gineceos apocárpicos (carpelos únicos o varios carpelos independientes, libres, formando cada uno un pistilo). En ella, cada carpelo da lugar a un fruto, pero todos los frutos permanecen unidos en todo momento, formando junto con otras partes engrosadas de la flor un fruto colectivo que se comporta como una única unidad de diseminación. Algunos autores los denominan genéricamente *eterios*. Dado que todos los ovarios con semillas (carpelos), forman un grupo fusionado, a estos frutos también se les conoce como *sincarpos* (conjunto de frutos soldados entre sí).

En las moras y las frambuesas (*Rubus*), los frutos individuales forman pequeñas drupas con una semilla cada una y al fruto agregado se le denomina *polidrupa* (Figura 13.30).

En las fresas (Figura 13.19) los frutos individuales son aquenios, como vimos en el apartado 13.3.1.3.1. Sin embargo, éstos se disponen en la superficie del receptáculo de la inflorescencia, que sigue creciendo después de ser fecundadas las flores, se engrosa y se torna carnoso, jugoso y dulce. Sobre él se sitúan entre 100 y 200 diminutas flores que se transforman en aquenios pequeños, amarillentos y ligeramente ovalados. El conjunto del receptáculo engrosado junto con los aquenios (poliaquenio) es lo que constituye la unidad de diseminación.

En el género *Rosa* se forman frutos agregados consistentes en núculas monocarpelares, dispuestas en número variable, dentro de un receptáculo de forma cóncava, carnoso y engrosado. A este fruto agregado se le denomina *cinorrodon* (Figura 13.31).

Figura 13.30: Polidrupa en *Rubus chamaemorus*
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

Figura 13.31: Cinorrodon de *Rosa canina*
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

Los frutos del género *Annona* (Annonaceae) tienen el aspecto de grandes bayas carnosas, con escamas o protuberáncias sobre su superficie. Es el caso de *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. reticulata* (Figura 13.4A) y *A. cherimola* (chirimoya). En realidad, son frutos agregados, formados por muchos ovarios fusionados

(sincarpo). Tampoco conviene confundirlos con los frutos múltiples, que veremos a continuación, pues provienen de una única flor, aunque con muchos pistilos.

13.3.3. Frutos múltiples

Los frutos múltiples están formados por un conjunto de ovarios maduros (frutos), en número variable, pero a diferencia de los frutos agregados, los ovarios de los frutos múltiples proceden de flores distintas, cada una de ellas con un único ovario, que se agrupan en una misma inflorescencia, por lo general alrededor de un eje engrosado y carnoso.

Ejemplos de este tipo de frutos son las moras (*Morus alba*) o las piñas tropicales (*Ananas comosus*, Figura 3.20). Las moras son frutos formados por pequeñas drupas individuales. En la piña, los frutos son bayas individuales incrustadas en un tallo carnoso y comestible. Cada baya está debajo de una bráctea de bordes dentados donde estaba insertada la flor original. El espádice carnoso de las especies del género *Monstera* como *M. deliciosa* o *M. obliqua* (Figura 13.32) es también un fruto múltiple, ya que deriva de numerosas flores femeninas estrechamente agrupadas. A este tipo de frutos múltiples se le conoce como *sorosis*.

Figura 13.32: Sorosis de *Monstera obliqua*
Imagen de dominio público en Wikimedia Commons.

Otro tipo de fruto múltiple es el *sicono* (Figura 3.35), típico de las higueras (*Ficus carica*). Los siconos son frutos comestibles, carnosos, con una morfología externa que recuerda a una botella en la que la unión al árbol se daría por el cuello de la botella. En realidad, los higos son inflorescencias, forradas por dentro con numerosas flores femeninas de tamaño diminuto. Al madurar, cada flor da lugar a una pequeña drupa uniseminada. La formación del sicono requiere de polinización por avispas en algunas variedades, mientras que en otras se forma el sicono por partenocarpia, sin polinización.

13.4. Desarrollo del fruto

Al proceso de transformación del ovario y desarrollo del fruto (Figura 13.33) se le denomina *cuajado*. Una vez se consuma la doble fecundación, la pared del ovario comienza a engrosarse y a madurar en paralelo al crecimiento de la semilla y al desarrollo del embrión en su interior. La energía para este proceso proviene de la planta donde el fruto se desarrolla. Por ello, su disponibilidad energética determinará el número de frutos que pueda producir. Esto, a su vez, condicionará el tamaño final de los frutos, pues la planta deberá repartir los recursos disponibles entre todos ellos. En lo que respecta a la transformación del ovario, podemos distinguir tres fases, cuya duración y relevancia será distinta en función del tipo de fruto.

En primer lugar se da fase de intensa división celular en la que el crecimiento del fruto es casi exponencial. Le sigue una segunda fase de expansión celular, en la que el fruto crece de forma lineal por expansión de las células formadas en la fase anterior. En esta fase se establece en gran medida el tamaño final del fruto. También se forman en algunos frutos espacios aéreos intercelulares (por degradación de las pectinas de las paredes celulares) que permiten una expansión celular más rápida. Es el caso, por ejemplo, de las manzanas. En tercer lugar se da una fase de maduración, en la que cesa el crecimiento y tienen lugar las transformaciones que acaban con el fruto maduro.

Como el resto de fases de desarrollo de los órganos reproductivos, el desarrollo del fruto también está regulado hormonalmente. La inducción de la primera fase de crecimiento parece estar estimulada por giberelinas, incluso en frutos partenocárpicos (ver apartado 13.5) Las auxinas tienen que ver con la promoción de la segunda fase y con el retraso de la caída (abscisión) del fruto. El ABA, por último, estimularía la síntesis de etileno, el cual es un fuerte promotor de la última fase (maduración) y de la abscisión final del fruto.

Estos cambios en el ovario van acompañados de otra serie de transformaciones en la flor, fundamentalmente de dos tipos: la pérdida de estructuras y la incorporación al fruto de tejido extracarpelar. El primer caso, la pérdida de estructuras, es común a todos los frutos, aunque no todos pierden las mismas. En general, se pierden todas aquellas estructuras que ya han cumplido su función y no son necesarias para los procesos posteriores (comparar Figuras 13.33B y C). Entre estas estructuras se encuentran los pétalos, que son de las primeras

piezas florales en caer tras la fecundación. Los pétalos entran en senescencia y se desprenden por la zona de abscisión que presentan en su base, en la zona de inserción en el receptáculo floral. Los estambres son otras de estas estructuras que generalmente se marchitan pronto y desaparecen. Más adelante lo harán el estilo y el estigma del pistilo. En algunos casos los sépalos se pierden.

En muchos otros persisten en el fruto maduro, como en la berenjena (Figura 13.7C), o el tomate (Figura 13.7D). Incluso hay casos como el de *Physalis* (Figura 3.7), en el que el cáliz, denominado *acrescente*, continúa creciendo hasta envolver la baya carnosa que forma el fruto.

Cuando el ovario es súpero, es este el que generalmente se transforma en fruto, sin la aportación de ningún otro tejido. Sin embargo, en frutos de ovario ínfero lo que suele suceder es que determinadas zonas extracarpelares de la flor asumen un gran crecimiento, y pasan a formar parte del fruto. Estas zonas extracarpelares se denominan *clamidocarpo*. Es típico de rosáceas como el membrillo (*Cydonia oblonga*), la manzana (*Malus sylvestris*), la pera (*Pyrus communis*) o el níspero (*Eriobotrya japonica*, Figura 13.33). En estas especies frutales, el tejido carnoso del fruto (Figura 13.33F) procede principalmente del crecimiento del eje floral. Los verdaderos carpelos quedan en el interior de este cuerpo carnoso, formando una cubierta apergaminada que rodea a las

Figura 13.33: Distintas etapas en el desarrollo del níspero (*Eriobotrya japonica*)
Imagenes de Forest & Kim Starr bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported, excepto B y F, de dominio público. Todas en Wikimedia Commons.

semillas. En otros casos, como el de *Pisonia umbellifera* (Figura 13.20) y en general de las Nictagináceas, el fruto (antocarpo) suele quedar envuelto de forma inseparable por el cáliz carnoso, coriáceo o leñoso, que persiste.

También puede formar parte del fruto alguna estructura ajena a la flor. Por ejemplo, las brácteas espinosas de la inflorescencia de los castaños (Figura 13.27) o de los abrojos (Figura 13.22), o incluso los extremos terminales de las ramas de la inflorescencia, como en el fruto de *Hovenia dulcis*, Figura 13.34).

Figura 13.34: Frutos de *Hovenia dulcis*
Imagen de Mauroguanandi bajo licencia Creative Commons Attribution 2.0 Generic, en Wikimedia Commons.

13.5. Partenocarpia

Hay especies que bajo determinadas circunstancias son capaces de inducir el desarrollo del fruto sin necesidad de fecundación previa y por tanto sin semillas en su interior. A este proceso se le denomina *partenocarpia*. En especies no partenocárpicas, tras la fecundación la semilla produce una serie de hormonas que, además de promover su propio desarrollo, estimulan el crecimiento de las paredes del ovario. En especies partenocárpicas, la síntesis de estas hormonas es asumida por otros tejidos, como la propia pared del ovario, al no haber semilla.

La partenocarpia puede ser *autónoma* o *vegetativa*, si la síntesis de estas hormonas se da sin necesidad de estímulo externo alguno. El pepino (*Cucumis sativus*) es un ejemplo de especie partenocárpica vegetativa. Puede ser *estimulada*, si hace falta un factor que la desencadene. Hay especies que para ser estimuladas hacia la partenocarpia necesitan de un estímulo externo como la polinización, que induce el desarrollo del ovario aunque luego dicha polinización no acabe en fecundación. Es el caso de las orquídeas, por ejemplo. Siempre sin llegar a la fecundación, puede ser necesario también la germinación del polen o el desarrollo parcial del tubo polínico. Otras especies no requieren de

polinización, pero hay estímulos ambientales, como las bajas temperaturas, capaces de promover la partenocarpia. Es el caso de pimientos, tomates o algunos cítricos.

En cualquiera de los casos, la inducción de partenocarpia en determinadas especies de interés agronómico puede ser interesante para producir frutos sin semillas, que aunque desde el punto de vista de la reproducción no tienen ningún valor, si lo tienen y mucho desde el punto de vista comercial. Los aspectos aplicados de la partenocarpia los veremos con más detalle en el tema 22.

13.6. Maduración del fruto y climaterio

Una vez concluida la fase expansiva del desarrollo del fruto, se alcanza la etapa de la maduración, fase previa a la senescencia y a la abscisión. Durante la maduración del frutose suceden una serie de cambios externos e internos de color, textura, tamaño, etc, que confieren al fruto maduro sus características finales (comparar los frutos en distinto estado de maduración en la Figura 13.33E). De entre estas características destacan desde un punto de vista comercial sus propiedades organolépticas. En esto influyen de manera decisiva una serie de procesos bioquímicos inherentes a la maduración como es la degradación de la clorofila. Al ir progresivamente desapareciendo la clorofila, el fruto va perdiendo su color verde y adopta otras tonalidades, variables en función de los pigmentos que ya tuviera presentes, pero que no se apreciaban al quedar enmascarados por la clorofila. Además, puede darse la síntesis de otros pigmentos, de tipo fenilpropanoide, como las antocianinas y los flavonoides, que confieren también sus tonalidades características.

Otros procesos madurativos son la descomposición en azúcares sencillos de los carbohidratos complejos (almidón fundamentalmente), la disminución de la acidez, la pérdida de astringencia, la síntesis y liberación de los compuestos volátiles relacionados con el sabor y aroma característico de cada fruto, y la degradación de pectinas y celulosas, componentes integrales de las paredes celulares que proporcionan al tejido su turgencia característica, y que al degradarse producen el típico ablandamiento del fruto maduro. Todo esto acarrea la senescencia de las células de la pared del fruto que provoca un ablandamiento general y finalmente la abscisión y caída del fruto al suelo, donde liberará sus semillas, o alternativamente, una apertura del fruto para liberar las semillas.

Durante las fases finales de la maduración de algunos frutos como las peras, las manzanas, los tomates, los plátanos o los aguacates, se produce una gran elevación de la respiración celular. A este fenómeno se le conoce como *climaterio*. Por tanto, a los frutos que sufren climaterio se les conoce como *frutos climatéricos*. El climaterio se considera como una etapa transicional entre la maduración y la senescencia. Otros aspectos asociados al climaterio son el cambio de patrones de expresión génica y el aumento de la síntesis proteica.

Existe otro tipo de frutos que no experimentan climaterio. Son los *frutos no climatéricos*. Son no climatéricos los cítricos en general, las uvas o las fresas, por

ejemplo. Estos frutos no muestran un incremento de la tasa respiratoria durante la maduración, sino que maduran de manera gradual y constante. En muchos de estos casos, la senescencia se suele desencadenar por invasiones de origen bacteriano y fúngico que conducen finalmente a la descomposición del fruto.

Es obvio que la maduración y el climaterio están relacionados, pero se desconoce de qué modo. Lo que sí se conoce es que la maduración puede retrasarse rebajando la intensidad del climaterio. Por ejemplo, con bajas temperaturas que reduzcan la tasa de respiración. En algunos frutos, incluso se consigue detener la maduración. Otra forma es reducir la disponibilidad de oxígeno para reducir la respiración. Así, se pueden conservar durante mucho tiempo los frutos almacenándolos en vacío, con poco oxígeno disponible. Otro factor estrechamente relacionado con la aparición del fenómeno climatérico es el etileno. De hecho, es el etileno el que induce el climaterio, de forma que los frutos climatéricos son capaces de sintetizar etileno durante la maduración, y no así los no climatéricos.

13.6.1. Etileno y maduración

El etileno es una hormona gaseosa (de fórmula química CH_2=CH_2) con un papel muy relevante en procesos como la respuesta al estrés, la activación de mecanismos de defensa, la maduración de los frutos (como veremos ahora) o el control de la senescencia y abscisión de flores (como vimos en el tema 5), hojas y frutos.

Al comienzo del siglo XX, existía la creencia de que los frutos verdes maduraban y mejoraban su aspecto y dulzor por efecto del calor. Así, algunos fruticultores instalaron costosos calefactores con la esperanza de acelerar la maduración. Y fracasaron. Sin embargo, otros que generaban calor quemando queroseno en estufas sí conseguían su propósito. Con el tiempo se constató que el inductor de la maduración no era el calor en sí, sino el hecho de calentar con queroseno, pues su combustión incompleta producía una serie de gases responsables directos de la maduración. Entre ellos, el etileno. En paralelo se observó que si se almacenaban frutos climatéricos junto con no climatéricos, los primeros aceleraban la maduración de los segundos. Si se almacenaban en cámaras separadas, los primeros maduraban mucho antes que los segundos. Aquí también se acabó identificando al etileno como responsable de la maduración. Desde mediados del siglo XX, no hay discusión al respecto de que el etileno promueve la maduración de los frutos. Los niveles máximos de etileno se alcanzan en plena maduración, aunque su síntesis comienza antes de la maduración, por ser precisamente esto lo que la induce. El efecto del etileno puede contrarrestarse con agentes como el dióxido de carbono (CO_2), antagonista del etileno.

En definitiva, el etileno es un efectivo inductor de la maduración, por su papel acelerador del climaterio. Esto tiene una gran repercusión en cuanto a la aplicación comercial del etileno como regulador de la maduración. Si se aplica exógenamente etileno a un fruto, se acelera su maduración. Por ejemplo, los

tomates se suelen recoger verdes (duros) para facilitar su transporte y evitar daños. En general, la fruta verde se transporta en cámaras que combinan bajas temperaturas con atmósferas ricas en CO_2 y pobres en oxígeno para que permanezca verde y no madure antes de tiempo. Posteriormente se madura artificialmente aplicándoles etileno. También se usa con cítricos como limones y naranjas, o con uvas o nueces, para que alcancen un estado de maduración óptimo antes de sacarlas al mercado. Una aproximación biotecnológica interesante a la maduración de los frutos es la creación de plantas incapaces de sintetizar etileno. Estas plantas requerirían la aplicación exógena del mismo, sin la cual nunca madurarían. De este modo podría asegurarse un control total sobre el tiempo de maduración de los frutos.

13.7. Senescencia y abscisión del fruto

La senescencia podría definirse como el proceso de apertura espontánea del fruto para dejar salir las semillas y que puedan ser dispersadas. Esto es especialmente importante en el caso de frutos carnosos, de paredes gruesas. La senescencia también puede ser climatérica o no climatérica, según sea inducida o no por etileno. Al igual que en la maduración, el etileno es el principal inductor hormonal de la senescencia climatérica. Las citoquininas tienen un papel antagonista, inhibiendo la senescencia cuando sus niveles son elevados. El equilibrio entre los radicales libres que se producen durante la degradación celular y los mecanismos antioxidantes encargados de su eliminación parece estar también implicado en la regulación de la senescencia, de modo que cuando los mecanismos antioxidantes ya no pueden gestionar la acumulación de radicales libres, se da paso a la muerte celular, lo cual desencadena la fase final de la senescencia de modo irreversible. La práctica totalidad de los procesos intracelulares que se desencadenan con la senescencia frutal son los mismos que los que vimos para la senescencia floral (ver apartado 5.7.1), de manera que mediante un patrón de senescencia claramente definido, se acaba con la abscisión del fruto, o con su apertura (dehiscencia).

La dehiscencia frutal es el proceso de apertura espontánea del fruto para dejar salir las semillas. Puede producirse de diversas formas, en función de cómo y por donde se produzca la apertura de la pared del fruto. Por ejemplo, la dehiscencia será:

- *Loculicida* o *dorsicida* si el fruto se abre longitudinalmente por la vena media de los carpelos.
- *sutural simple* o *ventricida* si se abre longitudinalmente por la sutura carpelar.
- *sutural doble* si el fruto se abre también longitudinalmente, pero en paralelo por la sutura y por la vena media del carpelo.

- *septicida* si la apertura se da al abrirse los septos que separan los distintos lóculos de los frutos de placentación axilar (ver apartado 8.4; Figura 8.12).
- *septífraga* si se rompen los septos, pero en el plano opuesto al anterior.
- *placenticida* si se abre por la zona media de las placentas.
- *placentífraga* si se abre por dos líneas de dehiscencia paralelas, a ambos lados de las placentas de las silicuas.
- *poricida* o *foraminal* si se forma un orificio en un extremo del fruto por que salen las semillas, de modo semejante a la dehiscencia poricida de las anteras (ver Figura 7.17C).
- *circuncisa* o *transversal* si se abre la zona distal de la pared del fruto como si fuera una tapa, gracias a una línea de dehiscencia transversal que recorrerá todos los carpelos que conformen el ovario original.
- *dental* si se forman bordes dentados al abrirse por las líneas de sutura solo las partes distales de las hojas carpelares.
- *biscida* si se combinan dos tipos de dehiscencia de los anteriormente vistos.

Como ya vimos en el apartado 5.7.3, la abscisión implica la pérdida programada de un órgano (en este caso el fruto) de la planta. El mecanismo de abscisión del fruto es muy semejante al que vimos en dicho apartado para las flores, por lo que es de aplicación lo que se dijo allí. Brevemente, la abscisión también está determinada por los niveles de etileno presentes en el fruto, y puede ser contrarestada por los niveles de auxinas. De esta manera, los frutos producen auxinas durante su desarrollo para evitar la abscisión temprana, y tras la senescencia, cuando el equilibrio etileno-auxinas se decanta a favor del etileno, el fruto se cae.

13.8. Dispersión de los frutos

En las plantas con semilla primitivas, la propia semilla era la unidad básica de diseminación. Es decir, la semilla se diseminaba tal cual era. Algo semejante a lo que ocurre en gimnospermas, aunque en estas últimas podemos observar algunas adaptaciones para favorecer la diseminación (Figura 12.13A). En angiospermas, las más evolucionadas, sus frutos se han especializado enormemente, existiendo en la actualidad un enorme abanico de especializaciones en función de la estrategia que hayan adoptado para la diseminación de las semillas que contienen. Dada esta diversidad, es difícil compilar todas las variantes evolutivas de todos los frutos. No obstante, sí se pueden extraer generalidades en ciertos casos concretos, de especial interés o frecuencia. Veremos algunos de estos casos.

Algunos frutos (o directamente semillas como en el caso de las gimnospermas) facilitan su dispersión por el viento (anemocoria) de forma semejante a las gimnospermas, desarrollando frutos ligeros (sámaras, Figura 13.24) con apéndices membranosos en forma de ala (como el arce, diente de león, sauce) o bien adoptando un tamaño microscópico como en el caso de las orquídeas. Sin embargo, el hecho de que las angiospermas presenten un ovario-pared del fruto protegiendo las semillas hace que el conjunto en muchas ocasiones no sea lo suficientemente liviano para el transporte por el viento. Esto hace que hayan tenido que desarrollarse otra serie de adaptaciones para el transporte por animales (zoocoria).

Una de las estrategias más frecuentes en la zoocoria es promover el consumo del fruto por parte del animal, para que éste digiera la pared en su tránsito por el tracto digestivo, utilizándola como alimento, y expulse las semillas junto con las heces. Estos frutos suelen presentar colores vistosos. Al igual que sucedía con las flores, los frutos rojos suelen indicar abundancia a los animales. Por esta razón el rojo es un color frecuente en frutos dispersados por animales. También es frecuente la presencia de una pulpa carnosa o jugosa, más o menos dura en función del aparato bucal y la presencia o no de dientes en el animal. En algunos casos de dispersión por animales los frutos son secos, con paredes duras y resistentes. Se trata de frutos dispersados por roedores como las ardillas, que transportan frutos como bellotas o avellanas en su boca para acabar enterrándolos. Es fácil imaginar que la pared de estos frutos ha de ser lo suficientemente dura para resistir la exposición prolongada a la saliva de estos animales hasta que son depositados. En otros casos, los frutos destinados a la dispersión por mamíferos o aves desarrollan ganchos y espinas que facilitan el agarre al pelaje o plumaje del animal (epizoocoria), como vimos en el tema anterior. Estos frutos son típicos de plantas caducas de bosques de altas latitudes. Ejemplo: *Xanthium*.

Otras estrategias de dispersión menos frecuentes son las que vimos en el tema anterior, que consistían en flotar en el mar para ser dispersadas por las corrientes, como en el caso del coco, o presentar mecanismos de "disparo" de las semillas a distancia, como en algunas legumbres.

13.9. Resumen

Un fruto no es más que un ovario engrosado, modificado para proteger y/o favorecer la dispersión de las semillas que contiene. Uno de los mecanismos más comúnmente utilizados por las plantas para dicha dispersión es producir frutos nutritivos y de sabor agradable, de modo que son consumidos por los animales, que ingieren de este modo las semillas, las transportan en su tracto digestivo, y las eliminan, listas para germinar, junto con las heces lejos del lugar donde fueron ingeridas. Se ha cumplido así con la función dispersadora del fruto.

Existen frutos de muchas formas, tamaños, colores y texturas distintas. El fruto es uno de los órganos vegetales donde más se hace patente la gran diversidad

de las angiospermas. A la hora de tratar de clasificar los frutos, existen muchos criterios para ello, que dan lugar a distintas clasificaciones, más o menos complejas. En este libro se ha optado por una clasificación basada únicamente en las anatomías y formas de los frutos. Según esta, podremos hablar de frutos simples o colectivos o múltiples según estén formados respectivamente por un solo ovario, varios ovarios de una misma flor, o varios ovarios de las distintas flores de una inflorescencia.

La transformación de la flor en fruto implica una serie de cambios que no siempre engloban solo a las paredes del ovario. En ocasiones, como sucede en rosáceas como el manzano, otros tejidos de la flor forman parte muy importante del fruto. En general, todos los tejidos implicados en la formación del fruto pasan por tres fases en su desarrollo (división celular, expansión celular u maduración. En las primeras el fruto aumenta de tamaño, y en la última acumula azúcares, volátiles y otras moléculas que le confieren su sabor, aroma, color y textura característicos. Al tiempo, comienza su maduración, es decir su reblandecimiento para permitir que de uno u otro modo las semillas que contiene puedan salir al exterior.

Al igual que sucedía con las flores, cuando el fruto está maduro ha de desprenderse de la planta mediante un proceso denominado senescencia, que termina con la abscisión (separación y caída) del fruto. La maduración, la senescencia y la abscisión están reguladas hormonalmente, siendo el etileno la hormona principalmente implicada, sobre todo en la senescencia y la abscisión. Una vez separados de la planta originaria, los frutos liberan sus semillas, o son dispersados junto con ellas como vimos en el tema anterior.

13.10. Información adicional

- Bolaños L. Resúmenes de los temas de fisiología vegetal 3º Biología. (recurso online). Tema 31: Fructificación. http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/FisioVegetal/TeoriaFisioVegetal/Resumenes/tema24.htm
- Manning W.E. 1940. The Morphology of the Flowers of the Juglandaceae. American Journal of Botany, 27 (10): 839-852.
- Merodio C., Escribano M.I. 2003. Maduración y post-recolección de frutos y hortalizas. Serie Biblitoeca de Ciencias, vol 12. CSIC.Madrid.
- Quinza Guerrero E. 1973. La maduración acelerada de los frutos. Publicaciones de extensión agraria. Serie técnica; 50. Ministerio de Agricultura, Madrid.
- Raven P.H., Evert R.F:, Eichhorn S.E. 1992. Biología de las plantas, Vol. 2. Editorial Reverté, Barcelona.
- Reproduccion sexual - Hipertextos del Área de la Biología (recurso online). http://www.biologia.edu.ar/reproduccion/sexual.htm
- Spjut R.1994. Systematic Treatment of Fruit Types. Memoirs of New York Botanic Garden, 70.
- Strassburger E. 1994. Tratado de Botánica. 8ª. edición. Omega, Barcelona.

Bloque 2

BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA

TEMA 14. Los fundamentos de la biotecnología vegetal

Al igual que en cualquier otro ámbito de la biotecnología, la biotecnología de la reproducción vegetal no puede entenderse si no se conocen sobre qué bases teóricas se fundamentan. Por esta razón, dedicaremos este tema a exponer como se llegó a disponer de las herramientas metodológicas que hoy día nos permiten manipular a voluntad multitud de procesos biológicos de las plantas, y sobre qué principios biológicos se fundamentan estas herramientas.

El desarrollo de herramientas tecnológicas modernas ha permitido un espectacular avance en la percepción que se tiene de las plantas desde un punto de vista biotecnológico. Reduciendo esta frase a una de sus aplicaciones más conocidas, podríamos decir que han permitido el desarrollo de nuevos cultivos genéticamente transformados para expresar rasgos, propiedades o características de interés para el ser humano y/o la sociedad, que hasta ahora había sido imposible conseguir mediante métodos clásicos de mejora vegetal. Podríamos decir que el principal, el que permitió establecer los pilares básicos sobre los que se fundamenta la biotecnología vegetal, fue la transformación genética estable de células somáticas. O dicho de otro modo, el desarrollo de técnicas que permitieron introducir en una planta genes foráneos (*transgenes*), ajenos a su especie, y mantenerlos permanentemente de modo que puedan transmitirse a las siguientes generaciones junto con el resto de su material genético. Este hallazgo ha revolucionado las posibilidades biotecnológicas que nos ofrecen las plantas, como veremos más adelante.

Este logro fue el resultado de la conjunción de tres líneas de investigación independientes iniciadas a principios del siglo XX:

- el cultivo in vitro de tejidos vegetales en laboratorio, en condiciones controladas y esterilidad
- la regeneración de plantas completas a partir de células individuales somáticas, cultivadas in vitro
- el estudio de la enfermedad de la agalla en corona.

La *agalla en corona* es una enfermedad de las plantas. Más adelante veremos con más detalle en qué consiste y qué relación tiene con la creación de plantas transgénicas. El estudio de esta enfermedad es uno de los ejemplos más bonitos e ilustrativos en la biología vegetal de cómo una investigación básica, sin utilidad inmediata aparente cuando se realizó, puede establecer los pilares científicos sobre los cuales desarrollar innovaciones tecnológicas revolucionarias, que pueden potencialmente cambiar la sociedad. Al igual que en el caso de la agalla en corona, los descubrimientos realizados en las otras dos áreas antes mencionadas representan una perfecta combinación de investigación científica básica y aplicada para generar innovaciones tecnológicas.

Cada una de estas áreas tiene su momento fundacional en una publicación científica concreta que más tarde llegó a ser considerada como la fundadora

de cada uno de estos campos de investigación. Obviamente, estas áreas tienen también unos padres fundadores, que fueron P.R. White, G. Haberlandt, y E.F. Smith junto con C.O. Townsend, respectivamente (ver sección 14.5, Información adicional). Por supuesto, ninguno de estos investigadores sabía en qué iban a derivar sus investigaciones al cabo de los años. Ellos tan solo habían planteado unas investigaciones de interés para ellos y para sus comunidades científicas concretas. Nunca se propusieron directamente solucionar los problemas que al final acabaron solucionando. Resulta muy instructivo, además de curioso e interesante, seguirle la pista al desarrollo de cada uno de estos tres campos, para ver cómo se establecieron, cómo avanzaron paralelamente, cómo fueron poco a poco convergiendo, y cómo finalmente se unieron para fundar las bases de la biotecnología vegetal actual. A continuación expondremos brevemente en qué consiste el cultivo in vitro de tejidos, la regeneración de plantas a partir de células individuales, y la enfermedad de la agalla en corona, para entender mejor los capítulos que vendrán posteriormente.

14.1. El cultivo in vitro de tejidos

Philip White era un científico que en la década de 1930 trataba de desarrollar un sistema experimental en el que estudiar el metabolismo de las células vegetales. Necesitaba un tejido formado por células completamente indiferenciadas, equivalentes entre ellas, y que por tanto ejercieran unas influencias equivalentes las unas sobre las otras. Para ello necesitaba establecer un conjunto de células idénticas, con las mismas funciones y que fueran capaces de sobrevivir por si mismas, aisladas de la planta original. Y lo consiguió. En 1939 definió un cultivo de tejidos vegetales como un sistema en el que las células que lo componen han de cumplir dos requisitos:

- permanecer indiferenciadas
- ser capaces de crecer indefinida e ilimitadamente.

Antes de él, algunos otros investigadores lo habían intentado, pero no habían conseguido aunar estos dos requisitos. O se les contaminaban los cultivos, o utilizaban unos medios nutritivos con carencias en algún nutriente, o sencillamente no eligieron bien el tipo de tejido (*explante*) que tenían que utilizar para conseguir estos objetivos. Pero Philip White acertó en el tipo de explante (meristemos radiculares de tomate), y en la composición del medio de cultivo (sales inorgánicas, sacarosa y extracto de levadura). En 1934 había demostrado que estos tejidos seguían creciendo, sin disminución de su tasa de crecimiento, durante 52 subcultivos y 400 días. Sin embargo, la segunda parte de su definición seguía sin ser demostrada, porque las raíces no eran un tejido claramente indiferenciado. Seguían siendo raíces.

En 1939 abordó esta segunda cuestión, utilizando un híbrido entre dos especies del género *Nicotiana*: *Nicotiana glauca* y *N. langsdorffii*. Eligió estos materiales porque los híbridos desarrollan en el tallo y las hojas una especie de *callos* o acúmulos de células mayoritariamente indiferenciadas (Figura 14.1), sin

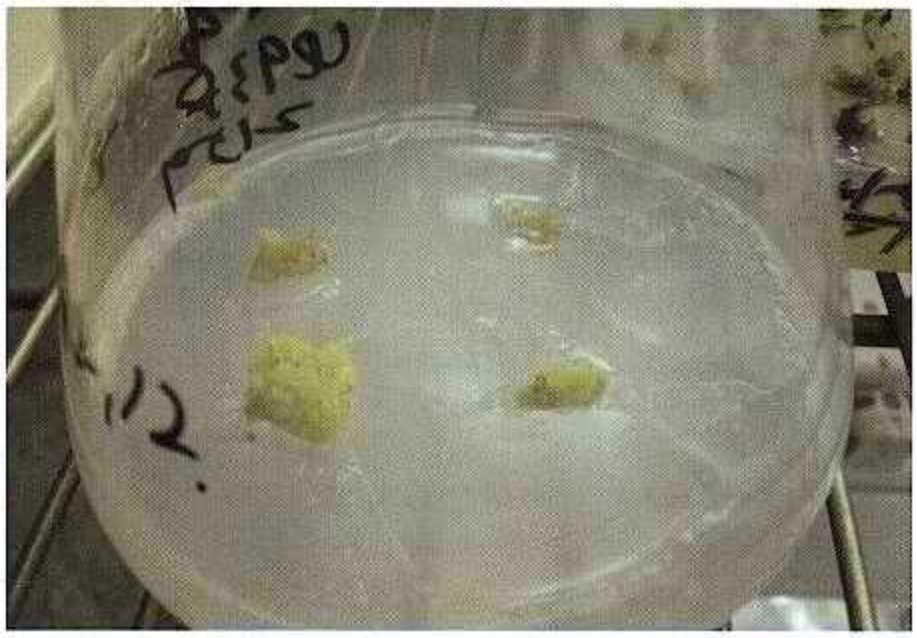


Figura 14.1: Formación de callos a partir de tejidos de zanahoria cultivados in vitro.
Imagen de Bstlee, de dominio público, en Wikimedia Commons

función aparente más allá de proliferar siempre que las condiciones de su entorno se lo permitan. White extirpó estos callos y los cultivó asépticamente en el mismo medio que previamente había utilizado para mantener indefinidamente las raíces de tomate. Sucedió exactamente lo mismo, pero esa vez partiendo inicialmente de tejidos indiferenciados. Se cumplían los dos requisitos previos. Seis semanas después, dos científicos franceses independientes, uno en París (Roger Gautheret) y otro en Grenoble (Pierre Nobecourt), llegaron a los mismos resultados con tejido de zanahoria en un medio al que se le había añadido *ácido indolacético* (*IAA*). El IAA había sido descubierto en 1934 por Fritz Kögl, observando que tenía incidencia sobre el alargamiento celular. A partir de ese momento esta sustancia sería considerada como un factor regulador de crecimiento vegetal, o fitohormona, perteneciente al grupo de las *auxinas*. En 1938 Yabuta y Sumiki aislarían las *giberelinas* A y B. El tercer gran grupo de reguladores de crecimiento vegetal, las *citoquininas*, aún tardarían unos años en ser descubiertas. Las auxinas, las citoquininas y las giberelinas son fundamentales en el mantenimiento de los cultivos in vitro, como hoy en día sabemos. Gracias a estos descubrimientos fue posible el posterior desarrollo del cultivo in vitro de tejidos vegetales, y de todas las aplicaciones que veremos en los próximos temas.

Una vez conseguida y confirmada la idea de White, la imaginación de los científicos buscó nuevos retos. Por un lado, tratar de inducir la formación de callos indiferenciados a partir de tejidos completamente diferenciados. Hay que tener en cuenta que lo que White hizo fue mantener en cultivo un callo que ya estaba indiferenciado cuando fue separado de la planta. Ahora el reto iba más allá: que un órgano normalmente formado revertiera en su desarrollo, se desdiferenciara, y que permaneciera así en cultivo. A lo largo de las décadas posteriores comenzaron a aparecer artículos científicos en los que se demostraba que era posible obtener callos si se cultivaban in vitro fragmentos de hoja,

tallo, cotiledones, hipocotilo, raíz... En la actualidad, es posible desdiferenciar hacia callo prácticamente cualquier tejido vivo de una planta adulta, siempre que apliquemos las condiciones de cultivo adecuadas, y sobre todo con la combinación de fitohormonas necesaria para cada especie y tejido.

Por su parte, Gautheret y Nobecourt siguieron trabajando en los cultivos de tejidos de zanahoria. Vieron que en los callos, pasado cierto tiempo, comenzaban a aparecer y desarrollarse raíces. En 1948 Michael Levine publicaba que además de raíces, de sus callos de zanahoria surgían también brotes, que se desarrollaban para regenerar todas las partes aéreas de la planta. Se estaba aproximando el momento de regenerar plantas completas a partir de un fragmento de tejido cultivado in vitro. En estos años entró también en escena Folke Skoog. El profesor Skoog, junto con su grupo de la Universidad de Wisconsin, ha sido uno de los científicos que más han contribuido al cultivo in vitro de tejidos vegetales como hoy en día lo conocemos. En primer lugar, junto con C. Miller y colaboradores descubrieron la primera citoquinina, la *kinetina*, como subproducto de la degradación del ADN de esperma de arenque. Más tarde se descubrirían otras citoquininas naturales en diversos tejidos, incluyendo el agua (el endospermo liquido) de coco. La disponibilidad de kinetina aumentó considerablemente el número de especies que podían ser cultivadas indefinidamente. Pero quizás lo más importante del descubrimiento de la kinetina es que condujo al reconocimiento de que los callos originados de tejido vegetal cultivado in vitro mantienen las potencialidades del zigoto para formar tanto brotes como raíces. Además, demostraron que este potencial es fácilmente manipulable. Tan solo basta con alterar el equilibrio entre auxinas y citoquininas en el medio. Este equilibrio tiene un papel crucial en el tipo de proceso morfogénico que se desencadene en el callo: altos niveles relativos de auxinas frente a kinetina favorecen el enraizado, mientras que la relación inversa lleva a la formación de brotes, y niveles intermedios promoverían la proliferación en forma de callo o tejido parenquimático. A partir de ese momento, este modelo se demostró cierto en numerosas especies, con lo que se estableció como uno de los dogmas del cultivo in vitro. De hecho, en esto consisten gran parte de las técnicas utilizadas actualmente para regenerar plantas in vitro: primero se induce la formación y proliferación del callo, y cuando alcanza un tamaño mínimo, se añaden hormonas en la dosis adecuada para que aparezcan brotes. Por último, se invierten las proporciones para que los brotes enraícen, obteniendo finalmente la planta in vitro, que puede pasarse a una maceta, aclimatar y cultivar como cualquier otra.

La contribución de Folke Skoog al cultivo in vitro fue mucho más allá de lo que acabamos de exponer. Años más tarde, junto con Toshio Murashige, diseñaron el medio de cultivo más *universal* que se conoce. Los medios de cultivo in vitro disponibles hasta entonces se basaban en combinaciones de nutrientes formuladas para la planta completa, que no acababan de proporcionar un crecimiento óptimo de los tejidos aislados, y se requería con frecuencia la adición de mezclas complejas, tales como extractos de levadura, hidrolizados de proteínas y agua de coco, cuya composición es siempre variable y nunca se conoce con

exactitud. Todo esto cambió drásticamente cuando Murashige y Skoog se propusieron diseñar un medio definido, claramente reproducible, útil para cultivar in vitro tejidos del mayor número de especies posible. Murashige y Skoog aplicaron un enfoque totalmente diferente: como el medio lo querían para cultivar callos, analizaron la composición química de los callos, para así determinar qué necesitan para crecer. Examinaron la ceniza de pirolisis de callos de tejidos de tabaco cultivados in vitro, para desarrollar un nuevo medio, el *medio Murashige y Skoog* (comúnmente conocido como *medio MS*), que marcaría un antes y un después en el cultivo in vitro.

En el medio MS la concentración de algunas sales era hasta 25 veces mayor que en los medios previos. En particular, los niveles de NO_3^- y NH_4^+ eran muy elevados y se incrementaba en gran medida el espectro de sales de oligoelementos. La formulación del medio MS (Figura 14.2) en términos de sales minerales necesarias en grandes cantidades (*macronutrientes*), oligoelementos (*micronutrientes*) y vitaminas permitió un gran aumento en el número de especies vegetales potencialmente cultivables in vitro. En muchas de ellas es suficiente con poner el tejido a cultivar sobre un recipiente con medio MS y añadir hormonas y sacarosa como fuente de carbono. En la actualidad, el MS es con diferencia el medio más ampliamente utilizado en cultivo de tejidos vegetales.

Macronutrientes	Fórmula	Cantidad (en mg/l)
Nitrato potásico	KNO_3	1.900
Nitrato amónico	NH_4NO_3	1.650
Cloruro cálcico	$CaCl_2$	332,02
Sulfato de magnesio	$MgSO_4$	180,54
Fosfato potásico	KH_2PO_4	170
Micronutrientes		
Sulfato de manganeso monohidratado	$MnSO_4 \cdot H_2O$	16,9
Sulfato de zinc heptahidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6
Ácido bórico	H_3BO_3	6,20
Yoduro potásico	KI	0,83
Molibdato sódico dihidratado	$(Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
Sulfato de cobre pentahidratado	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
Cloruro de cobalto hexahidratado	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
Sulfato ferroso heptahidratado		27,8
EDTA sódico dihidratado	$NaEDTA \cdot 2H_2O$	37,2
Vitaminas		
Mio-Inositol		100
Ácido nicotínico		0,5
Clorhidrato de piridoxina		0,5
Clorhidrato de tiamina		0,1
Glicina		2,0

Figura 14.2: Composición del medio original de Murashige y Skoog (1962).

Llegados a este punto de avance del cultivo in vitro, quedaba todavía una cuestión pendiente: ¿puede una sola célula regenerar una planta completa, o hacen falta muchas? O dicho de otro modo ¿puede una célula vegetal, en las condiciones adecuadas, comportarse como un zigoto unicelular? Esta pregunta tuvo como respuesta la definición del concepto de *totipotencia* de las células vegetales, como veremos a continuación.

14.2. La regeneración de plantas a partir de células individuales

Veíamos en el tema 2 que la totipotencia es la potencialidad de una célula para especializarse en virtualmente cualquier tipo celular de un organismo. Por tanto, una única célula totipotente, al igual que un zigoto unicelular, sería capaz de regenerar toda una planta completa. Hoy en día sabemos que las células vegetales son totipotentes, y precisamente en esto se basa el cultivo in vitro. Pero llegar a esta conclusión, actualmente asumida por todos, fue una tarea que comenzó hace algo más de cien años.

El cultivo in vitro no podría entenderse sin el trabajo previo de algunos botánicos y fisiólogos vegetales, que establecieron una serie de cimientos, bases sobre las que se asentó posteriormente esta disciplina. Así, ya en 1756 Henry-Louis Duhamel du Monceau, con sus experimentos de cicatrización de heridas, demostró la capacidad de las plantas para formar callos de forma espontánea en las zonas sin corteza de los olmos. Un siglo después M.J. Schleiden en 1838 y T. Schwann en 1839 fundaron la teoría celular y en 1850 Lieberg, Sach y Knopp establecieron las bases de la nutrición vegetal. Este fue el punto de partida para Gottlieb Haberlandt.

El científico austriaco Gottlieb Haberlandt fue el primero en cultivar in vitro células aisladas de plantas superiores. Según el propio Haberlandt, antes de él no se habían llevado a cabo intentos sistemáticos de cultivar células vegetativas aisladas de plantas superiores. Comenzó sus investigaciones en 1898 y publicó los resultados en 1902. Sus experimentos con células fotosintéticas aisladas de hojas, así como con otros tipos celulares funcionalmente diferenciados sentaron la base teórica para el cultivo de tejidos vegetales, que fue propuesta por Haberlandt en su discurso ante la Academia Alemana de Ciencias en 1902. Su intención era estudiar "*las propiedades y potencialidades que la célula, como organismo elemental, posee*". Haberlandt creó una solución nutricional equilibrada, conocida como "*Hoagland*", con la cual observó que las plantas presentaban división celular, pero no supo a qué se debía. Aunque nunca consiguió que ninguna de sus células aisladas proliferara y regenerara, hoy en día Haberlandt es reconocido como el fundador del cultivo celular en plantas, debido a la novedad de los métodos que propuso, y al párrafo final de su artículo en el que mencionaba:

> "*Creo, en conclusión, que no estoy haciendo una predicción demasiado audaz si apunto a la posibilidad de que, de esta manera, se puedan cultivar con éxito embriones artificiales a partir de células vegetativas*".

Con la perspectiva del paso del tiempo, podría atribuirse claramente el fracaso de Haberlandt a su falta de esterilidad en los cultivos, la mala elección del tejido vegetal para su experimentación y la ausencia de fitohormonas en el medio. Esto último no pudo ser achacable a él, pues en 1902 aún faltaban unos años para que se descubrieran. No obstante, los resultados de sus experimentos brindaron por primera vez cierta idea sobre las propiedades y potencialidades de la célula vegetal y acerca de las interrelaciones e influencias complementarias a las que están expuestas las células dentro de un organismo pluricelular. Él, por tanto, estableció el concepto de totipotencia, y señaló además que la técnica de cultivo de células vegetales aisladas en medio nutritivo permitiría un nuevo enfoque experimental en la investigación de cuestiones biológicas básicas. El discurso de Haberlandt de 1902 es considerado como el momento fundacional del cultivo in vitro de tejidos vegetales como disciplina científica. Dicho discurso, junto con sus experimentos previos y posteriores, sus innovaciones técnicas y sus predicciones, que luego se cumplieron, han hecho que Gottlieb Haberlandt sea en la actualidad reconocido como el padre del cultivo in vitro de tejidos vegetales.

Tras Haberlandt, otros trataron de seguir su camino. Pero lo cierto es que durante 56 años, nada cambió significativamente en el terreno de los cultivos de células aisladas. Pero sí en otros terrenos (ver sección 14.1), que hubieran necesitado ser explorados antes que este. Tal es el caso de las hormonas vegetales, que como ahora sabemos son fundamentales para el crecimiento de las células vegetales in vitro. Así, una vez descubiertas y aplicadas al crecimiento de células individuales, se consiguió por fin que estas se dividieran, y que proliferaran en forma de callo. Poco tiempo después se logró la regeneración de raíces, brotes apicales y finalmente plantas completas a partir de una sola célula vegetal. Estas plantas, perfectamente viables, una vez pasadas a macetas producían flores, frutos, semillas, y eran por tanto capaces de generar descendencia. La prueba concluyente de que una sola célula somática cultivada in vitro es capaz de regenerar una planta completa llegó en 1965. V. Vasil y A.C. Hildebrandt aislaron células individuales de tabaco y las colocaron bajo un microscopio, mediante el cual visualizaron paso por paso cómo una célula se dividía en dos, las dos en cuatro, luego en ocho, y sucesivamente hasta formar un callo macroscópico, ya visible sin la ayuda del microscopio. De él, surgieron luego las raíces y los brotes apicales. Había quedado demostrado que una sola célula somática vegetal puede regenerar una planta completa. Se había demostrado que las células vegetales son *totipotentes*.

14.3. La enfermedad de la agalla en corona

La agalla es una patología vegetal, una especie de callo o engrosamiento que aparece en ciertas zonas de la planta. Suelen estar provocadas por un proceso infeccioso que se manifiesta con el crecimiento incontrolado de las células del tejido afectado. Las agallas suelen aparecer en el tallo o tronco, cerca del suelo, o en la raíz. Estas agallas pueden degenerar parcialmente, quedando zonas

que puedan permanecer localmente activas y formar nuevas agallas adyacentes, o bien pueden desaparecer por completo. Las agallas pueden ser aisladas o agrupadas, separadas del tallo o rodeándolo, en cuyo caso tendrían forma de corona (Figura 14.3). Algunas son esponjosas y se desmigajan y fragmentan parcialmente. Otras son muy duras y leñosas.

Como cualquier patología, las agallas vegetales también tienen un agente causal. En el caso de la agalla en corona, el agente causal es una bacteria denominada *Agrobacterium tumefaciens (Figura 14.4). A. tumefaciens* habita en suelos, y tiene un rango muy amplio de especies vegetales susceptibles de infectar. Como suele suceder con otras enfermedades vegetales, hay cepas concretas de *A. tumefaciens* especializadas en infectar a especies concretas de plantas, y que no provocan ningún tipo de patología en otras.

Figura 14.3: Enfermedad de la agalla en corona sobre el tronco de un álamo americano.
Imagen de William Jacobi, Colorado State University, Bugwood.org, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 US.

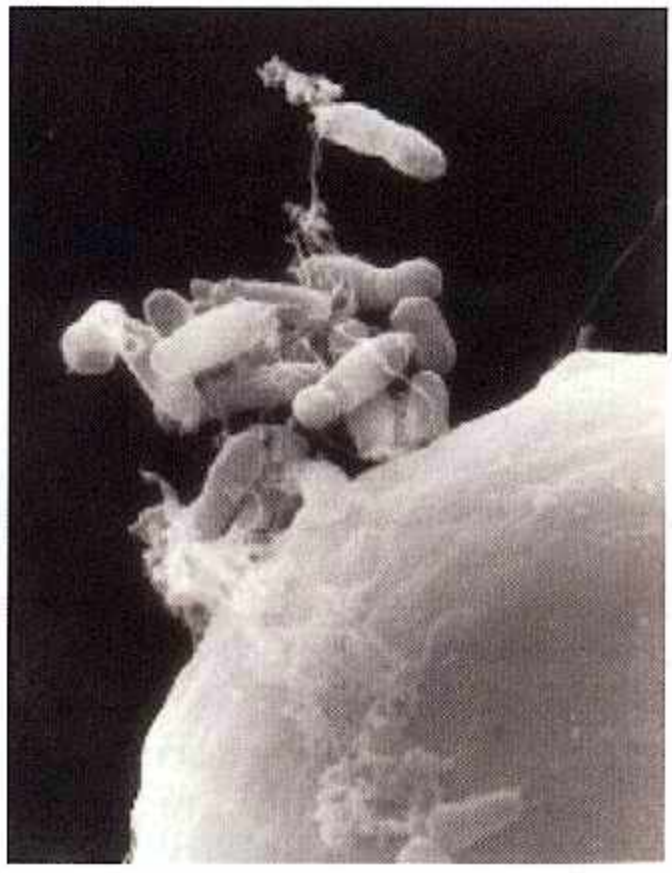


Figura 14.4: *Agrobacterium tumefaciens* infectando una célula de zanahoria en cultivo in vitro.
Imagen de A.G. Matthysse, K.V. Holmes y R.H.G. Gurlitz, de dominio público en Wikimedia Commons

A. tumefaciens detecta cuando una planta presenta una herida, se dirige a ellas y penetra en la planta, albergándose en los espacios intercelulares. Una vez allí, la bacteria desencadena la enfermedad al introducirse e infectar a las células de la zona (Figura 14.4) y transferirles su ADN plasmídico, en concreto el plásmido denominado Ti. Este plásmido lleva, entre otros genes, los responsables de la virulencia y de los síntomas de la enfermedad. A estos genes se les llama *T-DNA*. Una vez dentro de la célula infectada, el T-DNA busca el núcleo y

se inserta en el genoma de la célula atacada. De esta manera, queda integrado como si fuera un conjunto de genes más de la propia célula, que esta replica y transcribe junto con los suyos propios. La transcripción del T-DNA es la que dispara la enfermedad, pues los genes del T-DNA codifican la síntesis de fitohormonas, las causantes del crecimiento masivo e indiferenciado de la agalla.

Smith y Townsend en 1907 iniciaron las investigaciones sobre el proceso de infección por *A. tumefaciens* y de desarrollo de la enfermedad de la agalla en corona. Tras ellos, otra serie de científicos fueron poco a poco, a lo largo de 40 años, poniendo cerco a la composición de la molécula concreta (el T-DNA) contenida en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*. Así, 70 años después de que Smith y Townsend publicaran su trabajo pionero, quedó establecido el mecanismo que acabamos de mencionar de forma extremadamente resumida, por el cual *Agrobacterium tumefaciens*, su plásmido Ti, y el T-DNA que contiene provocan la enfermedad.

Tres años más tarde, cuando ya se habían hecho suficientes avances en el campo de la transformación genética (introducción de genes exógenos) en bacterias y se conocía bien la estructura del T-DNA de *A. tumefaciens*, se planteó la posibilidad de aislar el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, "desarmarlo" quitándole todos los genes que provocan el crecimiento descontrolado de las células infectadas, y sustituirlos por otros genes de interés. Si esto se hacía posible, sería posible introducir esos genes de interés en una célula vegetal. Tan solo dos años más tarde comenzaron a publicarse trabajos en los que se demostraba que la idea de sustituir los genes responsables de la enfermedad por otros genes a voluntad, era posible. Y no solo posible, sino fácil y sobre todo útil.

El primero de estos trabajos lo publico el científico mexicano Luís Herrera Estrella, que para muchos ha pasado a la historia como el inventor de las plantas transgénicas. Junto con el equipo del departamento de genética de la Universidad de Gante (Bélgica) con el que trabajaba, demostraron que mediante esta técnica se podían introducir en células de tabaco genes que les conferían resistencia frente a una serie de antibióticos a los que en condiciones normales son sensibles. De esta forma, si se aplicaban estos antibióticos a una célula normal, la célula moría. Pero si se aplicaban a una célula transformada de este modo, sobrevivía. Había comenzado una nueva forma de utilizar las plantas para que fabriquen las sustancias que nosotros queramos. A partir de este momento, se sucederían los trabajos en los que se utilizaban variantes de esta y otras técnicas para conferir a las plantas características nuevas mediante la inserción de transgenes.

14.4. Otros métodos de transformación genética

Posteriormente han surgido otros métodos alternativos para la introducción directa de transgenes en células vegetales. Por ejemplo la electroporación, la fusión de liposomas, la microinyección o el bombardeo de partículas, también conocido como *biolística*. De entre ellos, destaca la biolística como método útil

para las especies no susceptibles de transformación mediada por *Agrobacterium*. Este método, mucho más agresivo y conceptualmente menos elaborado, consiste en utilizar unos aparatos especializados en lanzar microproyectiles a gran velocidad contra los explantes. Estos microproyectiles suelen ser micropartículas de oro o de tungsteno, de muy pocas micras de diámetro, que se recubren del ADN que queremos integrar en el genoma de la célula a transformar. Una vez recubiertas las partículas, la máquina las dispara sobre el explante, en el cual se introducen perforando la pared celular. Una vez dentro, por azar algún fragmento de ADN acabará integrándose en el genoma.

Pese a haberse popularizado más en los últimos años, este método está todavía lejos de la eficacia de la transformación con *A. tumefaciens*. Entre otros problemas, la biolística provoca daños físicos a las células bombardeadas, de los cuales algunas no llegan a reponerse y mueren. A esto hay que añadirle el estrés adicional al que se somete al explante transformado por el hecho de cultivarlo in vitro para regenerar la planta transformada a partir de él. Además, la transformación por bombardeo no asegura tanto como *A. tumefaciens* la integración estable de los transgenes en el genoma receptor. De hecho, la tasa de transformación transitoria, reversible, es mucho más alta mediante bombardeo. Además, el hecho de bombardear un tejido, y de que las partículas impacten en unas u otras células del tejido por puro azar, añadido al azar de que se inserte en transgen en el genoma en una u otra célula, hacen que no sea nada desdeñable la aparición de *quimeras*. Las quimeras son individuos en los que parte de sus células han sido transformadas y expresan un determinado carácter, mientras que otras partes no han sido transformadas, permaneciendo igual. Es fácil inturir que las quimeras no son deseables a la hora de utilizar una planta transformada con fines prácticos. En definitiva, aunque la transformación con *A. tumefaciens* (o *agrotransformación*) tiene también sus limitaciones, actualmente sigue siendo más útil que sus alternativas. Estas últimas suelen aplicarse en especies donde la agrotransformación no da los resultados deseables.

Una alternativa que también se está desarrollando en los últimos años es la combinación del bombardeo de partículas con la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Esta variante es especialmente interesante en especies poco susceptibles a la infección por *A. tumefaciens*, o bien en tipos celulares especialmente resistentes a dicha infección. Es el caso, por ejemplo, de las microsporas o el polen, rodeados de una cubierta dura, impermeable y muy resistente. De este modo, se aprovechan los orificios provocados por el bombardeo de partículas para que *A. tumefaciens* pueda penetrar por ellos, aumentando así la eficiencia de la infección. Una vez dentro, los plásmidos de *A. tumefaciens* generan porcentajes de transformación estable muy superiores a las del ADN introducido tan solo por bombardeo.

Aunque a mucha menor escala, otros métodos de transformación de células vegetales que también se han ensayado incluyen:

- la *electroporación*: formación de poros mediante impulsos eléctricos en la membrana plasmática de las células a transformar.

- la *fusión de liposomas*: introducir los transgenes en liposomas y facilitar su fusión con la membrana plasmática de las células a transformar, de modo que los transgenes queden dentro de la célula, y susceptibles de ser integrados en su genoma.
- la *microinyección*:.Inyectar directamente los transgenes en el citoplasma de la célula a transformar mediante técnicas de micromanpulación y microinyección.

14.5. Panorama actual de la transformación genética de explantes y regeneración de plantas transgénicas

Gracias a la transformación genética de células o explantes y a su regeneración mediante cultivo in vitro, se ha hecho posible transformar muchas especies vegetales. Los avances actuales en biología molecular e ingeniería genética permiten una manipulación cada vez más profunda y exhaustiva de las plantas, mediante la inserción de genes exógenos, procedentes de cada vez más diversos sistemas biológicos. En la actualidad, existen protocolos para modificar genéticamente más de 100 especies vegetales, incluidos casi todos los principales cultivos de dicotiledóneas y un número creciente de monocotiledoneas, así como algunas leñosas. La investigación actual está generando sistemas de transferencia rutinaria de genes para todos los cultivos importantes. Además, las mejoras técnicas están incrementando aún más la eficiencia de transformación, extendiéndola a su vez a la transformación de germoplasma comercial de elite y a la reducción de los costes de producción de plantas transgénicas.

La transformación genética de explantes cultivados in vitro se viene realizando desde principios de la década de 1980. Aunque los primeros ensayos de transformación utilizaron protoplastos como material a transformar, pronto se pasó a utilizar órganos con mayor potencial de regeneración como hojas, tallos o raíces, lo cual incrementó notablemente la eficiencia de obtención de regenerantes completos y transformados genéticamente. La elección del tipo adecuado de explante para ser transformado ha sido otra de las claves que ha permitido el notable auge de la transformación genética como herramienta biotecnológica.

En cuanto al ámbito de aplicación de todos estos avances, resulta evidente el papel activo que estas tecnologías vienen jugando en las últimas décadas como motor de progreso en el desarrollo y aplicación de nuevas y modernas técnicas de base biotecnológica para resolver problemas que no habían podido ser solucionados hasta entonces, o que eran resueltos mediante alternativas menos eficaces, rentables o adecuadas. Por ejemplo, el problema de la falta de resistencia de los cultivos a algunos de sus patógenos más dañinos. Por medio de la tecnología de transformación con genes Bt de resistencia a insectos, es posible crear variedades resistentes en muchas especies, como el maíz, la soja o el cacahuete (Figura 14.5). En general, gran parte de la investigación sobre el uso y aplicación de la transformación genética se ha centrado en la utilización

de estas herramientas para la mejora de caracteres de interés agronómico, como entre otros el control de plagas y malezas, además de la ya comentada resistencia frente a enfermedades. Veremos en los próximos temas muchos más ejemplos de aplicación de la transformación genética, pero dentro del marco de la reproducción vegetal.

Figura 14.5: Plantas de cacahuete normal y transformadas genéticamente con genes Bt de resistencia a la plaga del taladro del maíz. Ambas plantas han sido expuestas al taladro. La de la izquierda es infectada. La de la derecha (Bt) resiste.
Imagen de Georgia Tifton, de dominio público

Por fortuna, este panorama no tiene visos de retroceder. Es más, se espera que en el futuro esta contribución sea aún mayor, a medida que las pequeñas y medianas empresas sean capaces de ir adaptando sus instalaciones para albergar la infraestructura necesaria para las técnicas de transformación y cultivo in vitro disponibles en la actualidad, y para todas aquellas que están aún por venir.

En definitiva, en los últimos años han confluido en un mismo punto los avances en el cultivo in vitro y la biología molecular, de modo que se ha desarrollado un abanico de posibilidades de aplicación en el ámbito de la biotecnología vegetal absolutamente inimaginable hace tan solo unas décadas. De hecho, los avances recientes en la biotecnología vegetal se contemplan como una pieza clave para estimular el progreso científico, que sigue siendo la mejor alternativa para lograr una agricultura sostenible y perfectamente integrada con el medio ambiente. Resulta evidente pues, que el progreso alcanzado en 100 años de biotecnología vegetal ha ido mucho más allá de lo que Haberlandt y otros pioneros jamás hubiesen imaginado. Y todavía no se ha tocado techo.

14.6. Resumen

La gran mayoría de las aplicaciones biotecnológicas actuales de la reproducción vegetal se basan en la utilización de dos herramientas fundamentales, el cultivo in vitro de células y tejidos y la transformación genética. Estas herramientas constituyen los pilares sobre los que se fundamenta no solo la biotecnología reproductiva, sino toda la biotecnología vegetal. Por ello, conviene tener presente en qué consisten y como se llegó a su descubrimiento.

La posibilidad disponible hoy en día de que las plantas expresen multitud de caracteres ajenos a su especie, e incluso a su familia o reino, ha sido una realidad práctica gracias al trabajo de muchos científicos que en su día comenzaron a estudiar la enfermedad de la agalla en corona, y que finalizaron dando con un método experimental para introducir cualquier gen exógeno (transgen) en una célula vegetal. Para ello ha sido esencial descifrar los mecanismos por los cuales la bacteria *A. tumefaciens* es capaz de desarrollar agallas al transferirles sus genes plasmídicos de virulencia.

Una vez transformada una célula con el transgen de interés, es necesario poder regenerar una planta transgénica completa a partir de ella. Tanto el cultivo de tejidos como la regeneración de plantas a partir de células individuales son posibles también gracias al trabajo de muchos científicos que en su día comenzaron a estudiar la capacidad regenerativa de los tejidos y células vegetales. Así se llegó al concepto de la totipotencia celular. Este es un fenómeno característico de las células vegetales gracias al cual es posible regenerar plantas completas a partir de cualquier fragmento, incluso célula individual, extraído de una planta. Para ello es necesario dar previamente con las condiciones experimentales adecuadas.

En resumen, ya disponemos de las herramientas para separar un fragmento o célula individual de una planta, añadirles si queremos el gen o grupo de genes que nos interese, y regenerar in vitro una planta completa con dichos transgenes. A lo largo de los próximos temas veremos muchos otros ejemplos de utilización de estas herramientas, todas a la vez o por separado, para resolver problemas concretos en el ámbito de la biotecnología de la reproducción.

14.7. Información adicional

- Duhamel du Monceau H.L 1756. La Physique des arbres, ou il est trait e de l'anatomie des plantes et de l'economie vegétale pour servir d'Introduction au trait e complet des bois et des forests. P.H.L. Guerin Publisher.
- Garfinkel D.J., Simpson R.B., Ream L.W., White F.F., Gordon M.P., Nester E.W. 1981. Genetic analysis of crown gall. Fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. Cell, 27: 143-153.
- Gautheret R. J. 1934. Culture du tissus cambial. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. 198: 2195-2196.

- Gautheret R.J. 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences, 208: 118-120.
- Haberlandt G. 1902. Kulturversuche mit isollierten pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien., Math.-Naturwiss. Kl., Abt. 1. 111: 69-92.
- Herrera-Estrella L., Vandenbroeck G., Maenhaut R., Van Montagu M., Schell J., Timko M., Cashmore A. 1984. Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti-plasmid vector. Nature, 310: 115-120.
- Kögl F., Erxleben H., Haagen-Smit A.J. 1934. Über den Einfluss der auxine auf das Wurzelwachstum und die chemische Natur des Auxins der Graskoleoptilen. Zeitschrift für Physiologische Chemie 104, 121.
- Levine M. 1948. The growth of normal plant tissue in vitro as affected by chemical carcinogens and plant growth substances. American Journal of Botany, 35: 810-811.
- Miller C., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M. 1955. Kinetin, a cell division factor from desoxyribonucleic acid. Journal of the American Chemical Society, 77: 1392.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-479.
- Nobécourt P. 1939. Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissues végétaux. Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales, 130: 1270-1271.
- Seguí Simarro J.M. 2010. El siglo de oro de la biotecnología vegetal. Cien años que han cambiado nuestra visión de las plantas. Premio Casa de las Ciencias 2010. Casa de las Ciencias, A Coruña. Pendiente de publicación.
- Skoog F., Miller C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. Symposium of the Society for Experimental Biology, 11: 118-131.
- Smith E.F., Townsend C.O. 1907. A plant tumor of bacterial origin. Science, 25: 671-673.
- Thorpe T.A. 2000. History of plant cell culture. In Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments (Smith, R.H., ed.) 2nd ed., Academic Press, California, 1-32.
- Vasil V., Hildebrandt A.C. 1965. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. Science, 150: 889-892.
- Vasil I.K., Thorpe T.A. 1994. Plant Cell and Tissue Culture, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.

- White P.R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiology, 9: 585-600.
- White P.R. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. American Journal of Botany, 26: 59-64.
- Yabuta T., Sumiki Y. 1938. On the crystal of gibberellin, a substance to promote plant growth. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan. 14: 1526.

TEMA 15. Biotecnología de la reproducción asexual. El cultivo in vitro

En el tema 2 veíamos que las plantas son capaces de reproducirse también por vía asexual, y que esta es una alternativa que las especies aprovechan en determinados momentos evolutivos y los individuos en ciertas etapas de sus ciclos vitales. Vimos también que para ello las plantas desarrollan estructuras como los bulbos, los tubérculos, los estolones, los rizomas o las yemas. Estas estructuras naturales vienen siendo utilizadas por los agricultores para propagar vegetativamente las plantas de sus cultivos cuando la reproducción por semillas presenta dificultades, o no es tan rentable, en términos económicos, como la asexual.

También resulta muy útil cuando interesa propagar plantas manteniendo ciertas características concretas seleccionadas artificialmente u obtenidas por mutaciones naturales. Es el caso, por ejemplo, de las naranjas de ombligo o *navel* (*navel* quiere decir *ombligo* en inglés). Las naranjas navel presentan una pequeña naranja en su interior, en su parte distal, de forma que en lugar de la típica sutura como un pequeño poro, presenta una estructura que asemeja a un ombligo (Figura 15.1) y que curiosamente es muy apreciada por los consumidores. Por esta razón, a los agricultores les interesa mantener el caracter. Este carácter se originó gracias a una mutación natural y para mantenerla, los naranjos se propagan por la vía asexual. De permitirse la reproducción sexual en esta planta, en las semillas aparecería segregación para este carácter, e iría poco a poco diluyéndose entre la descendencia.

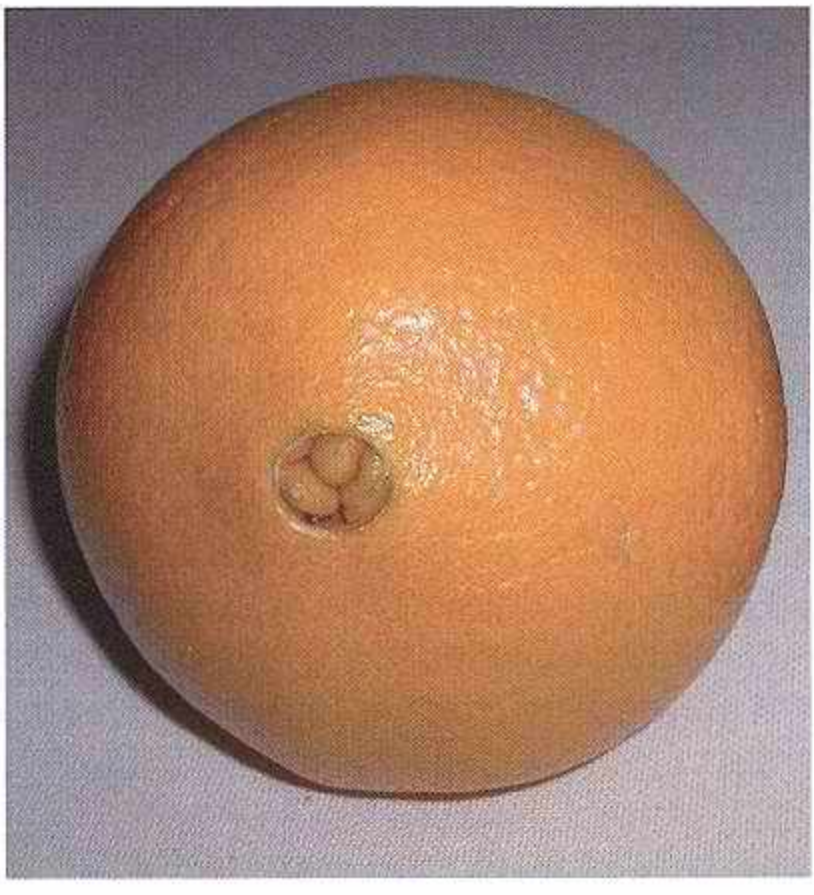


Figura 15.1: Naranja 'Navel'.
Imagen de Seguí Simarro.

Además de aprovechar las estructuras naturalmente generadas para la reproducción asexual, el ser humano ha aprendido a inducir de forma artificial la multiplicación asexual para propagar vegetativamente plantas a su antojo. Para ello se vale desde hace siglos de distintas técnicas agronómicas basadas en la totipotencia y la capacidad regenerativa asexual de las plantas. Las veremos a continuación en la sección 15.1. Sin embargo, el abanico de posibilidades biotecnológicas que se ha abierto gracias a los cultivos in vitro de tejidos o células aisladas ha revolucionado la forma en que actualmente se entiende la producción vegetal, al permitir la multiplicación masiva de material vegetal en poco espacio, menos tiempo y con una notable reducción de los costes de producción. Además de este aspecto, muy relevante, el cultivo in vitro tiene muchas más aplicaciones como método de reproducción asexual. En el resto de este tema veremos los aspecto más relevantes de las técnicas de cultivo in vitro para la reproducción asexual de las plantas. Trataremos únicamente de exponer las generalidades de las principales aplicaciones del cultivo in vitro como estrategia para la reproducción asexual. Entrar en todos los detalles necesarios para conocer en profundidad cada una de las técnicas requeriría una obra dedicada exclusivamente a ello. Además no es el objetivo de este libro constituirse en un tratado de cultivo in vitro, esencialmente porque hay disponibles actualmente muchos y muy buenos (ver sección 15.7, Información adicional).

15.1. Técnicas de reproducción asexual en plantas

La reproducción asexual se ha venido utilizando desde hace siglos para propagar plantas de especial interés a partir de distintos órganos separados de la planta donante y mediante la utilización de técnicas agronómicas como el estaquillado, el acodado o la división de rizomas, bulbos o tubérculos. Las veremos brevemente a continuación.

- ***Esquejado o estaquillado:*** consiste en separar una parte de la planta donante, generalmente un hijuelo o un trozo de rama recién formada, todavía no lignificada en el caso de especies leñosas. Hay que mantener dicho fragmento vivo y lograr que regenere los órganos que le faltan hasta conseguir formar una planta completa. Es frecuente reproducir de este modo la vid y muchas ornamentales. De entre ellas, el geranio (Figura 15.2) es especialmente fácil de reproducir mediante esquejes.
- ***Acodado:*** consiste en provocar la formación de raíces adventicias a un tallo o hijuelo que está todavía adherido a la planta madre, doblándolo de modo que quede en contacto con el suelo. Luego, el tallo enraizado (*acodo*) se separa para convertirlo en una nueva planta que tiene sus propias raíces.
- ***División:*** Es un procedimiento útil para la propagación de plantas con rizomas, bulbos o tubérculos. Se corta el rizoma, bulbo o tubérculo en secciones, asegurándose de que cada parte tiene al menos una yema. En las condiciones adecuadas, cada yema regenerará un nuevo individuo.

- ***Injerto:*** Una parte de la planta, generalmente una rama (*injerto*) se une a otra planta (*patrón*). Se induce la formación de una sutura por la que ambas partes quedarán unidas. El patrón se convertirá en el soporte del injerto y le proporcionará agua y nutrientes como si fueran una sola planta (Figura 15.3). La planta injertada mantendrá las características generales del patrón, aunque los frutos producidos por el injerto conservarán muchas de las propiedades de la planta donante del injerto.
- ***Cultivos in vitro:*** El cultivo in vitro es un conjunto de técnicas experimentales de reproducción en condiciones controladas (en laboratorio), en las que a partir de unas pocas células individuales, un pequeño segmento inicial de tejido (*explante*) o incluso un órgano completo, es posible regenerar en poco tiempo un gran número de plantas genéticamente iguales (en principio) a la planta donante de la célula/explante/órgano. En las próximas secciones veremos los aspectos más relevantes de este conjunto de técnicas.

Figura 15.2: Esqueje de geranio.
Imagen de Seguí Simarro.

Figura 15.3: Injerto en manzano.
Imagen de Karel Jakubec, de dominio público en Wikimedia Commons.

15.2. Concepto de cultivo in vitro

Todas las técnicas fundamentadas en el cultivo in vitro de células, tejidos u órganos vegetales tienen su base en la totipotencia celular (ver temas 2 y 14), por la que una célula, más o menos diferenciada, es capaz de revertir su proceso de diferenciación y volver a un estado primigenio, desdiferenciado, "meristemático", sin especialización concreta pero capaz de especializarse en cualquier otro tipo celular. Si sabemos cómo revertir el proceso natural de diferenciación, y posteriormente inducir específicamente la diferenciación hacia el tipo celular que nosotros deseemos, estaremos en disposición de conseguir la regeneración

de plantas completas. Eso precisamente es el cultivo in vitro, el conocimiento de este tipo de recetas para manipular la totipotencia de las células vegetales. A modo de anécdota, cabe mencionar que el término *in vitro* hace referencia al vidrio, material en el que originariamente los pioneros de estas técnicas realizaban sus cultivos en condiciones lo más asépticas posible. En la actualidad, la mayoría de cultivos se realiza en recipientes de plástico estéril desechable, pero se sigue utilizando el concepto in vitro para aludir a que el tejido ha sido extraído de su entorno natural y es cultivado en el laboratorio en condiciones controladas.

Desde un punto de vista más metodológico, podríamos aludir a la definición de cultivo in vitro que V.M. Loyola-Vargas y F. Vázquez-Flota reflejan en su libro de 2006 (ver sección 15.7, Información adicional), en la que lo describen como *el conjunto de técnicas diseñadas para el crecimiento y multiplicación de células, tejidos u órganos utilizando soluciones nutritivas en un entorno aséptico y controlado*. Habría que añadir a esto que en muchos casos, este crecimiento ha de ser inducido mediante la aplicación un estímulo exógeno controlado a través de la manipulación de las variables físicas y químicas del medio de cultivo in vitro.

15.3. Panorámica general del cultivo in vitro

El cultivo in vitro de células y tejidos vegetales es una disciplina con algo más de un siglo de vida. Como vimos en el tema 14, se considera que nació como tal a comienzos del siglo XX, con el discurso de Gottlieb Haberlandt ante la Academia Alemana de Ciencias en 1902. Resulta fascinante ver cómo en estos poco más de cien años se ha pasado de lo que fue una hipótesis fundacional a todo una conjunto de técnicas bien establecidas que conforman una de las disciplinas biotecnológicas más pujantes.

Desde la década de los 60 del pasado siglo, cuando comenzaron a popularizarse este tipo de metodologías, el cultivo in vitro ha ido creciendo en cuanto a peso como disciplina científica independiente, y también como herramienta transversal a muchas otras disciplinas y ramas de la ciencias experimentales. El enorme potencial que posee esta metodología ha propiciado que en las últimas décadas se haya incrementado el número de laboratorios de cultivo in vitro en todo el mundo, tanto en centros de investigación como en la industria, para la producción comercial de plantas, desde hortícolas hasta ornamentales, entre otras, e incluso frutales.

Esto es así porque entre otras ventajas, esta poderosa herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en espacios reducidos y en mucho menor tiempo que con técnicas tradicionales de cultivo. Por otro lado, es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos, plantas 100% homozigotas, en la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, fitorremediación, etc. De hecho, de acuerdo con los trabajos publicados en las revistas más influyentes del campo de la biología

vegetal, se podrían establecer cinco áreas principales en las que los cultivos in vitro están siendo aplicados:

- la propagación a gran escala de materiales élite
- la producción de individuos fértiles modificados genéticamente
- como sistemas modelo para estudios básicos de aspectos fundamentales en el campo de la biología y la fisiología vegetal
- la preservación de especies en peligro de extinción y recursos fitogenéticos
- la ingeniería metabólica para la obtención de productos naturales y metabolitos secundarios.

En la actualidad, existen protocolos puestos a punto para el cultivo in vitro de explantes de un elevadísimo número de especies vegetales. Asímismo se puede obtener in vitro una planta a partir de explantes de distinta naturaleza, prácticamente de cualquier parte de la planta (tallo, hoja, semilla, fruto, embrión, cotiledones, raíz, etc), siempre y cuando se disponga del protocolo experimental adecuado. Idealmente se seleccionan aquellas partes de la planta que se encuentran menos diferenciadas y más activas en división, como son las regiones meristemáticas. A partir de ellas, se suele inducir la formación de una masa amorfa de células indiferenciadas y proliferantes (callo). Sobre los callos, y dependiendo de los reguladores de crecimiento y condiciones del medio que se utilicen, es posible inducir la formación de embriones que crecerán, madurarán y germinarán dando lugar a una nueva planta, a través de un proceso semejante a la embriogénesis zigótica y que se denomina *embriogénesis somática*, por proceder los embriones de células somáticas.

Sin embargo lo más frecuente es regenerar dicha planta directamente sobre el callo induciendo la formación de todos y cada uno de los distintos órganos que la componen, a través de un proceso denominado *organogénesis*. De los callos también se pueden obtener células sueltas, individuales, en suspensión, sobre las que inducir la regeneración de nuevos individuos por las vías antes mencionadas, pero partiendo de una única célula.

Los procesos antes mencionados, entendidos en su totalidad o en parte, son la base del cultivo in vitro. Es fácil intuir que estos procesos tienen un gran potencial de ser aplicados a distintos ámbitos de interés para el ser humano, y más en concreto a los campos de la producción y la mejora vegetal avanzada, en los que el cultivo in vitro juega un papel muy relevante. En las próximas secciones veremos algunos de los ejemplos más relevantes de las aplicaciones del cultivo in vitro a la biotecnología vegetal.

15.4. Aplicaciones del cultivo in vitro de células y tejidos vegetales

Una vez establecidas las bases del cultivo in vitro, muchos investigadores se dieron rápidamente cuenta del impresionante potencial que estas técnicas

tenían para resolver problemas en muy distintos ámbitos. Así, la segunda mitad del siglo XX vivió una sucesión de éxitos en cuanto al cultivo de explantes de muy diverso tipo, que sentó las bases de muchas de las técnicas actuales. Durante las décadas desde 1960 hasta 1980 hubo un espectacular aumento del uso de estas técnicas, para abordar muy diversos problemas de biología básica y aplicaciones prácticas en agricultura, horticultura y silvicultura. Estas aplicaciones se pueden dividir en siete grandes áreas:

- como modelo experimental para estudios básicos
- obtención de plantas libres de patógenos
- conservación de germoplasma
- propagación clonal
- obtención de metabolitos de interés
- fitorremediación
- mejora vegetal.

A continuación veremos con más detalle estas siete aplicaciones. No obstante, este no es un libro de metodología. Si se desea información más detallada sobre algunos de los métodos utilizados para las aplicaciones que se describirán a continuación, se pueden consultar las siguientes fuentes bibliográficas referenciadas en la sección 15.7, Información adicional: Bhojwani y Razdan (1983), Vasil (1994), y Vasil y Thorpe (1994), entre otras.

15.4.1. Estudios básicos

El cultivo in vitro es un excelente modelo experimental para el estudio de un enorme abanico de aspectos de la biología celular, citogenética, fisiología, metabolismo primario y secundario, morfogénesis y patología vegetal. Esto es así porque a nivel de laboratorio, los cultivos in vitro de células o tejidos destacan por su facilidad de obtención, manejo o interpretación, bien para entender qué le sucede a una célula vegetal cuando se la cultiva in vitro, o bien con el objeto de extrapolar la información obtenida a situaciones in vivo, naturales.

La nutrición y el metabolismo celular fue el primer aspecto investigado del cultivo in vitro vegetal. Y para ello, las suspensiones celulares son herramientas sumamente útiles. Usando este modelo experimental se han estudiado diversas rutas bioquímicas y metabólicas, del metabolismo primario y secundario, la regulación del nitrógeno inorgánico y la asimilación del azufre, el metabolismo de los carbohidratos, y el metabolismo fotosintético del carbono. Por ejemplo, el desarrollo de técnicas de cultivo in vitro para aplicación a plantas medicinales ha dado lugar a la identificación de más de 80 enzimas implicados en la biosíntesis de alcaloides. Resultados similares se han derivado de la utilización de cultivos celulares para estudios sobre aspectos moleculares y bioquímicos de otras áreas del metabolismo secundario, lo cual está permitiendo un rápido

avance del sector de la ingeniería metabólica para la producción de metabolitos secundarios en plantas, y abre importantes sectores de negocio en el terreno de la biotecnología verde (vegetal). Además, las suspensiones celulares sirven para proporcionar protoplastos a partir de los cuales obtener orgánulos intactos y viables para su estudio.

Otra área de investigación con la que el cultivo de tejidos fue asociado desde un primer momento es la morfogénesis, o el origen de la forma. El cultivo de tejidos ha contribuido significativamente a esta área, tanto en términos de conocimientos fundamentales como de su aplicación práctica. La *xilogénesis* o la formación de traqueidas se han utilizado para estudiar la diferenciación celular. Uno de los trabajos más importantes sobre la morfogénesis ha sido el de Skoog y Miller en 1957 sobre el equilibrio hormonal para la organogénesis. También gracias al estudio de la morfogénesis se evidenció que hay otra serie de sustancias adicionales más allá de las auxinas y citoquininas, que interactúan con ellas para inducir organogénesis *de novo*. Los avances en las herramientas de análisis fisiológico y bioquímico han permitido reexaminar el crecimiento proliferativo de los cultivos celulares durante la habituación e hiperhidricidad, relacionándolo con un posible crecimiento de tipo tumoral en plantas. Otro aspecto de la morfogénesis, como es la embriogénesis somática, también ha contribuido enormemente al conocimiento de los distintos procesos de proliferación y diferenciación que tienen lugar durante el desarrollo del embrión zigótico. Los cultivos celulares han desempeñado un papel importante en el estudio de la interacción planta-patógeno, no sólo en la generación de tumores, sino también en la bioquímica de la multiplicación de los virus, la acción de las fitotoxinas y la resistencia a enfermedades.

En biología celular y molecular los cultivos in vitro también han contribuido notablemente, por ejemplo en estudios del citoesqueleto, cambios cromosómicos en células cultivadas, ciclo celular, la regulación del metabolismo de los carbohidratos en transgénicos o el desarrollo de sistemas de transcripción in vitro. Pero muy probablemente, la contribución más importante del cultivo in vitro para estudios básicos ha sido el estudio y perfeccionamiento de las técnicas para transformación genética estable y posterior regeneración de plantas completas a partir del explante. La combinación de estas dos técnicas es la base de todas las aplicaciones de la biotecnología vegetal y la mejora genética que incluyen transgénesis. Por ello, el impacto que el cultivo in vitro ha tenido y tiene en estas disciplinas es trascendental. Por su gran relevancia, el lector podrá encontrar gran cantidad de información adicional en cualquier tratado actualizado de biotecnología vegetal.

15.4.2. Plantas libres de patógenos

En 1946, E. Ball regeneró plántulas de *Lupinus* y *Tropaeolum* a partir ápices con tan solo un par de primordios foliares. La importancia de este hallazgo no fue reconocida hasta años después, cuando se utilizó el mismo método para obtener plantas libres de virus en orquídeas. A partir de entonces, esta técnica

fue rápidamente explotada, en particular con ornamentales. Los primeros estudios demostraron que los meristemos radiculares estaban libres de virus, y más tarde se observó que la cantidad de virus en los meristemos apicales era también muy baja. Esta idea tuvo su confirmación definitiva con la obtención de plantas libres de virus en *Dahlia* a partir del cultivo de meristemos apicales de plantas infectadas. Se vio que la eliminación de los virus era posible porque los tejidos vasculares dentro de los que el virus se mueve no se extienden a los meristemos de los ápices radicular y caulinar. El método del cultivo de meristemos fue luego perfeccionado por F. Quack (1961), y a partir de ese momento se constituyó en una técnica rutinaria de saneamiento de material vegetal frente a contaminaciones por virus, bacterias u hongos.

Este enfoque es especialmente necesario en el caso de materiales infectados por virus, ya que en los otros dos casos, tanto bacterias como hongos pueden ser combatidos y eliminados de las plantas eficazmente mediante el uso de agentes bactericidas y fungicidas. A menudo, el cultivo de meristemos se combina con tratamientos de termoterapia o quimioterapia para erradicar los virus. Uno de los principales usos de las plantas libres de patógenos se refiere al almacenamiento y conservación de germoplasma y al transporte de material vegetal vivo a través de las fronteras internacionales, para lo cual es imprescindible un estado fitosanitario adecuado. Por ello no es extraño que se combine el cultivo de meristemos, previo a la preparación del germoplasma para su almacenamiento o transporte, mediante cualquiera de las alternativas que se verán a continuación.

15.4.3. Conservación de germoplasma

Tradicionalmente, el germoplasma vegetal se ha mantenido en el medio-largo plazo en forma de semillas, almacenadas en lugares especialmente acondicionados para ello, denominados *bancos de germoplasma*. Pero además, los avances en la tecnología de regeneración in vitro de plantas enteras a partir de células somáticas y gaméticas han permitido que éstas técnicas sean también una alternativa para la conservación de germoplasma en forma de cultivo in vitro. Para ello se han desarrollado principalmente tres enfoques:

- el almacenamiento a baja temperatura sin congelación (1-9°C), en nevera, lo cual ralentiza su crecimiento al tiempo que no compromete su viabilidad.
- la criopreservación para mantener a largo plazo suspensiones celulares, ápices caulinares, embriones asexuales e incluso plántulas jóvenes. Para ello hay que tratar primero el explante con un agente crioprotector, y después congelarlas y almacenarlas a la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C).
- el mantenimiento de explantes en cultivos in vitro (Figura 15.4) a los que se les puede añadir compuestos que retrasan el crecimiento, como por ejemplo la hidracida maleica, el B995 o el ácido abscísico.

Figura 15.4: Germoplasma vegetal conservado in vitro en forma de plántulas.
Imagen de Seguí Simarro.

15.4.4. Propagación clonal

El uso de la tecnología de cultivo de tejidos para la propagación vegetativa de plantas (también conocida como *micropropagación*) es la aplicación más utilizada del cultivo in vitro. Se ha utilizado con toda clase de plantas ya que permite la obtención rápida, económica y en poco espacio de un gran número de individuos. Además, estas plantas son clónicas, lo que garantiza una uniformidad en cuanto a tamaño, forma, estructura, rendimiento, calidad, etc. A pesar de sus ventajas, aún quedan algunos problemas por resolver, como por ejemplo la hiperhidricidad (vitrificación), o la aparición de plantas aberrantes.

Se utilizan básicamente tres estrategias para la micropropagación: la utilización de yemas axilares como explante, la inducción de organogénesis sobre explantes o sobre callos procedentes del explante, y la inducción de embriogénesis somática, también sobre explantes o sobre callos.

15.4.4.1. Cultivo de yemas axilares

Dado que este explante ya incluye una zona meristemática que funcionará como el meristemo apical de la planta regenerada, lo único que resta es conseguir el enraizado de los brotes. Durante mucho tiempo esto se ha venido haciendo colocando las yemas axilares en tubos o botes con medio de cultivo semisólido, utilizando una agente gelificante (agar comúnmente) para que el medio adopte una consistencia relativamente rígida, como un flan. En los últimos años se han puesto a punto otros métodos de enraizado más eficientes, como las balsas sobre medio líquido (Figura 15.5). En este sistema, los explantes son mantenidos mediante un soporte flotando sobre un medio líquido que incorpora todos los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para su enraizado.

Figura 15.5: Balsa de enraizado en medio líquido.
Imagen de dominio público, de Chi1112000 en Wikimedia Commons.

Las yemas axilares producen menor número de plántulas que los otros métodos, pero en general éstas son más genéticamente fieles a la planta donante del explante. A modo de ejemplo, numerosas plantas ornamentales son propagadas comercialmente a través de yemas axilares. Además, hay multitud de protocolos (a escala de laboratorio) para muchas otras clases de plantas, incluidos cultivos de campo, hortalizas, frutales y forestales. A pesar de esta abundancia de información, muy a menudo no se produce el salto del laboratorio al uso comercial de la técnica debido al consiguiente escalado de los costes de producción, que suelen ser el factor limitante.

Figura 15.6: Regeneración indirecta de brotes de tomate a partir de callos cultivados in vitro. En una sola placa de 9 cm de diámetro se cultivan 18 callos, y de cada uno de ellos surgen varios brotes.
Imagen de Seguí Simarro.

15.4.4.2. Inducción de organogénesis

La segunda de las estrategias de propagación clonal es la inducción de brotes adventicios mediante organogénesis, es decir, la inducción a partir de células del explante de todos y cada uno de los órganos que conforman una planta completa y funcional. La inducción puede ser directa sobre el explante o indirecta, a partir de un callo originado por la desdiferenciación de células del explante (Figura 15.6).

15.4.4.3. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática consiste en la inducción a partir de células somáticas del desarrollo de un embrión completo, y perfectamente capacitado para germinar y dar lugar a una nueva planta, genéticamente idéntica a la donante del explante. En el caso de la embriogénesis, la inducción suele ser indirecta, a partir de un callo embriogénico originado del explante. Para ello, el explante ha de ser capaz de generar callos embriogénicos. Suelen utilizarse inflorescencias o embriones inmaduros (sobre todo en cereales), por su capacidad de generar este tipo de callos. En leñosas, los explantes de tejidos maduros, diferenciados, pierden totipotencia. Como alternativa en algunas de estas especies se utilizan las nucelas de óvulos jóvenes. Este es el caso de *Citrus* sp, *Vitis vinifera*, *Malus domestica*, *Psidium guajava* o *Pyrus serotina*.

Esta es la técnica con mayor potencial para producir un gran número de plántulas, pero tiene la contrapartida de que el número de especies susceptibles a esta técnica es el menor de las tres. Sin embargo, la embriogénesis somática tiene una grandísima ventaja frente a estas otras dos técnicas, y es que se pueden producir semillas artificiales (Figura 15.7). Este proceso de embriogénesis

Figura 15.7: Semillas artificiales. Embriones somáticos de alcornoque (*Quecus suber*), encapsulados germinando in vitro. Imagen cortesía del Prof. José Antonio Manzanera, de la Universidad Politécnica de Madrid.

somática fue descrito por primera vez en 1958, aunque fue en 1977 Toshio Murashige quien expuso formalmente la idea de las semillas sintéticas en el congreso de la Sociedad Internacional de Ciencias Hortícolas de Gante (Bélgica).

Una vez obtenido el embrión somático, se encapsula en pequeños contenedores, rellenos de un material protector inerte (alginato). Este material debe además incluir nutrientes y antibióticos o fungicidas para una correcta preservación del embrión somático. La utilidad principal de este método es la de producir plantas genética y morfológicamente iguales (clones) a la especie de la que derivan. Y esto es especialmente útil en especies o individuos que tengan un cierto valor o característica que interese conservar. Por ejemplo en agricultura, para cultivar plantas con ciertas características de producción o calidad que no nos interese que varíen por la reproducción sexual, o para obtener semillas resistentes y duraderas de plantas que producen poca semilla, o de mala calidad. También son útiles para conservar por ejemplo en bancos de germoplasma, semillas delicadas que no se pueden deshidratar para su conservación por tener un elevado grado de humedad. Si se deshidratan para su conservación, pierden su viabilidad. De este modo, con semillas artificiales su viabilidad se ve claramente mejorada.

A día de hoy la producción de semillas artificiales es una realidad, y por ejemplo en el caso de especies forestales es una opción muy interesante de cara a abordar programas de reforestación de zonas deforestadas, áridas y quemadas. Un ejemplo muy cercano lo tenemos en la obtención en 2008 de semillas sintéticas de alcornoque por un grupo de científicos de la Universidad Politécnica de Madrid y el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA). Las primeras experiencias piloto en Cáceres han resultado positivas y se plantean la búsqueda de nuevas zonas donde repoblar con alcornoques mediante esta tecnología.

15.4.5. Obtención de metabolitos de interés

Las plantas superiores producen un gran número de productos químicos orgánicos de muy diversa naturaleza, y a menudo muchos de ellos tienen un gran interés industrial y farmacéutico. El primer intento de cultivar a gran escala células vegetales para la obtención de productos de interés farmacéutico se llevó a cabo en la década de 1950 por la compañía farmacéutica Charles Pfizer Co., aunque sin éxito. Fue este fracaso el que frenó la investigación en este ámbito en los Estados Unidos. En cambio, en otros países como Alemania o Japón en particular se continuó trabajando, lo que llevó a que en 1978 ya se considerase viable la aplicación industrial de los cultivos celulares para estos fines. Así, en 1987 habían ya 30 sistemas de cultivos celulares productores de metabolitos secundarios con una eficiencia mayor que las respectivas plantas origen.

Lamentablemente, muchos de los productos vegetales de importancia económica o bien no se producen en cultivos celulares o lo hacen en cantidades no lo suficientemente grandes. Para tratar de superar esta limitación y mejorar

el rendimiento en la producción de metabolitos secundarios se han adoptado diferentes estrategias:

- clonaje y selección recurrente de cepas de alto rendimiento.
- selección mediante técnicas de ensayo inmunoenzimático (ELISA) o de radioinmunoensayo.
- selección de líneas celulares mutantes que sobreexpresan y acumulan el producto deseado.
- utilización de una serie de factores, tanto abióticos (radiación ultravioleta, exposición al calor, al frío o a sales de metales pesados) como bióticos (inductores de origen vegetal y microbiano), que se ha comprobado que mejoran la producción de metabolitos secundarios.

Para el éxito de la producción comercial de sustancias biológicamente activas es fundamental la posibilidad real de escalado. Es decir, que sea factible el desarrollar sistemas que permitan crecer las células a gran escala. Esto se consigue utilizando sistemas de tanques reactores (biorreactores, Figura 15.8) con agitación y sistemas de aireación. Uno de estos sistemas es el de dos etapas (o bifásico), en el que en la primera etapa se potencia el crecimiento rápido de las células y la acumulación de biomasa, mientras que la segunda etapa se centra en la síntesis del producto deseado con un mínimo crecimiento o división celular.

Figura 15.8: Biorreactores.
Imagen de Eva Decker, de dominio público en Wikimedia Commons.

15.4.6. Fitorremediación

La *fitorremediación* es una moderna técnica de base biotecnológica para la remediación de suelos contaminados. El término fitoremediación, acuñado en 1991, define el conjunto de tecnologías que utilizan plantas para inmovilizar, destruir o extraer contaminantes en suelos, sedimentos y aguas subterráneas. En conjunto, ésta técnica se basa en el uso conjunto de plantas, enmiendas del suelo y técnicas agronómicas, para eliminar, absorber, degradar, retener, transformar o disminuir la toxicidad de los contaminantes del suelo, principalmente metales pesados, compuestos orgánicos, radioactivos y petroderivados. Es decir, se trata de explotar la capacidad fisiológica y bioquímica de ciertas plantas (terrestres, acuáticas, leñosas, etc.), o de los cultivos in vitro derivados de ellas, para degradar, asimilar, metabolizar o detoxificar sustancias contaminantes y así eliminar, contener o transformar productos contaminantes del entorno.

Esta tecnología reúne un gran número de ventajas, de entre las que destacan la limpieza y la economía: no utilizan reactivos químicos peligrosos, ni afectan negativamente a la estructura del suelo, sólo aplican prácticas agrícolas comunes. Además, el proceso se realiza *in situ*, evitando costosos transportes. La fitorremediación se puede aplicar tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos, presentes en sustratos sólidos, líquidos o en el aire. Las bases conceptuales de la fitorremediación provienen de la identificación de plantas que hiperacumulan metales. Existen vegetales que tienen esta capacidad intrínseca, pero también pueden obtenerse plantas con estas capacidades aumentadas por medio de técnicas de transformación genética y cultivo in vitro.

Existen diversas posibilidades de uso de las plantas para fitorremediación. En todas ellas el papel que ejerce el cultivo in vitro es fundamental como herramienta para la rápida propagación y transporte del material vegetal adecuado. Por ejemplo, es de vital importancia por su potencial para hacer frente a cualquier accidente o catastrofe ecológica que precise de una rápida respuesta en términos de remediación. Pero además de su ventaja de transporte *in situ*, los cultivos de células y tejidos tienen el potencial de ser utilizados a gran escala para fitoextracción y fitodegradación en bioreactores y plantas depuradoras a las que se puede transportar el líquido a depurar. A día de hoy, se puede afirmar que estamos en un momento todavía inicial del desarrollo científico de las fitotecnologías de descontaminación, pero prometedor a medio plazo ante el conjunto de experiencias positivas realizadas.

15.4.7. Mejora vegetal

La mejora vegetal es la disciplina donde el cultivo in vitro ha aportado y está aportando más, siendo hoy en día una herramienta insustituible. A partir de la década de los 70, los métodos in vitro se han venido utilizando frecuentemente como un complemento a los métodos tradicionales de mejora vegetal. En la

actualidad, su uso ya no es complementario, sino imprescindible para muchas facetas de la mejora. Por ejemplo, para generar variabilidad.

Aunque la aparición de mutaciones inducidas por el propio cultivo in vitro (por ejemplo, que desarrollan *habituación*) se conoce desde la década de 1940, fue en la década de 1970 cuando se trató de utilizar para la mejora vegetal. Esta variación, denominada *variación somaclonal* depende de la variación natural en la población celular, ya sea preexistente o, como sucede en muchos casos, inducida por el cultivo. De hecho, el cultivo in vitro provoca en las células del explante alteraciones de su material hereditario (mutaciones, translocaciones, adiciones, deleciones, etc.), fruto del entorno físico-químico artificial al que se ven sometidas. Por lo general, la variación somaclonal se observa en las plantas regeneradas. Algunas de ellas desarrollarán características indeseables, o incluso letales, con lo que no llegarán jamás al mercado. Pero otras, por puro azar, tendrán características nuevas y deseables de cara a su comercialización. Por ejemplo, flores, hojas o frutos de colores o formas nuevas, producción o desaparición de pigmentos, variegaciones, tamaños o portes nuevos o infrecuentes, distintas lobulaciones en las hojas, etc.

Todo esto hace que esta fuente de variación inherente al cultivo in vitro tenga actualmente un elevado impacto potencial como fuente de nuevas combinaciones génicas y por tanto de nuevas variedades en la agricultura, la horticultura o la industria de las especies ornamentales, en la que se persigue constantemente la generación de nuevas variedades, distintas a las existentes en el mercado. En la práctica ha sido posible producir un amplio espectro de células mutantes en cultivo, con amplios espectros de diferencias bioquímicas y de resistencias a antibióticos, herbicidas y estrés, así como mutantes auxótrofos, autótrofos, y con alteraciones en el desarrollo. Sin embargo, sólo en pocos casos ha sido posible la obtención de plantas completas con los caracteres deseados a partir de dichos mutantes. Como ejemplos cabe citar la obtención de plantas de tabaco resistentes a herbicidas, y de *Datura innoxia* resistentes a metil-triptófano.

Más allá de la variación somaclonal, existen muchas otras aplicaciones del cultivo in vitro en la mejora vegetal que implican explantes de naturaleza tanto somática (no implicados ni directa ni directamente en la reproducción sexual) como germinal. Las técnicas de cultivo in vitro que involucren explantes procedentes de la línea germinal, o de tejidos implicados en la reproducción sexual los veremos en los próximos temas. Y dentro de los explantes de naturaleza somática, veremos la técnica de obtención y fusión de protoplastos. Los protoplastos son células vegetales desprovistas artificialmente de pared celular. La fusión de protoplastos proporciona a la mejora vegetal una valiosa herramienta para abordar la superación de barreras a la hibridación interespecífica de una forma radicalmente distinta a cualquier otro abordaje. La veremos con más detalle en el tema 21, en el contexto de la superación de barreras a la hibridación.

15.5. Presente y futuro del cultivo in vitro

A día de hoy, las numerosas y variadas técnicas de cultivo de células y tejidos disponibles se utilizan con todo tipo de plantas, incluyendo cereales y gramíneas, leguminosas, hortícolas, patatas y otras raíces y tubérculos, semillas oleaginosas, frutales de clima tanto templado como tropical, cultivos multianuales, leñosas forestales y plantas ornamentales. En este inmenso abanico de especies, la aplicación del cultivo in vitro abarca a todos los métodos in vitro que puedan ser aplicables a la especie y al problema de que se trate. Sin embargo todavía quedan retos que abordar, ya que por ejemplo el éxito conseguido en la explotación de la variación somaclonal o en la regeneración de plantas útiles a partir de células mutantes es aún limitado. Asimismo, muchas de las enormes expectativas inicialmente generadas con la tecnología de fusión de protoplastos no han llegado a concretarse en la práctica.

Por el contrario, otras aplicaciones del cultivo in vitro sí han tenido una mayor éxito y han experimentado una espectacular avance. Así, los cultivos de células y tejidos son y seguirán siendo un instrumento importante en el estudio de la morfogénesis, a pesar de que el uso actual de mutantes del desarrollo, en particular los de *Arabidopsis thaliana*, está proporcionando información muy valiosa sobre el desarrollo vegetal. En ámbitos más aplicados, se han hecho grandes progresos en cuanto a la propagación clonal a escala industrial de material vegetal, habiendo ya muchas empresas que incorporan estas técnicas de forma rutinaria. También se ha avanzado mucho en la criopreservación de germoplasma para almacenamiento, en la obtención de semillas artificiales o en la obtención de doble haploides androgénicos (ver tema 19). Estas son las líneas que marcarán muy posiblemente el desarrollo de las aplicaciones futuras del cultivo in vitro.

15.6. Resumen

La capacidad de que hacen gala las plantas para multiplicarse y regenerarse en su totalidad o solo las partes que le faltan, puede ser utilizada por el ser humano para obtener plantas y cultivos más uniformes, de forma más rápida y más económicamente. Por un lado, existen una serie de técnicas para inducir a que una planta se reproduzca de forma asexual. Muchas de estas técnicas han sido utilizadas por los agricultores desde hace siglos para multiplicar rápidamente sus plantas o para mantener características de interés sin que se diluyan en la descendencia sexual.

Por otro lado, el conocimiento y explotación de la capacidad totipotente de las células vegetales ha permitido el desarrollo de un amplio abanico de técnicas de cultivo in vitro. Mediante estos procedimientos es posible el desarrollo de una serie de aplicaciones biotecnológicas que suponen en muchos casos la apertura de nuevos horizontes en la explotación del potencial biotecnológico de las plantas, y en otros casos la consecución de objetivos ya alcanzables, pero por vías mucho más rápidas, económicas o sencillas. Existen aplicaciones concretas

del cultivo in vitro en áreas de la biotecnología vegetal como la obtención de plantas libres de patógenos, la conservación de germoplasma, la propagación clonal, la obtención de metabolitos de interés, la fitorremediación o la mejora vegetal. En esta última la contribución del cultivo in vitro es especialmente relevante. Además de las vistas en este tema, en los próximos veremos muchas otras relativas a la utilización de tejidos reproductivos como explantes.

15.7. Información adicional

- Ball E. 1946. Development in sterile culture of stems tips and subjacent regions of *Tropaeolum malus* L. and of *Lupinus albus* L. American Journal of Botany, 33: 301-318.
- Bhojwani S.S., Razdan M.K. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Developments in Crop Science, Vol. 5. Elsevier, Amsterdam.
- Bhojwani S.S., Soh W.-Y. 1999. Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Publishers. Dordretch, The Netherlands.
- Bhojwani S.S., Soh W.-Y. 2003. Agrobiotechnology and plant tissue culture. Science Publishers. Enfield, New Hampshire, USA.
- Bourgin J.P., Nitch J.P. 1967, Obtention de *Nicotiana* haploides a partir de'étamines cultivées in vitro. Annales de Physiologie Végétale, 9: 377-382.
- Conger B.V. 1981. Cloning Agricultural Plants Via In Vitro Techniques. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Dodds J.H., Roberts L.W. 1995. Experiments in Plant Tissue Culture. (3rd Edition). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. Disponible on-line en: http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/biotec.htm
- Guha S., Maheshwari S.C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of Datura. Nature, 204: 497.
- Hvoslef-Eide A.K., Preil W. 2005. Liquid culture systems for in vitro plant propagation. Springer, Dordretch, The Netherlands.
- Johri B.M., Bhojwani S.S. 1965. Growth responses of mature endosperm in cultures. Nature, 208: 1345-1347.
- Laibach F. 1929. Ectogenesis in plants. Methods and gene tic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. Journal of Heredity, 20: 201-208.
- Loyola-Vargas V.M., Vazquez-Flota F. 2006. Plant Cell Culture Protocols. 2nd edition. Vol. 318 de la serie Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.

- Murashige T. 1977. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. Acta Horticulturae, 78: 17-30.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Pardos J.A., Toribio M. 1984. El cultivo in vitro aplicado a la mejora forestal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid.
- Pierik R.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Mundi-Prensa, Madrid.
- Pintos B., Bueno M.A., Cuenca B., Manzanera J.A. 2008. Synthetic seed production from encapsulated somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) and automated growth monitoring. Plant Cell Tissue And Organ Culture, 95: 217-225.
- Quack F. 1961. Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus-free plants. Advances in Horticultural Sciences and their Applications. Proceedings of the .15th International Horticultural Congress, 1958, 1: 144-148.
- Razdan M.K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. 2nd Edition. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire, USA.
- Roca W.M., Mroginski L.A. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Seguí-Simarro, J.M. 2009. Dos sexos ¿para qué?: Aspectos celulares, genéticos y agronómicos de la reproducción asexual de las plantas. In: Un breve viaje por la ciencia. Editorial de la Universidad de La Rioja, Logroño, La Rioja. Pp 63-69. ISBN: 978-84-96487-46-8.
- Seguí Simarro J.M. 2010. El siglo de oro de la biotecnología vegetal. Cien años que han cambiado nuestra visión de las plantas. Premio Casa de las Ciencias 2010. Casa de las Ciencias, A Coruña. Pendiente de publicación.
- Slater A., Scott N.W., Fowler M.R. 2008. Plant Biotechnology, 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Trigiano R.N., Gray D. 2010. Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology. CRC Press.
- Tukey H.B. 1934. Artificial culture methods for isolated embryos of deciduous fruits. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 32: 313-322.
- Vasil I.K. 1994. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1, Laboratory Procedures and Their Applications. Academic Press, New York.
- Vasil I.K., Thorpe T.A. 1994. Plant Cell and Tissue Culture, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.

TEMA 16: Biotecnología del desarrollo floral

La flor es la piedra angular sobre la que gira toda la biología reproductiva sexual de la planta. Vimos en el tema 3 que la flor es la parte de la planta que alberga los órganos reproductores, tanto masculinos como femeninos. Es la estructura donde se van a llevar a cabo todos los procesos esenciales que tengan que ver con la reproducción sexual, como la producción de los gametos, la fecundación y la formación de semilla y fruto. Sus formas, aromas y colorido tienen una función biológica muy clara y definida, que no es otra que atraer a los distintos agentes polinizadores (insectos y aves principalmente) y de este modo asegurar el transporte del polen de una flor a otra. Pero además, estas mismas características hacen que para el ser humano pocas cosas en la naturaleza sean tan evocadoras como una flor. Todos hemos regalado algún ramo de flores alguna vez, en el día que una madre da a luz, algún familiar o amigo se casa, o cumple años, o simplemente el día de los enamorados. La belleza de las flores ha sido desde siempre fuente de inspiración de pintores, compositores, poetas y escritores en general. Las flores han inspirado desde cuadros de valor incalculable como *Los girasoles* de Van Gogh hasta perfumes de precio calculable, pero muy elevado. En definitiva, todas las connotaciones que las flores tienen en nuestra sociedad han hecho de la floricultura un boyante negocio. Y aquí, también, la biotecnología tiene un importante papel en lo que se ha dado en llamar *biotecnología floral*.

Como vimos en los temas 4 y 5, En la actualidad es mucho lo que ya se conoce sobre el control genético del desarrollo floral, y sobre el papel que distintos genes tienen en control del tiempo de floración o en el control de la propia floración, entendiendo como tal la transición de un ápice de la planta que se desarrolla de modo vegetativo, produciendo ramas y hojas, y que en un momento dado pasa a ser floral. Se sabe también bastante sobre qué genes determinan el hecho de que en una flor los sépalos verdes aparezcan por fuera, seguidos de los pétalos coloreados y en el interior estén los órganos sexuales. En este tema veremos cómo pueden aplicarse estos conocimientos a la obtención de plantas con características distintas en cuanto a floración, o en cuanto a las flores en si mismas o a algunas de sus partes. En concreto, nos centraremos sobre todo en los pétalos, que son los que más atractivo e interés despiertan en el ámbito de la floricultura.

16.1. Aplicaciones biotecnológicas del control de la inducción a floración

El conocimiento de los genes que permiten la transición del meristemo de vegetativo a inflorescente puede tener una gran utilidad desde el punto de vista aplicado, para crear plantas más o mejor adaptadas a nuestros intereses. Así, sabemos que la expresión de los homólogos de los genes *LEAFY* o *APETALA1* de arabidopsis o el gen *INDETERMINATE1 (ID1)* de maíz permiten dicha transición. Por tanto, si manipulamos esos genes, estaremos controlando la transición.

Por ejemplo si diseñamos una planta transgénica que contenga copias de estos genes pero bajo el control de un promotor constitutivo, que siempre se exprese, tendremos una transición precoz a floración. Esto ya se ha hecho y se ha comprobado en álamos transgénicos. Por el contrario, si impidiéramos total o parcialmente la expresión de dichos genes, por ejemplo mutándolos, tendríamos una floración tardía, escasa o totalmente ausente. De hecho, en *Arabidopsis thaliana*, mutaciones en genes de este tipo provocan un desarrollo floral incompleto o nulo.

Del mismo modo, se sabe también bastante sobre qué genes determinan el hecho de que en una flor los sépalos verdes aparezcan por fuera, seguidos de los pétalos coloreados y en el interior estén los órganos sexuales. A esto contribuyeron de forma decisiva los científicos Enrico Coen y Elliot Meyerowitz con su modelo ABC, como vimos en el tema 5. Catorce años después este modelo ha sido ampliado y matizado, pero sus bases siguen intactas. La identificación de los genes responsables de la identidad de cada órgano floral, y su manipulación para expresarlos donde no lo hacen de forma natural, o para reprimirlos donde deberían expresarse, permite la obtención biotecnológica de nuevos tipos florales mediante manipulación genética. Por ejemplo, flores con mayor número de pétalos, o sin alguno de los órganos reproductores del interior de la flor (estambres o pistilo) o en general, con cualquier tipo de combinación de piezas florales.

Estas ideas han llevado a pensar en la posibilidad de controlar o inhibir la floración en determinados cultivos en los que esto sería muy interesante. Por ejemplo, en plantas forrajeras, en las que lo realmente útil son las hojas, que son las que consume el ganado. Además, cuando comienza la transición hacia la floración en estas especies se forman cañas florales e inflorescencias que reducen la calidad del cultivo como forraje, pues no son tan nutritivas ni apetecibles por el ganado. La mutación o el silenciamiento (mediante tecnología de ARN antisentido) permite que no se expresen los homólogos de los genes mencionados en cada especie y que se mantenga por tanto la planta en un estado vegetativo, cuando es eso lo que interesa. Esto permite además una mejora en los patrones de crecimiento estacional. Otra ventaja añadida es que el bloqueo de estos genes impediría la formación de flores, y por tanto de polen o semillas. Se trataría pues de un sistema eficiente de contención para evitar que los transgenes de estas especies se diseminaran más allá de los cultivos a los que están confinados. Si los transgenes estuvieran bajo control de un promotor inducible, podríamos además activar o desactivar la transición a floración añadiendo o eliminando el agente inductor (activador) del promotor.

En definitiva, desde un punto de vista aplicado a la agricultura, la manipulación de los genes que controlan la floración tiene un gran potencial. En una entrevista publicada en el diario El País en 2006, Miguel Ángel Blazquez, Investigador del IBMCP-CSIC experto en el control genético de la floración, decía lo siguiente: "*Conocer el mecanismo de floración de las plantas nos permitirá intervenir en él en provecho nuestro. Se puede conseguir que plantas que sólo florecen*

una vez, repitan cosecha en un mismo año. O se puede adelantar o retrasar el momento de floración según los intereses comerciales. Por ejemplo, los agricultores valencianos están muy interesados en ser los primeros y los últimos en vender sus naranjas porque es entonces cuando los precios son más altos. Pues se podría conseguir, tal vez jugando con los niveles de FT, que los naranjos florecieran antes al principio de la temporada, o más tarde cuando ya empiezan a escasear las naranjas".

16.2. Aplicaciones biotecnológicas del desarrollo floral

La identificación de los genes responsables de la identidad de cada órgano floral, y su manipulación para expresarlos donde no lo hacen de forma natural, o para reprimirlos donde deberían expresarse, permite la obtención biotecnológica de nuevos tipos florales mediante manipulación genética. Por ejemplo, flores con mayor número de pétalos, o sin alguno de los órganos reproductores del interior de la flor (estambres o pistilo). Todo esto tiene un claro interés para el sector de la floricultura, cuyo principal objetivo es desarrollar nuevas variedades de interés ornamental.

16.2.1. Desarrollo de los pétalos

Uno de los órganos florales que más interés despierta en el mundo de la floricultura son los pétalos. De hecho, la modificación de los pétalos ha sido desde siempre un objetivo prioritario de los mejoradores de especies ornamentales. Tener una flor más poblada de pétalos o con pétalos más grandes es siempre un valor añadido. A este respecto, hoy en día es posible manipular los varios genes que se conocen involucrados en el desarrollo de los pétalos (al igual que los implicados en el desarrollo de los otros verticilos). Esto se ha aprovechado para obtener mediante transformación genética flores con mayor cantidad de pétalos. Sin embargo, uno de los aspectos que más interés despierta en el sector de la floricultura es la manipulación del color de los pétalos. O dicho de un modo más técnico, la manipulación de las rutas de biosíntesis de los distintos pigmentos que se combinan para dar el color final de los pétalos.

En la actualidad también se conoce mucho a este respecto. Por ejemplo, se sabe que el color de las flores se debe principalmente a tres tipos de pigmentos, los *flavonoides*, los *carotenoides* y las *betalaínas*. Los flavonoides son los pigmentos más comunes y contribuyen a un amplio rango de colores que va desde el amarillo hasta el rojo y el azul. Dentro de los flavonoides, los más importantes son las *antocianinas*. De entre ellas, destacan la *pelargonidina* (color anaranjado), la *cianidina* (color rojo) y la *delfinidina* (color azul). Los carotenoides contribuyen a formar los colores naranja/rojo, bronce y marrón, frecuentes en las rosas y crisantemos. Son también los que proporcionan el típico color naranja de las zanahorias que todos conocemos. Las betalaínas son los pigmentos menos abundantes, y contribuyen a la aparición de diversas gamas cromáticas que van desde el marfil o amarillo al naranja, rojo y violeta.

Se conocen también algunos de los genes implicados en las rutas biosintéticas de estos pigmentos. Sin embargo, estas rutas son tan complejas y están tan influenciadas por el entorno que rodea la planta, que en la práctica se hace muy complicado modificarlas para generar nuevas combinaciones de colores mediante técnicas de mejora genética clásica, basadas en el cruzamiento (hibridación) y la selección de la descendencia resultante. Además, en muchas especies no siempre es posible encontrar una segunda especie emparentada, sexualmente compatible, y que tenga el gen o genes que confieran el color deseado. No obstante, hay otras aproximaciones biotecnológicas que sí funcionan. Por ejemplo, insertar genes que produzcan otros pigmentos distintos, atractivos, y que enmascaren los naturales. Esta es la estrategia utilizada por la empresa australiana Florigene para producir claveles de la gama *Moondust*, que lucen distintas tonalidades de morado gracias a la inserción de un gen de petunia que permite la síntesis del pigmento *delfinidina* (Figura 16.1). En petunia, la introducción de la secuencia del gen de la *chalcona sintasa* hizo que estas flores acumularan chalconas, unos pigmentos que provocan en los pétalos una tonalidad amarilla pálida.

Figura 16.1: Claveles *Moondust* de Florigene
Imagen de Pagemoral, en Wikimedia Commons, bajo licencia Creative Commons Attribution Sharealike 3.0.

Otra estrategia para conseguir nuevos colores consiste en incativar uno de los genes que participan en la ruta biosintética de producción de un determinado pigmento, para que surja una nueva combinación de pigmentos que genere un nuevo color o distribución de colores en la flor. Esta técnica se denomina *silenciamiento génico*. El silenciamiento génico consiste en insertar un transgen cuyo efecto sea interferir en la expresión del gen que se quiere silenciar, con lo cual su producto final no llega a producirse o lo hace en niveles muy bajos. De este modo se llegaron a producir petunias de varios colores, y combinaciones de

ellos (Figura 16.2). De igual modo se consiguieron las tan ansiadas rosas azules (Figura 16.3), en las que para que fuera visible el pigmento azul del transgen insertado hubo previamente que silenciar un gen de la rosa responsable del color rojo, porque de lo contrario resultaban colores lilas o agrisados.

Figura 16.2: Ejemplos de silenciamiento génico en flores de plantas transgénicas de petunia. La flor izquierda es una flor normal, no transformada. La central y derecha están transformadas con transgenes que provocan la supresión zonal del pigmento morado típico de estas flores, generando áreas blancas por ausencia de pigmento.

Imagen de M.A. Matzke, A.J.M. Matzke; J. Kooter, N. Doetsch y R. Jorgensen, publicada bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 en Matzke y Matzke, 2004 (ver sección 16.5, Información adicional).

De este modo también se consiguió hace ya años alterar la pigmentación de las flores de crisantemo, insertando un transgen antisentido que interfiere con el de la chalcona sintasa. En clavel se consiguió bloquear la ruta de síntesis

Figura 16.3: Rosas azules

Imagen de Kent Wang, en Flickr.com bajo licencia Creative Commons Attribution Share Alike 2.0.

de las antocianinas insertando una secuencia antisentido para la *flavonona 3-hidroxilasa*, con lo que se logró modificar el color original y generar nuevas combinaciones de pigmentos. Curiosamente, estos genotipos transgénicos con expresión reprimida de flavonona 3-hidroxilasa eran mucho más fragantes que los controles no modificados genéticamente, debido a incrementos de entre 10 a 100 veces en los niveles de los derivados del ácido benzoico. Se podría decir que se mejoraron dos caracteres de interés por el precio de uno.

16.2.2. Forma de flores y plantas ornamentales

También se ha utilizado la ingeniería genética para modificar no solo el color, sino la forma de las flores y de las plantas en su totalidad. Se comprobó que la inserción del gen rolC de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* en diversas especies vegetales de interés tanto ornamental como agronómico, provocaba un gran número de efectos en la planta, muchos de ellos de valor ornamental. Por ejemplo en geranios, la introducción del gen rolC hizo que las plantas transformadas presentaran un menor tamaño, flores más pequeñas y pétalos y hojas modificadas. En clavel este transgen provoca una serie de modificaciones morfológicas muy deseables como la disminución de la dominancia apical, además de otras características no ornamentales también deseables como mayor capacidad de enraizamiento, mejor incorporación de metabolitos y mayor producción de varas. Todo ello en conjunto supone una importante mejora en el rendimiento del cultivo.

16.2.3. Senescencia floral

Otro aspecto también de gran interés para la floricultura es la senescencia floral. En el momento en que se corta una flor de la planta para hacer un ramo o colocarla en un florero, la flor comienza a marchitarse, a perder sus vistosos colores, y finalmente a morir. Incluso sin cortarla, vimos en el tema 5 que las flores tienen un ciclo por el cual si no son fecundadas entran en senescencia y en abscisión y acaban cayendo. Sería muy interesante impedir o tratar de retrasar al máximo este proceso para que las flores duren más con un aspecto turgente y saludable. También en este caso, la biotecnología nos brinda herramientas para conseguirlo. Por un lado, esto se ha venido haciendo mediante la aplicación a la flor de sustancias inhibidoras de la síntesis de etileno, la fitohormona responsable de la senescencia y caída (abscisión) de las flores y también de las hojas y los frutos. Al impedirse la síntesis de etileno, la flor tarda más en marchitarse una vez cortada, se retrasa el enrollamiento de los pétalos y se retrasa en general su envejecimiento.

Mediante la tecnología antisentido antes mencionada también se ha conseguido inhibir la síntesis endógena de etileno. Por ejemplo, la empresa Florigene también desarrolló y patentó los claveles LVL o Long Vessel Life (larga vida en el florero). En estos claveles se bloquea de la síntesis de etileno alterando en varios puntos su ruta metabólica. Por un lado, se suprime la expresión de la enzima

ACC sintasa, que convierte a la adenosilmetionina en ACC (ácido 1 amino ciclo propano-1-carboxílico). Por otro lado, se suprime también la expresión del enzima ACC oxidasa, responsable directo de la producción de etileno a partir de ACC. Esta tecnología transgénica ofrece además importantes ventajas desde un punto de vista ecológico, pues hasta ahora los agricultores venían utilizando sales de plata, altamente contaminantes, para prevenir la producción de etileno post-cosecha. Gracias a esta tecnología se pueden evitar las sales de plata.

16.3. Otras aplicaciones biotecnológicas de interés ornamental

Además de la forma, el color o la senescencia de la flor o de la planta, hay otra serie de características interesantes para mejorar mediante transgénesis en el campo de la biotecnología floral. Estas tienen que ver con la modificación de la fragancia, el control de la floración o la mejora de la eficiencia de enraizamiento. Otras características interesantes son las mismas que para muchos otros cultivos, como la incorporación de características de resistencia a ataques de insectos, a enfermedades fúngicas y víricas, de tolerancia a herbicidas, androesterilidad, etc.

En definitiva, la transformación genética tiene en la actualidad una clara aplicación real y un enorme éxito en el campo de la biotecnología floral. De hecho hay ya muchas empresas como la citada Florigene que se dedican a la obtención de nuevas variedades ornamentales mediante modificación genética. Este éxito viene en gran medida propiciado por el hecho de que las plantas transgénicas ornamentales, sobre todo aquellas destinadas a producir flores de corte, carecen de las implicaciones éticas y sociales que presentan otras transgénicas. Al no estar destinadas al consumo como alimento, y al estar su cultivo confinado a los invernaderos que las producen, esta aplicación no está tan denostada como otras por la opinión pública.

16.4. Resumen

La biotecnología del desarrollo floral consiste en manipular los procesos que llevan a la formación de la flor o de los órganos que la componen. Por una parte, alterar las rutas génicas que controlan la inducción de la floración nos permite acelerar o retrasar o incluso bloquear esta floración, lo cual puede tener interés en muy diversos aspectos de la agricultura. Por otra parte, podemos alterar la aparición de los distintos órganos florales actuando sobre los genes que controlan su desarrollo. Esto tiene un gran interés en la floricultura y la producción de plantas ornamentales. Dentro de los órganos florales, los que más interés ornamental tienen son los pétalos. Alrededor de ellos y de su modificación con fines ornamentales se han desarrollado diversas líneas de investigación cuya principal finalidad es modificar sus colores, fragancias, número y forma.

También tiene un claro interés ornamental la manipulación de los factores que hacen que la flor entre en senescencia, para tratar de que dure más con un aspecto saludable una vez cortada. A este respecto también se han hecho

progresos, fundamentalmente alrededor del papel del etileno, el principal efector de esta entrada en senescencia. Se pueden aplicar directamente a la flor inhibidores de la síntesis del etileno, o bien actuar mediante modificación genética sobre la ruta biosintética de esta hormona, a fin de que sus niveles endógenos sean más bajos, y por tanto la senescencia se retrase.

16.5. Información adicional

- Boase M.R., Winefield C.S., Lill T.A., Bendall M.J. 2004. Transgenic regal pelargoniums that express the rolC gene from *Agrobacterium rhizogenes* exhibit a dwarf floral and vegetative phenotype. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 40: 46-50.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biology Publisher, USA.
- CSIRO. Informe sobre cómo se obtuvo la primera rosa azul (recurso online). http://www.csiro.au/files/files/p29z.pdf
- Dixon R., Steele C. 1999. "Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering". Trends in Plant Science, 4: 394-400.
- Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA, Buenos Aires. Disponible en http://www.argenbio.org/h/biblioteca/libro.php
- El País. Entrevista del 4 de enero de 2006 a Miguel Ángel Blázquez, investigador del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC.
- Florigene, Inc (página web de la empresa). http://www.florigene.com
- Forkmann, G., Martens S. 2001. Metabolic engineering and applications of flavonoids. Current Opinion in Biotechnology, 12: 155-160.
- Gardner N., Melberg T., George M., Smith A.G. 2006. Differential expression of rolC results in unique plant phenotypes. Journal of the American Society for Horticultural Sciences, 131: 82-88.
- Hwang E.I., Kaneko M., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2003. Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. Applied and Environmental Microbiology. 69 (5): 2699-706.
- Jordan B.R. 2006. The Molecular Biology and Biotechnology of Flowering, 2nd edition. CABI Publishing. Wallingford, UK.
- Matzke M.A., Matzke A.J.M. 2004. Planting the Seeds of a New Paradigm. PLoS Biology 2(5): e133. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020133.
- Meyer P., Heidmann I., Forkmann G., Saedler H. 1987. A new Petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. Nature, 330: 667-668.

- Mol J., Cornish E., Mason J. Koes R. 1999. Novel coloured flowers. Current Opinion in Biotechnology, 10: 198-201.
- Tanaka Y., Mason J. 2003. Manipulation of flower colour by genetic engineering. In: Singh R.P., Jaiwal P.K. (eds) Plant Genetic Engineering (pp 361-385). SCI Tech Publishing, Houston.
- Tanaka Y., Tsuda S., Kusumi T. 1998. Metabolic engineering to modify flower colour. Plant Cell Physiology, 39: 1119-1126.
- Woodson W.R., Jones M.L. 2003. In Search of Eternal Youth: The Delay of Postharvest Senescence in Flowers. Acta Horticulturae. 624: 305-314.

TEMA 17. Biotecnología del polen (I)

Vimos en el tema anterior que es posible interferir en muchas de las rutas génicas que determinan la inducción de la floración o la formación de los pétalos para conseguir individuos con características de interés desde un punto de vista ornamental. Otra serie de genes implicados en etapas posteriores del desarrollo reproductivo, o en el desarrollo de otros órganos florales pueden conferir otros fenotipos también deseables desde el punto de vista agronómico. Por ejemplo, la manipulación (mutación o silenciamiento) de los genes implicados en el desarrollo de la antera y sobre todo en el desarrollo del gametófito masculino (el polen) puede dar lugar a la aparición de fenotipos androestériles, deseables para el mejorador por evitar la necesidad de emasculación manual. Otro ejemplo es la manipulación de las moléculas del polen que provocan alergias en la población, para evitar que lo hagan.

La cubierta del polen y el estudio de su ornamentación (palinología) tiene una gran repercusión más allá de su utilización taxonómica. De hecho, es de gran ayuda en sectores tan dispares como la industria petroquímica o la criminología. El polen también tiene una serie de propiedades alimenticias y terapéuticas que han hecho surgir un gran sector de negocio a su alrededor. En este tema veremos estas y otras aplicaciones del polen y su aprovechamiento biotecnológico.

Existe también una posibilidad biotecnológica de alteración del desarrollo natural del polen que consiste en desviar sus precursores (las microsporas) hacia un desarrollo embriogénico o hacia la formación de callos, haploides en ambos casos. Estas técnicas se conocen en general como *androgénesis* y tienen una gran utilidad en el campo de la mejora para obtener líneas puras. Por su relevancia las veremos por separado en el próximo tema.

17.1. Androesterilidad

El concepto *androesterilidad* (*male-sterility* en inglés, abreviado como *ms*) quiere decir esterilidad del polen. Es decir, la incapacidad de una planta para producir y/o diseminar granos de polen funcionales. Esta incapacidad puede venir originada porque el grano de polen maduro no se forma debido a problemas en alguna de las secuencias del proceso de desarrollo del polen, desde la diferenciación de las anteras hasta su dehiscencia, o porque sí se forma y es viable y funcional, pero existen problemas en el desarrollo de la antera que impiden su diseminación. De todos modos, la causa más frecuente de androesterilidad suele ser la aparición de fallos durante la meiosis. Con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, ha sido posible generar líneas androestériles por manipulación genética de algunas de las rutas que regulan el desarrollo del polen o la antera. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos la androesterilidad tiene su origen en mutaciones, de distinta naturaleza, en genes implicados en el desarrollo del gametófito, de sus precursores o de la antera. Por ejemplo, en el caso de problemas en el desarrollo de la antera, podemos mencionar los

fallos en la apertura (dehiscencia) de la antera, como es el caso de la androesterilidad funcional que veremos en el apartado 17.1.3. Otro caso interesante es el de la androesterilidad de tipo Ogura, típica de rábano y también introducida en colza, y provocada por problemas en el desarrollo del tapetum (Figura 17.1). En el caso de ciertas líneas androestériles de colza, en la etapa de las tétradas comienzan a aparecer problemas de desarrollo en el tapete que las rodea, que se manifiestan en una ausencia de mitocondrias junto con otras alteraciones ultraestructurales que desembocan en la muerte de las células tapetales (Figura 17.1) antes de que las microsporas estén preparadas para desarrollarse de forma autónoma. Esto, a su vez, impide que las microsporas terminen de desarrollarse como polen.

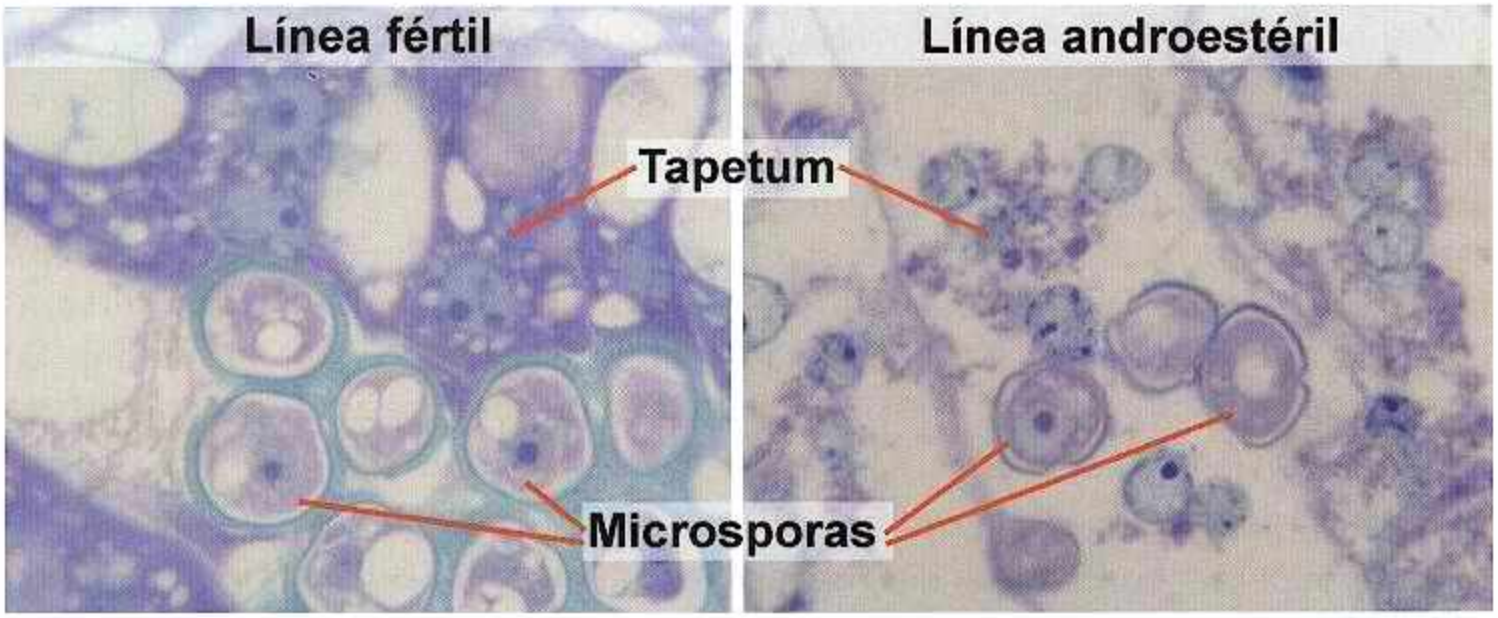


Figura 17.1: Comparación entre una línea fértil de colza (*Brassica napus*) frente a otra androestéril de tipo Ogura, caracterizada por problemas severos en el desarrollo de las células del tapetum. Imágenes amablemente cedidas por los autores: Pablo González-Melendi, Françoise Budar y Mercedes Lucas.

Todo este tipo de mutaciones, que de otra manera se perderían, son mantenidas de forma artificial por los mejoradores, pues las líneas androestériles tienen una gran utilidad en el campo de la mejora genética vegetal. La importancia de los androestériles en mejora se basa en lo siguiente: para los sistemas de producción de semillas híbridas, es fundamental desarrollar y mantener líneas puras. Estas líneas puras se cruzan entre ellas para generar híbridos utilizando una de ellas en concreto como parental masculino y la otra como parental femenino. Aquí es importante que el cruce sea en el sentido deseado. Es decir, que la que queremos que sea el parental femenino actúe como tal, siendo polinizada, y que la masculina actúe también como tal, polinizando. Por tanto, hay que asegurar que no haya polinizaciones cruzadas. Y para ello, si la línea utilizada como parental femenino es androestéril, nos aseguraremos de que no se autopoliniza, y de que no poliniza a la designada como parental masculino. En pocas palabras, un androestéril nos aseguraría la efectividad en los cruces entre las dos líneas puras, y en el sentido deseado.

Los individuos androestériles son también un excelente método de contención para evitar escapes de polen transgénico. Esto es de particular importancia para forrajeras transgénicas de polinización abierta, anemófila, ya suelen producir gran cantidad de polen fácilmente dispersable, y esto es un factor importante en la evaluación de riesgo de las gramíneas genéticamente modificadas.

Sin embargo, estas no son las principales ventajas. La principal ventaja de los androestériles se explota en los híbridos. Una vez obtenidos, hay que prevenir su autofecundación, si queremos cruzarlos de forma dirigida para continuar con nuestro programa de mejora genética. Para ello, la prevención de la autopolinización en los híbridos es la parte más costosa del proceso de producción de semilla híbrida. Tradicionalmente se lleva a cabo una emasculación (eliminación de las anteras) de forma manual. Esto puede resultar una tarea fácil en especies como el maíz donde hay flores masculinas y femeninas separadas. Solo hay que arrancar la flor apical masculina. Pero en aquellas especies con flores bisexuales, es muy costoso ir flor por flor eliminando los estambres y polinizando a mano, y procurando siempre no dañar el estilo contiguo. Esto último no es nada fácil. Como alternativa a esto, los androestériles evitan el laborioso proceso de emasculación manual, pues tenemos la seguridad de que no habrá autofecundación.

Existen varios tipos de androesterilidad, en función del control genético que opere en la manifestación del fenotipo en cuestión. Estos tipos son: la *androesterilidad génica*, la *androesterilidad ambiental* y funcional, la *androesterilidad citoplásmica*, y la *androesterilidad génico-citoplásmica*. Las veremos a continuación.

17.1.1. Androesterilidad génica

Generalmente, este tipo de androesterilidad suele deberse a la mutación de algún gen del genoma nuclear implicado en el desarrollo del polen. Como casi todas las mutaciones, suelen ser recesivas, y por tanto, serán estériles solo los individuos recesivos. Las mutaciones suelen ser espontáneas, aunque últimamente se han generados algunos por mutagénesis inducida o métodos biotecnológicos. Por ejemplo, la mutagénesis inducida se ha utilizado en petunia (por irradiación con rayos X), en sandía o tomate (por irradiación con rayos γ), y en pimiento, guisante o algodón (por tratamiento con mutágenos químicos). En cuanto a los métodos biotecnológicos, se puede conseguir un androestéril en nuestra variedad de interés a través de la formación de *cíbridos* (híbridos citoplásmicos somáticos), mediante fusión de un protoplasto de nuestra variedad con otro de una variedad androestéril. Además, podemos utilizar la ingeniería genética para introducir alelos de androesterilidad en nuestra variedad. Este ha sido el caso en especies como tabaco, patata, maíz, colza, petunia, o arabidopsis. La generación de líneas con androesterilidad génica no se restringe a las especies arriba mencionadas. De hecho, mediante estas y otras técnicas más minoritarias se han generado líneas de este tipo en casi todos los cultivos importantes.

Una vez generada la línea androestéril, hay que mantenerla mediante cruces, pues es obvio que la autofecundación no es una opción. El mantenimiento de una línea con androesterilidad génica (Figura 17.2) se lleva a cabo cruzando el androestéril, que obligatoriamente tendrá que actuar como parental femenino, con otro individuo con el alelo androestéril en heterozigosis, y por tanto fértil. Dicho cruce dará lugar a una descendencia con una segregación del alelo androestéril en homozigosis en la mitad de los individuos, por tanto androestériles, y en heterozigosis en la otra mitad, fértil por tanto. Se obtendrá pues una mezcla de semillas (denominada *mezcla conservadora*) en la que la mitad de las semillas nos interesan (son androestériles) y la otra mitad no. Pero no es posible separarlas, pues en su apariencia externa son idénticas. Por ello, para identificar y separar los androestériles habrá que germinarlas y dejarlas crecer hasta que manifiesten el fenotipo de interés.

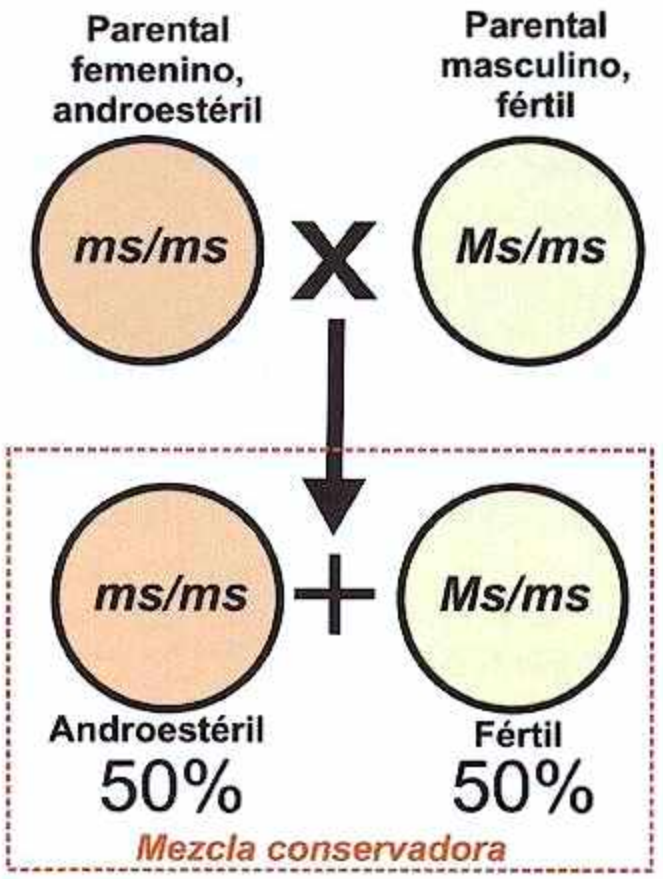


Figura 17.2: Mantenimiento de una línea con androesterilidad génica.
Imagen de Seguí Simarro.

Este precisamente es uno de los inconvenientes del uso de androestériles: su identificación. En un cruce como el que acabamos de ver entre un parental androestéril (*ms/ms*) y uno fértil pero heterozigoto (*Ms/ms*), se producirá segregación del carácter en la progenie, y necesitaremos seleccionar aquellos que sean androestériles. Dado que este carácter se manifiesta con la floración de la planta, en principio deberíamos esperar a que la planta florezca, lo cual ralentiza y encarece el uso de estas líneas. Sin embargo, si somos capaces de identificar algún carácter morfológico, visible desde el momento de la germinación de la planta, que vaya ligado al alelo de androesterilidad, podremos solucionar este problema, pues podremos fenotipar un individuo como androestéril

tan pronto veamos el fenotipo del gen ligado al de la androesterilidad. Es decir, detectando el marcador asociado (preferiblemente en estadios tempranos de desarrollo) se pueden identificar los androestériles. A estos caracteres morfológicos, genotípicos o fenotípicos, ligados a un gen, en este caso de androesterilidad, se les denomina *marcadores morfológicos*.

La determinación del grado de ligamiento de un carácter con otro, y por tanto su utilidad como marcador se determina elaborando mapas genéticos. Gracias a ellos se ha podido identificar asociado al gen de androesterilidad, en girasol un gen recesivo *t* que determina una pigmentación rojo-violácea en la plántula, en col el gen recesivo *e* de ausencia de antocianina en el hipocotilo, en haba un gen que provoca deficiencia clorofílica, o en tomate los genes *aa* (ausencia de antocianinas) y *wo* (elevada presencia de tricomas) ligados al gen de androesterilidad (Figura 17.3). En maíz dulce, el carácter color blanco o amarillo del endospermo (gen y) también va ligado al gen ms de androesterilidad, formándose semillas blancas y estériles (*y-ms*) y otras amarillas y fértiles (*Y-Ms*). Gracias a este carácter, se pueden separar las semillas blancas y androestériles (*y-ms/y-ms)* de las amarillas fértiles (*Y-Ms/y-ms*), de forma automatizada mediante un dispositivo electrónico de detección colorimétrica.

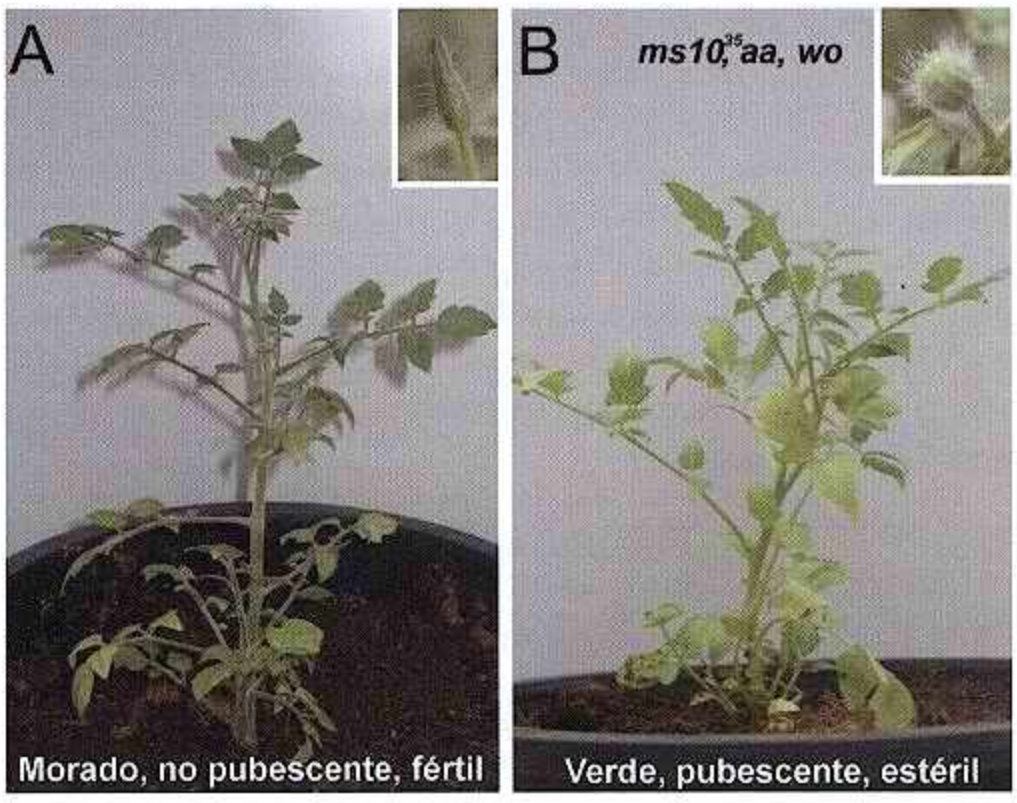


Figura 17.3: Androesterilidad en tomate (*Solanum lycopersicum*). Comparación entre el fenotipo fértil (A), morado y no pubescente (no recesivo para *ms10*^{35}, *wo y aa*), y el fenotipo estéril, verde y pubescente, recesivo para los tres genes ligados.
Imagen de Seguí Simarro.

17.1.2. Androesterilidad ambiental

La androesterilidad ambiental, también conocida como pseudoandroesterilidad, consiste en la manifestación de un fenotipo androestéril en función de determinadas condiciones ambientales. Puede por tanto ser provocada por cualquier factor ambiental que impida el normal desarrollo del polen. Entre

estos factores figura la temperatura ambiental extrema, demasiado elevada (por ejemplo, el algodón a 38°C) o demasiado baja (en arroz y sorgo), el estrés hídrico durante la meiosis, la deficiencia de nutrientes como el boro o el cobre o la presencia de agentes químicos (*gametocidas*) como los carboxilatos de fenilcinolina, las fenil piridazonas, los análogos de la prolina o el ácido giberélico.

Este tipo de androesterilidad tiene la ventaja de que es fácilmente inducible, una vez conocemos qué factor la desencadena. Sin embargo, tiene el gran inconveniente de que no se conoce bien su modo de acción a nivel molecular, y las posibles consecuencias que pudiera tener la aplicación de alguno de estos agentes gametocidas. Y esto precisamente es lo que hace que la androesterilidad ambiental no tenga una gran aplicación comercial. Sin embargo, sí se conocen factores concretos que generan fenotipos fértiles en genotipos androestériles de determinadas especies. Por ejemplo, ciertos genotipos androestériles de espárrago, espinaca, ricino, pepino, girasol, tomate o pimiento producen polen viable en ambientes fríos. Ciertos genotipos androestériles de cebolla producen polen fértil a altas temperaturas. En algodón, hay genotipos androestériles en campo pero parcialmente fértiles en invernadero. En col, hay genotipos androestériles en verano y fértiles en invierno. Y en arroz y tomate existen androestériles para fotoperíodos de día largo, y a la vez fértiles bajo fotoperiodos de día corto.

Para la producción de semilla híbrida de líneas con androesterilidad ambiental, se parte de una línea fértil, que se utilizará como parental masculino, y de una línea con androesterilidad ambiental. Esta última será el parental femenino y antes de su utilización se conservará y multiplicará en el ambiente adecuado para que se manifieste fértil. Para el cruce, se siembran ambos parentales en ambiente "de androesterilidad", lo cual la desencadenará solo en el femenino, pues el masculino debe ser forzosamente fértil en dicho ambiente. En el momento de la antesis, se cruzan.

De todos modos, en la práctica este tipo de androesterilidad no se usa mucho, pues requiere conocer muy bien las condiciones ambientales que generan la androesterilidad, y esto no es posible en muchos casos.

17.1.3. Androesterilidad funcional

En las líneas androestériles funcionales, no existe ningún problema en el desarrollo, formación y funcionalidad del polen. El polen es perfectamente viable, pero la antera es indehiscente, por lo que en definitiva, el polen no puede ser diseminado. Se conocen casos de este tipo de androesterilidad en tomate, berenjena, cebada, arroz, maíz, trébol, uva, *Brassica,* judía o sorgo. Por ejemplo, en sorgo se puede controlar la androesterilidad funcional regulando la humedad: a altas humedades relativas, se retrasa la dehiscencia de la antera.

Para la producción de semilla híbrida utilizando líneas androestériles funcionales, el parental femenino se conserva y multiplica forzando la salida del polen mediante el cultivo de la planta en condiciones ambientales propicias, o bien

manipulando (abriendo) mecánicamente la antera. La semilla híbrida se obtiene sembrando ambos parentales en condiciones normales, sin forzar nada, para que el femenino sea incapaz de diseminar su polen.

17.1.4. Androesterilidad citoplásmica

La androesterilidad citoplásmica viene determinada por la presencia de factores (genes) extranucleares. Por no estar codificada en los genes nucleares, a este tipo de androesterilidad se le ha denominado tradicionalmente como "citoplásmica". Sin embargo, esto no deja de tener un cierto punto de incorrección, pues es bien conocido que no existen genes en el citoplasma de las células. En realidad, los genes extranucleares se encuentran englobados dentro del genoma de las mitocondrias (*condrioma*) o de los cloroplastos (*plastoma*). En el caso de los genes de androesterilidad, se sabe que éstos no están en el plastoma. De hecho, los genes (factores) de androesterilidad citoplásmica están en el genoma mitocondrial. Y esto tiene una implicación fundamental en cuanto a la transmisión de estos caracteres a la descendencia. Como el citoplasma (y todos sus orgánulos) se hereda exclusivamente del parental femenino, la androesterilidad citoplásmica siempre se heredará por línea materna.

El mantenimiento de las líneas con este tipo de androesterilidad es por vía materna: se utiliza el androestéril citoplásmico como parental femenino, y así nos aseguramos que el zigoto heredará su citoplasma. Este tipo de androesterilidad es un carácter estable, pero tiene el gran inconveniente de ser muy poco frecuente, y es esto lo que hace que este tipo de esterilidad tenga muy poca utilidad en la práctica. El origen de la androesterilidad citoplásmica se cree que podría estar en la mutación o en la pérdida, a lo largo de las generaciones, de los genes nucleares restauradores de la fertilidad típicos de la androesterilidad génico-citoplásmica, que veremos a continuación.

17.1.5. Androesterilidad génico-citoplásmica

Este tipo de androesterilidad viene determinada por la combinación de factores codificados por genes ´"citoplásmicos" (mitocondriales) y de factores codificados por genes nucleares. Ha de darse una determinada combinación de todos estos factores para que se manifieste el fenotipo androestéril. Del mismo modo que en la androesterilidad exclusivamente citoplásmica, como el citoplasma del zigoto se hereda solamente de la madre, el factor citoplásmico (mitocondrial) de la androesterilidad génico-citoplásmica siempre se heredará por la línea materna. Pero no necesariamente ha de ser así en el caso de los factores nucleares, que se pueden heredar de ambos progenitores. A estos factores, que pueden ser uno varios, se les denomina *restauradores de fertilidad* (o *restorers of fertility*, Rf, en inglés). En el núcleo, los alelos de los genes que codifican estos factores pueden ser los dos dominantes, los dos recesivos, o uno de cada.

Por su parte, el citoplasma puede también ser estéril (S) o fértil (F) en función de que sus mitocondrias contengan o no el factor mitocondrial de androesterilidad.

Teniendo en cuenta todas estas posibilidades, se podrán dar cuatro combinaciones distintas. De ellas, solo una desencadenará la androesterilidad. Será aquella en la que coincida un citoplasma estéril (S) con la presencia de genes Rf recesivos y en homozigosis (rf rf) en el núcleo. Es decir,

Si los alelos del núcleo son Rf/Rf, y el citoplasma es S → Fenotipo fértil

Si los alelos del núcleo son Rf/rf, y el citoplasma es S → Fenotipo fértil

Si los alelos del núcleo son rf/rf, y el citoplasma es F → Fenotipo fértil

Si los alelos del núcleo son rf/rf, y el citoplasma es S → Fenotipo estéril

El mantenimiento de una línea androestéril génico-citoplásmica (Figura 17.4) se basa en la utilización del androestéril como parental femenino, para asegurarnos de que los factores citoplásmicos de esterilidad se transmitirán correctamente. En paralelo, se deberá mantener otra línea independiente, con los genes nucleares restauradores de la fertilidad en homozigosis recesiva, pero con el citoplasma fértil. Esta línea de fenotipo fértil será utlizada como parental masculino. Del cruce de ambas obtendremos una descendencia homogénea y androestéril, con el mismo genotipo que el parental femenino.

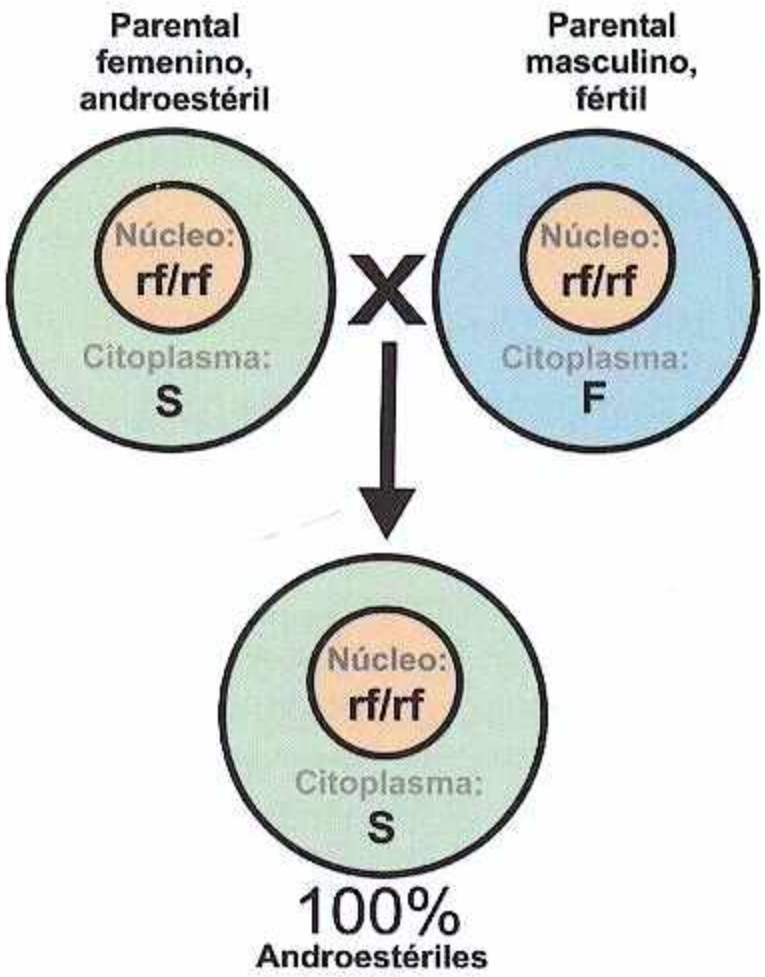


Figura 17.4: Mantenimiento de una línea con androesterilidad genico-citoplásmica.
Imagen de Seguí Simarro.

Para la obtención de semilla híbrida utilizando líneas con androesterilidad genico-citoplásmica (Figura 17.5), se utiliza un esquema inicialmente igual al descrito para mantener las líneas con este tipo de androesterilidad. Con ello, se obtendrá un individuo androestéril que de nuevo utilizaremos como parental femenino a la hora de realizar el cruce final. El otro parental para este cruce debe tener una constitución genética tal que se obtenga una descendencia híbrida, homogenea y fértil. Por tanto, utilizaremos como parental masculino una línea restauradora (línea R), que habrá que mantener y multiplicar por separado, y en cuyo núcleo estarán los genes restauradores de la fertilidad en homozigosis dominante. Respecto al citoplasma de la línea R, resulta irrelevante que sea fértil o estéril, pues no se transmitirá al híbrido. De este modo, cualquier gameto masculino que produzca llevará un alelo Rf, y todos los híbridos F1 que se formen serán necesariamente fértiles (Rf/rf), aunque el citoplasma que hereden del parental femenino contenga factores de esterilidad.

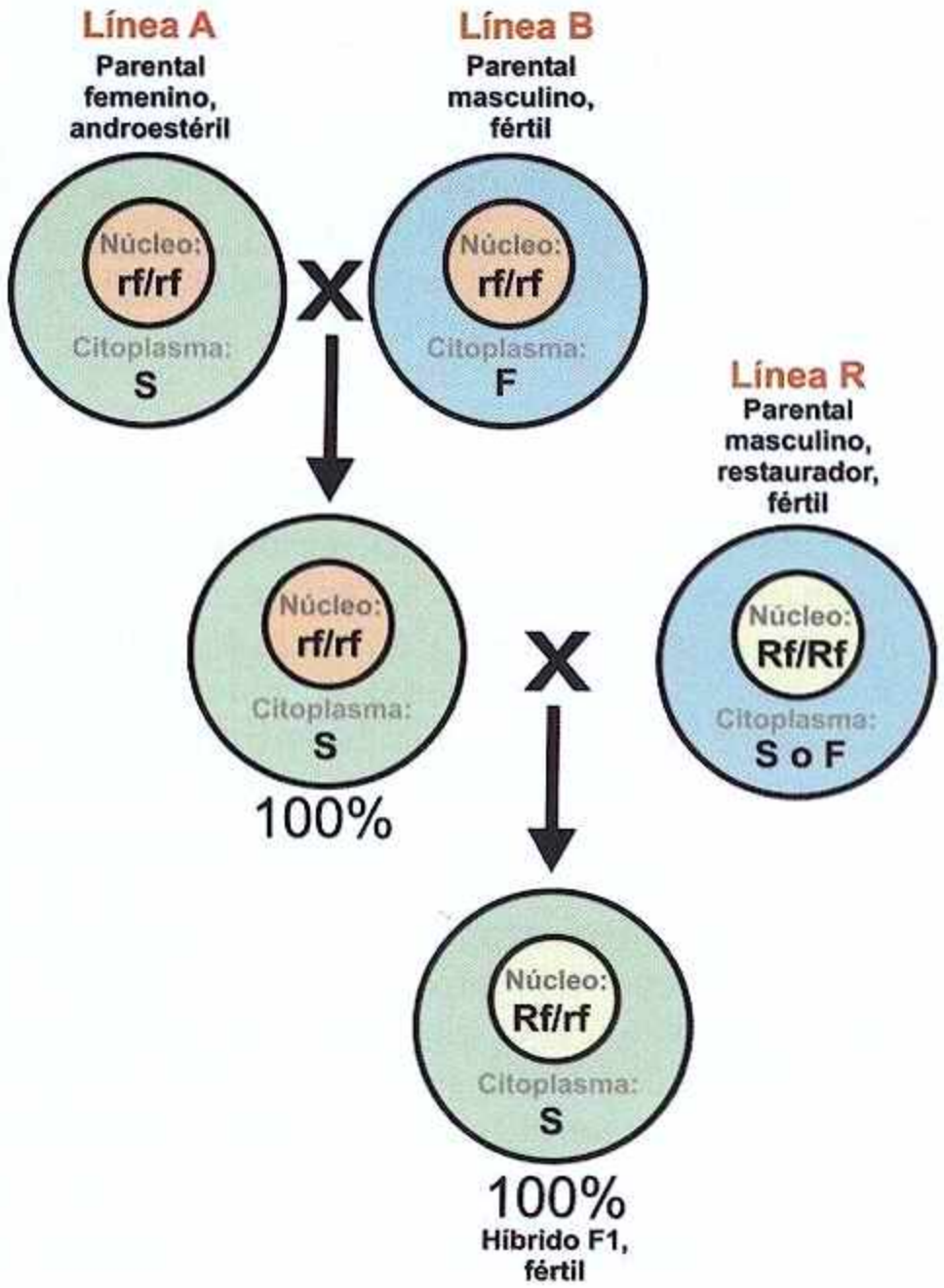


Figura 17.5: Producción de semilla híbrida a partir de una línea con androesterilidad genico-citoplásmica.
Imagen de Seguí Simarro.

Este tipo de androesterilidad es más inestable pero mucho más frecuente que la de naturaleza exclusivamente citoplásmica. De hecho, se conocen casos en más de 150 especies. Entre ellas, la colza, tal como vimos en la Figura 17.1. Además, cuenta con la ventaja de que al venir codificada en el citoplasma, la progenie no presentará segregación del carácter, pues toda la descendencia heredará este carácter exclusivamente del parental femenino.

Pero también tiene algunos inconvenientes. Se sabe que los androestériles génico-citoplásmicos son más sensibles a ciertas enfermedades, y son también inestables, tanto ellos como las líneas restauradoras, en determinadas condiciones ambientales. Además, pueden presentar clorosis en las hojas en ciertas etapas de desarrollo y producción insuficiente de néctar, lo cual puede afectar seriamente a la polinización. También cabe mencionar que no en todos los cultivos se dispone de líneas restauradoras adecuadas, aunque estas no serán estrictamente necesarias en cultivos donde el producto comercial no sea el fruto o la semilla.

17.2. Transporte de polen y flujo génico

Además de su importancia ecológica y su papel central en la reproducción, la polinización tiene también gran trascendencia en cuanto a la variabilidad genética de la especie. Recordemos (ver Tema 2) que la gran ventaja evolutiva de la reproducción sexual es el intercambio de variantes alélicas entre distintos individuos de una población. Y para dicho intercambio, el único mecanismo posible es el transporte de polen de un individuo a estigmas de otro individuo. Es decir, la polinización.

En este sentido, se utiliza un parámetro denominado *flujo génico* para estudiar el movimiento físico de alelos en el espacio. Los estudios de flujo génico son importantes desde distintos puntos de vista, tanto ecológico, como de genética de poblaciones. Desde un punto de vista aplicado a la mejora vegetal sirven para informar sobre polinizaciones cruzadas en plantaciones de híbridos con polen no deseado, o sobre hipotéticos escapes de transgenes de cultivos transgénicos. El flujo génico suele medirse como la distancia que recorre el polen desde su fuente de origen hasta el estigma receptor. Es decir, suele equipararse al flujo polínico. Dicho flujo polínico depende tanto del tipo de vector de polinización como de la densidad de plantas en un determinado entorno. En plantas anemófilas el polen puede llegar a recorrer enormes distancias, hasta miles de kilómetros. En especies zoófilas, esta distancia máxima dependerá mucho de los movimientos del polinizador, que a su vez dependen de la cantidad de recompensa presente. Pero en general, este movimiento suele estar mucho más restringido.

Existen distintas técnicas para medir el flujo polínico. Por ejemplo, el uso de tinciones vitales para polen, como el rojo neutro, el naranja G, el azul de Evans, o el azul de Bismarck. Funcionan añadiéndolas a la antera dehiscente, de modo que tiñan su polen, y luego viendo qué plantas de los alrededores presentan

estigmas con polen teñido. Otro tipo de tinciones útiles son las fluorescentes. Funcionan de modo semejante al anterior: se espolvorea la tinción sobre las anteras, y posteriormente se observan bajo luz ultravioleta los estigmas de las plantas circundantes. Otra técnica útil es el marcado del polen con átomos radiactivos, como el carbono 14 en forma de $^{14}CO_2$.

Sin embargo, el más útil de todos con diferencia es el empleo de marcadores genéticos. Sean de tipo morfológico, fisiológico o molecular, los marcadores genéticos son una serie de rasgos claramente identificables, asociados a la presencia de un determinado alelo. De esta manera se puede identificar la presencia de dicho alelo sin necesidad de visualizar su fenotipo, gracias a la presencia del marcador asociado, que siempre debería ser más fácil de identificar que el propio alelo de interés.

17.3. Aplicaciones de la palinología

En el tema 7, en su apartado 7.6 vimos que la palinología es la disciplina que estudia la morfología externa del polen. La compleja y elaborada ornamentación de la que hace gala la cubierta del polen de un gran número de especies hace de la morfología externa del polen un carácter ideal para clasificar los distintos órdenes, familias, géneros y especies de plantas. Es decir, es un carácter taxonómico de gran valor a la hora de clasificar especies. Un ejemplo hipotético de estudio palinológico con fines taxonómicos contemplaría el estudio cuantitativo de los siguientes parámetros:

- P. Eje polar en corte óptico meridiano.
- E. Eje ecuatorial en corte óptico meridiano.
- A. Apocolpia (medida del lado del triángulo polar) para polen de tipo tricolpado.
- Nl. Mesocolpia (distancia entre dos colpos consecutivos).
- Forma del polen, medida como la relación P/E
- Contorno (AMB) en corte óptico ecuatorial
- Número de unidades (granos de polen)
- Tipo de aperturas
- Longitud de las aperturas
- Ex. Grosor de la exina en corte óptico meridiano.
- Estructura de la exina
- Escultura de la exina
- Tipos de elementos ornamentales de la exina.
- Tipo de baculación
- Densidad de la baculación

La palinología tiene en la taxonomía una de sus aplicaciones, pero no es la única. De hecho, existen ámbitos muy dispares en los que el conocimiento de las características morfológicas de la cubierta del polen puede ayudar a resolver problemas a la sociedad. A continuación veremos algunos de ellos.

17.3.1. Paleontología

Por ejemplo, en el estudio paleontológico es donde la palinología demuestra todo su potencial y versatilidad. La cubierta del polen está diseñada para resistir inclemencias climatológicas de distinta naturaleza, y por ende al paso del tiempo. Así, aunque el interior del grano de polen se descomponga y desaparezca, la cubierta puede permanecer durante siglos, o incluso milenios en condiciones de microfosilización (Figura 17.6). De esta característica se aprovecha la *paleobotánica* a través de la *paleopalinología*, para trazar posibles líneas de desarrollo entre los distintos granos de polen de las secuencias fosilíferas, y con ello tratar de deducir la composición de las floras primitivas, o determinar condiciones ecológicas antiguas. Otra vertiente de la palinología intersecciona con la paleoecología, en la que se analiza el polen presente en los *coprolitos* (restos fosilizados de excrementos de los seres vivos) para determinar paleodietas, paleopatologías, densidades de manadas de herbívoros o la presión ganadera sobre el paisaje en períodos de influencia humana, entre otros estudios.

Figura 17.6: Microfósiles de polen de distintas especies de la era paleógena (hace entre 22.500.000 y 65.000.000 años).
Imagen de la Dra. Teresa Torres, publicada en *Antártica, un Mundo oculto bajo el hielo* (2003), editado por el Instituto Antártico Chileno, página 69, figura 32. Reproducida con autorización.

17.3.2. Exploraciones petrolíferas

Una de las aplicaciones prácticas más importantes de la palinología está en el campo de las exploraciones petrolíferas. Hasta el primer cuarto del siglo XX, las exploraciones en busca de petróleo se limitaban a recuperar crudo y gas

de depósitos poco profundos, identificados en base al estudio de los estratos rocosos. Sin embargo, estas estrategias de búsqueda de pozos pronto resultaron insuficientes para identificar pozos más profundos. Así, se diseñaron otras estrategias consistentes en analizar pólenes fósiles presentes en muestras de roca recogidas a distintas profundidades. En función de los perfiles polínicos se establecieron métodos fiables y por tanto útiles para predecir bolsas de crudo o gas. De este modo, en la actualidad prácticamente todas las compañías de prospección petrolífera cuentan con laboratorios palinológicos para asistir en los trabajos de exploración.

17.3.3. Melisopalinología

Una segunda aplicación práctica de la palinología tiene que ver con la apicultura, y más en concreto con la producción de miel, puesto que uno de los principales componentes de la miel son los pólenes. En la producción de miel de origen artesanal, es necesario conocer el origen de ésta. Y a nivel industrial, la consecución de estándares de calidad necesita también de la certificación inequívoca del origen. Para ello, nada mejor que analizar el polen contenido en dicha miel. La *melisopalinología* es la disciplina encargada de desarrollar el control de calidad de las mieles, tanto en el sentido de que sean realmente miel, como de que provengan de determinados tipos de flores (miel de romero, de brezo, de naranjo, etc.), o de que provengan de las regiones que se

Figura 17.7: Distintos tipos de mieles, de distintas regiones
Imágenes (de izquierda a derecha y de arriba abajo) de Medjaï, B. Navez, Penarc, Necocrief y Silanoc, todas en Wikimedia Commons, bajo licencia Creative Commons Attribution Share Alike 3.0 Unported excepto la primera, de dominio público.

les supone (Figura 17.7). Este último aspecto es especialmente importante en aquellas regiones geográficas que conllevan denominación de origen (DO) regulada y protegida. Se pueden utilizar tres tipos de análisis que pueden considerarse complementarios: el porcentaje frente al total de cada uno de los pólenes de especies distintas presentes en la miel, observados mediante microscopía óptica, el análisis colorimétrico y el estudio biométrico de las cargas de polen.

17.3.4. Criminología y medicina forense

Otra aplicación de la palinología, aunque no tan frecuente como las anteriores, se refiere al uso del polen como "prueba" en estudios criminológicos o de medicina forense. En algún capítulo de la exitosa serie televisiva de investigación criminológica "C.S.I." se ha utilizado el polen presente en los enseres del sospechoso para situarlo o excluirlo de la escena del crimen, en base a ser o no polen característico de especies que habitan en dicha escena del crimen. Este hecho no deja de ser anecdótico, pero en trabajos verídicos, publicados por medios especializados, si se han descrito casos como este. G. Erdtman en 1969 (ver sección 17.7, Información adicional) documentaba en su libro un caso en que el análisis palinológico del barro adherido al zapato de un presunto asesino demostraba que había estado en el escenario del crimen.

Un hombre desapareció cerca de Viena durante un viaje por el río Danubio, pero su cuerpo nunca fue encontrado. El principal sospechoso de la desaparición, un hombre al que se le atribuyo un móvil para matar al desaparecido, fue detenido y acusado de asesinato. Sin embargo, en el juicio celebrado en 1959, al no haber confesión ni cadáver la acusación no podía probar tal asesinato. A alguien se le ocurrió analizar el barro presente en las suelas de los zapatos del acusado. Tras estudiar la composición polínica del barro, se determinó que en él había una mezcla de polen de abeto, sauce y aliso, junto con restos fósiles de polen de nogal procedentes de depósitos del Mioceno expuestos a la superficie. Esta combinación solo podía provenir de una pequeña zona del valle del Danubio, a unos 20 km al norte de Viena. Cuando se le comunicaron estas conclusiones al acusado, este se derrumbó, confesó el crimen y mostró a las autoridades el lugar exacto donde fue enterrada la víctima. Lógicamente, el lugar coincidía exactamente con la zona que el análisis del polen había predicho.

Otro ejemplo documentado, esta vez en medicina forense, podría ser el estudio del polen presente en una fosa común para saber en qué estación del año se produjeron los enterramientos. Como estos ejemplos podría haber o quizás haya muchos más, tantos como imaginación (y conocimientos palinológicos) tengan el forense o criminólogo de turno, para poder relacionar los restos de polen presentes en los materiales objeto de su investigación con el aspecto de ésta que quiera esclarecer. Pero en cualquier caso, estos últimos junto con los anteriores ejemplos nos hacen ver el gran potencial que tiene la escultura de la cubierta externa del polen como carácter marcador, clara e inequívocamente definitorio del taxón al que pertenece la planta que lo ha creado. A pesar de esta exactitud con la que el polen puede ayudar en el contexto de los estudios

criminológicos, todavía no es un parámetro ampliamente usado por los investigadores policiales. Las causas principales son que todavía no existen suficientes datos del polen de las diferentes regiones, y sobre todo que hay una gran carencia de expertos en la correcta identificación de polen.

17.3.5. Alergias y aeropalinología

Otra aplicación de la palinología se ubica en el mundo de la medicina, pues un gran número de las alergias que padece la población se deben al polen, y sobre todo al de las gramíneas. De hecho, y a modo de anécdota, cabe mencionar que desde antiguo se conoce la fiebre del heno como la reacción alérgica frente al polen de ciertos cereales, pues estas fiebres solían aparecen siempre durante la época de la siega. Esta denominación histórica, que se ha venido arrastrando hasta nuestros días, no está exenta de una cierta paradoja, al menos en apariencia, pues la siega de los cereales para su recolección no coincide con su floración, que debe haberse producido antes para que con la siega se puedan recoger los frutos con semilla, tras la polinización y posterior fecundación y fructificación. En realidad, la paradoja no es tal, pues la mayoría de cereales son especies autógamas, y más concretamente cleistógamas, en cuyas flores hermafroditas se utiliza el polen de esa misma flor para fecundar la célula huevo, sin necesidad de que ni tan siquiera se abra la flor. Por tanto, es el exceso de polen que no ha fecundado, y que ha quedado atrapado dentro de la espiga, el que genera la reacción alérgica al esparcirse cuando las espigas son abiertas mecánicamente mediante los procesos de siega, trilla y aventado.

Actualmente la medicina, la palinología y la industria farmacéutica intentan combatir las alergias de etiología polínica estudiando la composición orgánica del polen, para detectar los posibles agentes involucrados en la respuesta anafiláctica y en qué circunstancias estos actúan, y tratar de generar vacunas a base de extractos de polen, o medicamentos que puedan mitigar los síntomas, a veces muy molestos, o disminuir la sensibilidad al alérgeno de los individuos afectados. Una segunda línea de actuación, esta a nivel epidemiológico, es la *aeropalinología*, que consiste en la elaboración de calendarios de previsión de alergias, confeccionados a partir de los recuentos periódicos del polen (tipo y cantidad) que circulan por el aire. Así se puede predecir cuando va a presentarse un volumen suficiente de polen alergógeno (potencialmente causante de reacciones alérgicas) en el aire y de qué tipo va a ser, a fin de informar y prevenir a los afectados. Estos calendarios suelen marcar como épocas críticas, los meses primaverales, en los que muchas de las especies que nos rodean entran en floración.

17.4. Biotecnología de los determinantes alergénicos del polen

Un aspecto de la biología del polen en el que la biotecnología puede ayudar a resolver problemas es el de las alergias derivadas de los alérgenos presentes en la cubierta del polen. Como hemos visto en el apartado anterior, un mejor

conocimiento de las características biológicas del polen puede ayudar a tratar mejor sus efectos o a prevenir alergias. En paralelo, se puede intervenir en el polen directamente para tratar de eliminar o reducir los componentes alérgenos de su cubierta, como veremos a continuación.

Dos alergias muy frecuentes en la población son la fiebre del heno y el asma alérgico estacional. Ambas son provocadas por la exposición de los individuos sensibles al polen de ciertos tipos de gramíneas, y pueden llega a afectar hasta al 25% de la población en climas templados o fríos. Uno de los principales alérgenos para más de la mitad de los alérgicos es el polen de *Lolium multiflorum* (Figura 17.8), debido a la masiva cantidad de polen que produce. Este polen contiene al menos cuatro tipos principales de alérgenos de naturaleza proteica, que presentan a su vez múltiples isoformas indistinguibles inmunológicamente. Se han conseguido aislar y caracterizar al menos una proteína de cada una de estas clases. También se consiguió aislar clones de cDNA de los alérgenos *Lolp1*, *Lolp2* y *Lolp5*. Hace ya más de una década que se obtuvieron las primeras transgénicas tanto en *L. longiflorum* como en otras especies relacionadas (*L. perenne* y *L. rigidum*). Estas plantas incorporaban transgenes antisentido bajo el control de un promotor específico de polen, de manera que durante el desarrollo del polen de estas especies, al tiempo que se producía el transcrito (ARN

Figura 17.8: *Lolium multiflorum*.
Imagen de Daderot de dominio público, en Wikimedia Commons

mensajero) para la síntesis de estos alérgenos, se sintetizaba también un transcrito de secuencia complementaria, que interfería con el primero, de manera que imposibilitara la traducción de muchos de ellos a proteína.

En definitiva, se consiguió producir plantas transgénicas con menos cantidad de alérgenos en el polen (plantas hipoalergénicas), y por tanto, menos peligrosas para los alérgicos. Otra ventaja de estas plantas es que pueden servir como modelo para estudiar la función en la planta de estas proteínas alérgénicas y desarrollar otras estrategias terapéuticas para combatir este tipo de alergias.

17.5. El polen como producto comercial

El polen se utiliza como tal en la producción de muy diversos productos comerciales, de entre los que destacan los suplementos alimenticios y las medicinas. Para todas ellas, el primer paso es la recogida del polen. Este es precisamente el factor limitante de toda esta industria, por la dificultad que conlleva recoger grandes cantidades de polen. El polen se obtiene generalmente mediante el uso de *trampas de polen*, que se colocan a la entrada de las colmenas. Para entrar a la colmena, las abejas han de atravesar las trampas, con lo que algunas de las bolas de polen que acarrean en sus patas (Figura 17.9) se desprenden y caen en una bandeja de recogida.

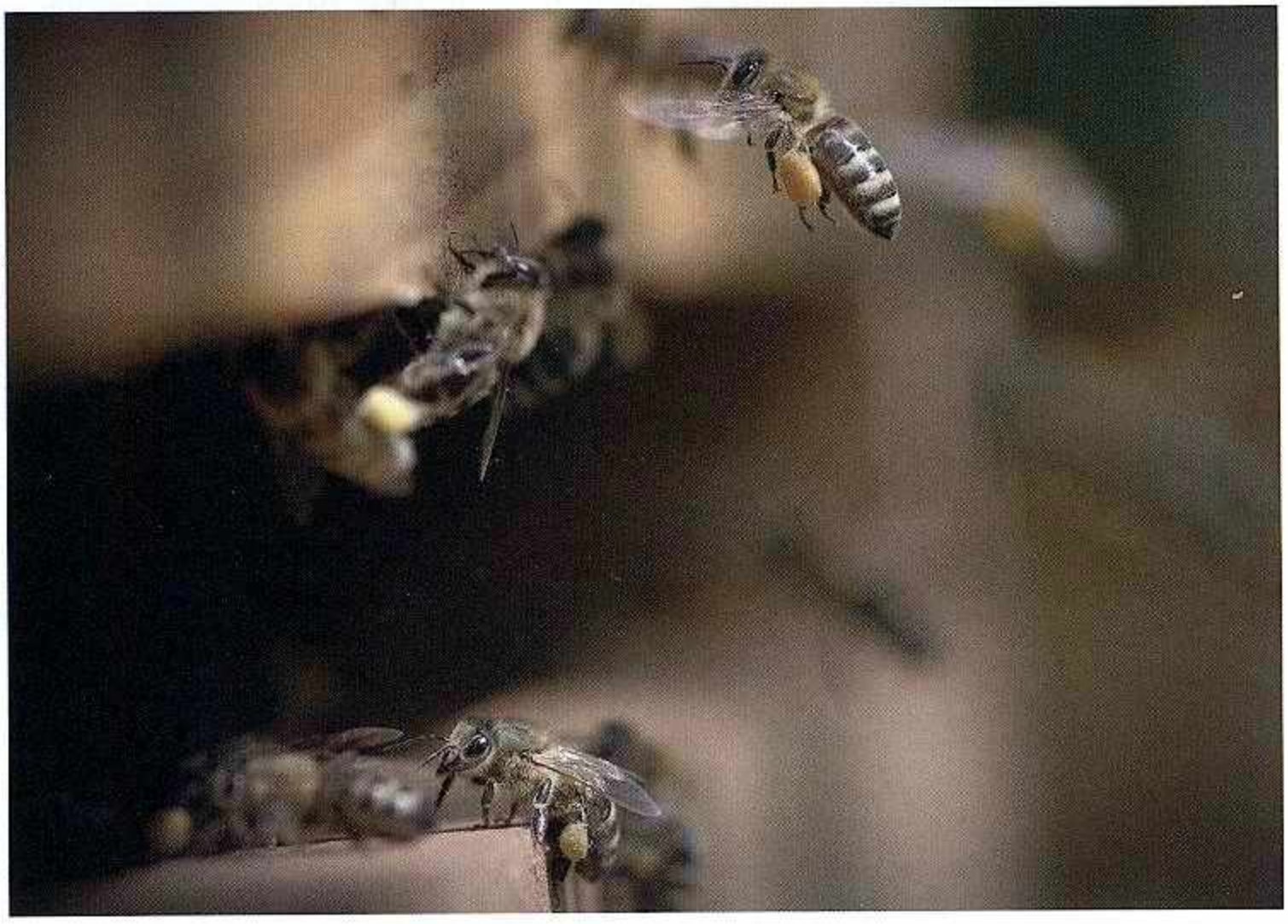


Figura 17.9: Abejas transportando polen a la colmena.
Imagen de Igor Bajic, en Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org), bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 unported (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0).

Para una buena cosecha de polen, las trampas no deben interferir demasiado en el comportamiento habitual de las abejas. Es decir, deberían permitir que las abejas lleven a la colmena un mínimo de polen. Si se reduce mucho la cantidad de polen disponible en la colmena, se puede dar lugar a una reducción en el número de crías que llegan al estado adulto, y a una disminución de la producción de miel de la colmena. Se considera que hasta un 60% del polen que las abejas melíferas transportan a la colmena puede ser recogido sin afectar el normal funcionamiento de la misma. Una vez recogido, ha de limpiarse para eliminar impurezas tales como restos y partes de insectos. Una vez limpio, el polen ha de conservarse en condiciones de baja humedad hasta que sea utilizado para la preparación de sus distintas formas comerciales. Veremos a continuación algunas de ellas.

17.5.1. El polen como suplemento dietético

El uso comercial más importante del polen está en la industria de los alimentos saludables. Desde hace mucho tiempo (miles de años) el polen se utiliza como suplemento alimenticio. De hecho, el análisis de algunos coprolitos (restos fecales fosilizados) recuperados en America y correspondientes a los siglos del 14 al 2 antes de Cristo, revelan que los indígenas de esas tierras ya consumían polen desde tiempos tan pretéritos. Los granos de polen son ricos en proteínas, minerales y vitaminas, especialmente de tipo B, y son bajos en grasas, sodio y vitaminas liposolubles (D, K y E). La composición nutricional del polen supera la de cualquier alimento utilizado comúnmente.

Los suplementos con polen están bastante extendidos entre los deportistas, pues se cree que aumentan la fuerza y el rendimiento. Lo que sí parece estar probado es que su consumo incrementa el contenido en hemoglobina y la velocidad media de los atletas. Además, los corredores que toman polen no sufren las caídas en los niveles de potasio que experimentan los que no lo consumen. Incluso se especula con que el polen podría aumentar la esperanza de vida.

En los animales de granja y de compañía también se han comprobado algunos efectos beneficiosos de la suplementación de su dieta con polen. Al parecer, el aporte de polen a la dieta es bastante común en la alimentación de los caballos de carreras. En experimentos en los que se añadió un 2.5% de polen a la dieta de pollos de granja se observó un aumento en la eficiencia de la conversión del alimento en peso corporal. También en cerdos se observó algo semejante. En gallinas ponedoras el polen, en este caso de maíz, contribuye a que las yemas de sus huevos tengan un tono amarillo más intenso y mayor contenido en carotenos.

17.5.2. Propiedades terapéuticas del polen

El polen crudo, en forma de preparaciones o mezclado con miel se utiliza como tónico para paliar estados de debilidad o inapetencia. Hay muchas otras teorías sobre los supuestos efectos beneficiosos del polen. Se ha publicado que el polen

es efectivo en ámbitos de lo más diversos, entre los que figuran el tratamiento de la prostatitis crónica, la protección frente a los efectos adversos de los rayos X, para combatir los síntomas de la fiebre del heno, como anticongestivo, para tratar úlceras gástricas o para prevenir el mal de altura.

Aunque muchos de los efectos beneficiosos han sido confirmados en ensayos clínicos y publicados en revistas científicas, la mayoría de las afirmaciones sobre propiedades terapéuticas del polen provienen exclusivamente de los folletos que elaboran los propios fabricantes de productos con polen, y que no están avalados científicamente. Por tanto conviene adoptar cierta cautela a la hora de utilizar la información en ellos contenida.

17.5.3. La industria de los suplementos de polen

A pesar de esta carencia de evidencia científica, la demanda de productos que contienen polen está en constante aumento. En las últimas décadas el uso del polen en forma de suplemento dietético saludable se ha incrementado en gran medida en la población de países desarrollados, y ha propiciado el crecimiento de una gran industria a su alrededor. En herbolarios, farmacias, parafarmacias, y tiendas de dietética podemos encontrar polen en forma de granulados (Figura 17.10), tabletas o preparados líquidos bebibles para suplementar la dieta de los seres humanos, y también de las mascotas domésticas y animales de granja y competición. Incluso los granulados se utilizan en recetas de cocina para la elaboración de salsas y pasteles (Figura 17.11). También se pueden encontrar infusiones suplementadas, como el té con polen (Figura 17.12). El polen también se incluye en productos cosméticos como cremas y máscarillas faciales para eliminar las arrugas. Incluso hay dentífricos que incorporan polen.

Los EE.UU., China, Suecia y Rusia son los principales productores de productos de polen. Aunque no hay actualmente disponibles datos cuantitativos, en 1989 se estimaba que en China la cosecha de polen anual estaba en torno a las 3.000-5.000 toneladas. Las ventas en 1984 de una empresa sueca especializada en la

Figura 17.10: Granulado de polen.
Imagen de Jimmy Chuang en Flickr.com, bajo licencia Creative Commons Attribution Non-Derived 2.0.

Figura 17.11: Pastelitos con polen.
Imagen de Fimb en Flickr.com, bajo licencia Creative Commons Attribution 2.0.

Figura 17.12: Bolsitas de té japonés con polen.
Imagen de Kunming Aolymbiotech, en Picasaweb.google.com,
bajo licencia Creative Commons Attribution Share Alike 3.0.

venta de productos derivados de polen desde 1952, ascendieron a 2,5 millones de dólares, obtenidos por la venta de 140 millones de tabletas elaboradas con más de 20 toneladas de polen durante ese año. Es de esperar que las cifras actuales sean mucho mayores.

17.6. Resumen

En este tema hemos hecho un recorrido por distintas utilidades de los gametófitos masculinos (polen) en muy distintos ámbitos. Hemos dedicado una sección a la androesterilidad o esterilidad masculina. Este fenómeno, producto de la mutación de ciertos genes implicados en el desarrollo de la microspora o el polen, tiene una gran relevancia desde el punto de vista práctico pues permite utilizar a la plantas androestériles como parentales exclusivamente femeninos en experimentos de hibridación en los que se desea que el sentido de la misma sea específicamente uno de los dos posibles. Existen distintos tipos de androesterilidad, cada uno con un control genético distinto que conviene conocer para su correcta utilización para los fines antes mencionados.

También hemos definido los conceptos de flujo polínico y flujo génico, y la utilidad de su determinación dentro de la mejora genética para informar sobre polinizaciones cruzadas o sobre escapes de transgenes. Hemos visto que la palinología tiene una gran utilidad práctica en ámbitos tan diversos como la paleontología, la apicultura, la alergología, la industria petroquímica o la criminología y la medicina forense. Por último, hemos hecho un recorrido por las propiedades alimenticias y terapéuticas del polen, así como por las distintas formas en que se comercializa para que la población se beneficie de dichas propiedades.

17.7. Información adicional

- Bhalla P.L., Swoboda I., Singh M.B. 1999. Antisense-mediated silencing of a gene encoding a major ryegrass pollen allergen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 96: 11676-11680.
- Bryant V.M. 1990. Pollen: Nature's fingerprints of plants. Encyclopedia Britannica. 93-111.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biology Publisher, USA.
- Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology. An Introduction to the Study pollen grains and spores. Munksgaard, Copenhagen.
- González-Melendi P, Uyttewaal M., Morcillo C.N., Hernández Mora J.R., Fajardo S., Budar F., Lucas M.M. 2008. A light and electron microscopy analysis of the events leading to male sterility in Ogu-INRA CMS of rapeseed (*Brassica napus*). Journal of Experimental Botany, 59(4): 827-838.
- Hanson M.R., Bentolila, S. 2004. Interactions of Mitochondrial and Nuclear Genes That Affect Male Gametophyte Development. The Plant Cell, 16: S154-169.
- Linskens H.F., Jorde W. 1997. Pollen as food and medicine - a review. Economical Botany, 51:78-87.
- Shivanna K.R. 2003. Pollen biology and biotecnology. Science Publishers, Inc. Enfield (USA).
- Torres T. 2003. Antártica, un mundo oculto bajo el hielo. Instituto Antártico Chileno.

TEMA 18. Biotecnología del polen (II): Conservación y calidad

El hecho de que el polen sea la parte "móvil" de las plantas, y que esté preparada para ser viable fuera de la planta que lo produjo, hace que sean múltiples sus aplicaciones biotecnológicas. En el tema anterior hemos visto aplicaciones biotecnológicas del polen en ámbitos muy diversos, pero con una característica en común a todos ellos: el polen o sus precursores son utilizados para aplicaciones que nada tienen que ver con su función biológica original, la generación, protección y transporte de los gametos masculinos. En este tema veremos una nueva aplicación del polen, pero esta vez sí relacionada con su función biológica. Nos referimos a la conservación del polen en *bancos de polen* como forma de germoplasma y sobre todo para poder ser utilizado para polinizar a voluntad, en lugares y momentos muy alejados de aquellos donde el polen fue creado, o para forzar la polinización sobre especies distintas a la suya. Todas estas técnicas, imprescindibles en el contexto de la mejora genética moderna, hacen de la conservación del polen en condiciones que preserven su viabilidad un importante objetivo de la biotecnología reproductiva vegetal. En este tema veremos cómo puede conservarse el polen en óptimas condiciones.

Íntimamente ligados a la conservación del polen están los conceptos de viabilidad y vigor del polen. La conservación no tendría ningún sentido si en el momento de ser utilizado, el polen no fuera capaz de germinar, emitir tubo polínico y fecundar el gameto femenino. Es por esta razón que antes de utilizar el polen conservado (y a menudo también el fresco, recién recogido), es muy conveniente analizar su viabilidad y su vigor. De esta manera nos aseguramos de que el polen que se vaya a utilizar será capaz de cumplir con su función biológica. En este tema veremos también las distintas técnicas que se pueden emplear para determinar empíricamente estos dos parámetros, viabilidad y vigor del polen.

18.1. Conservación del polen

Si se establecen las condiciones adecuadas para mantener su viabilidad, los granos de polen pueden ser almacenados durante largos períodos de tiempo, y ser utilizados cuando sea necesario. El almacenamiento de polen tiene importantes aplicaciones en áreas básicas y aplicadas de la biología reproductiva. Estas son algunas de ellas:

- Superar las barreras reproductivas impuestas por el aislamiento temporal y/o espacial de los individuos o especies donantes y receptoras del polen.
- Eliminar la necesidad de cultivar continuamente a los individuos donantes de polen (parentales masculinos) en programas de mejora.
- Posibilitar polinizaciones suplementarias para mantener el rendimiento.

- Preservar los recursos genéticos y facilitar el intercambio internacional de germoplasma.
- Garantizar la disponibilidad de polen durante todo el año (no solo en la época de floración y polinización) para estudios sobre diversos aspectos de la biología del polen y la alergia al polen.

El establecimiento de *bancos de polen* que aseguren la disponibilidad de polen de las especies deseadas en cualquier época del año y en cualquier lugar, es desde hace ya tiempo una necesidad de la comunidad científica que se dedica a la biología y la biotecnología del polen. Los bancos de polen facilitan en gran medida los programas de mejora, en particular de las especies arbóreas. Se han llevado a cabo estudios muy extensos para evaluar las mejores condiciones de almacenamiento para mantener e incluso ampliar la viabilidad del polen de un gran número de especies (ver sección 18.5, Información adicional). Los métodos más comúnmente utilizados se presentan a continuación.

18.1.1. Almacenamiento a baja temperatura y humedad

El mantenimiento del polen refrigerado (entre +4°C y -20°C) y con baja humedad relativa (menos del 10%) es el método más sencillo y menos costoso. De hecho, es el método más extendido y utilizado incluso por horticultores aficionados. Es muy conveniente y eficaz para el almacenamiento a corto plazo (entre semanas y meses según la especie). Consiste en envasar los granos de polen en pequeños frascos sin sellar, y mantenerlos en un desecador o un recipiente hermético adecuado junto con un agente desecante para mantener baja la humedad relativa. El más común y accesible es el gel de sílice (o silicagel). Una vez metido en frasco sin sellar con el polen y el gel de sílice, el desecador es sellado y guardado en cámaras frigoríficas (o congeladores en su defecto).

Excepcionalmente se puede llegar a temperaturas de mantenimiento muy por debajo de -20°C. Esta menor temperatura es aplicable solo al polen de ciertas especies resistentes, como *Linum regale*, que puede aguantar hasta tres años. Sin embargo, para muchas otras especies estas temperaturas serían letales. Lo habitual es mantenerlos entre 4 y -20°C. Por ejemplo, así es posible conservar a -20°C polen de *Citrus* de uno a tres años, de tomate durante cerca de tres años y de olivo durante un año. Algunas especies también resisten años a menores temperaturas. Por ejemplo, *Vitis vinifera* a -12°C, *Fragaria* entre 2 y -4°C, incluso *Cocos nucífera* a 5°C.

Existen también algunas especies que son especialmente sensibles a la baja humedad. Por ejemplo, los granos de polen de los cereales en general no pueden resistir la desecación, y necesitan ser almacenados en el refrigerador en condiciones de alta humedad relativa. Esto, lógicamente, hace que la viabilidad disminuya notablemente. De hecho, en estas condiciones, la viabilidad del polen de cereales es de tan sólo unos pocos días.

18.1.2. Conservación por congelación y secado

Esta alternativa consiste en congelar la muestra de polen hasta alcanzar temperaturas de -60°C a -80°C, y eliminar el agua congelada del polen por sublimación. Es decir, se hace pasar el hielo que se va formando en la muestra a vapor directamente, sin pasar por el estado líquido. La sublimación se consigue con un proceso que se denomina *secado al vacío*. En aparatos especiales el polen se va enfriando en vacío. La baja presión creada por el vacío es lo que hace que el hielo sublime.

Existen dos formas de llegar al mismo resultado final:

- Si se dispone de un liofilizador, el polen se puede congelar rápidamente y después dejarlo sublimar lentamente en condiciones de vacío. Para muestras de polen, por lo general poco voluminosas, suelen utilizarse liofilizadores pequeños, de sobremesa (Figura 18.1).
- También se puede someter al polen a vacío desde un primer momento para que vaya sublimando, mientras que en paralelo se va disminuyendo gradualmente la temperatura hasta alcanzar los -60°C a -80°C.

Figura 18.1: Liofilizador de sobremesa.
Imagen de dominio público, en http://en.wikipedia.org.

Una vez desecada la muestra, esta ha de almacenarse generalmente congelada, aunque hay especies que por sus especiales características permiten el almacenamiento a temperatura ambiente. Tanto la liofilización como la deshidratación al vacío son igualmente eficaces para el almacenamiento de granos de polen. Pero en ambos casos, para obtener buenos resultados el polen ha de presentar

un contenido de agua óptimo, y hay que determinar cuales son las mejores condiciones de secado (su duración principalmente) y rehidratación posterior.

La conservación por congelación y secado es un método eficaz que ha sido utilizado durante mucho tiempo para el almacenamiento a largo plazo de un gran número de especies. Por ejemplo, tras aplicar este método es posible conservar a temperatura ambiente polen de cebolla durante 23 meses, de *Amaryllis* durante 34 meses, de *Antirrhinum majus* durante 13 meses, y de *Citrus* durante 38 meses. A temperaturas menores (-21°C) se ha podido conservar polen de *Medicago sativa* durante 11 años, de *Prunus sp* durante 9 años, y de *Pyrus sp* durante 6 años. Sin embargo, los cereales tampoco dan buenos resultados con este método.

18.1.3. Criopreservación

Este método consiste en deshidratar los granos de polen hasta alcanzar un nivel umbral mínimo para mantener su viabilidad, y tras ello almacenarlos en nitrógeno líquido (-196°C). Este método, muy sencillo y poco costoso, es el más eficaz que se conoce en la actualidad para el almacenamiento a largo plazo (varios años) para un gran número de especies, como girasol, pistacho, papaya, pimiento, peral, lúpulo o melocotonero.

De entre todas las especies criopreservadas con éxito destacan los cereales, que por ser extremadamente sensibles a la desecación no se han podido conservar con ninguno de los métodos anteriores. Los primeros intentos de criopreservación de polen de cereales no tuvieron éxito en gran parte debido a esta susceptibilidad a la desecación (lo cual es crítico para el éxito con la criopreservación. Sin embargo, sí se consiguieron resultados positivos utilizando un aparato *secador de polen* en el que se coloca el polen y se le inyecta aire a 20°C y entre 20 y 40% de humedad relativa, de modo que se crea una corriente de aire que va progresivamente extrayendo el agua del polen en relativamente poco tiempo, pero de forma suave y uniforme. De este modo ha sido posible almacenar polen de muchos cereales durante 10 o más años. Por ejemplo, de maíz, de centeno o de triticale.

En la actualidad esta técnica es la más utilizada para el mantenimiento de polen a largo plazo debido a su sencillez, economía y eficacia. De hecho, ha desbancado a la congelación y secado, que durante mucho tiempo fue la técnica más común.

18.1.4. Almacenamiento en disolventes orgánicos

Este es un método de conservación de polen muy simple. Consiste en secar los granos de polen y almacenarlos en disolventes orgánicos a baja temperatura. Los pasos a seguir serían los siguientes:

- Primero deshidratar la muestra sobre sílice.
- En segundo lugar suspenderla en solventes orgánicos no polares, como el hexano, ciclohexano, dietileter, acetona, benceno, petróleo, bencina, butanol, etanol, metanol, isopropanol, éter de petróleo o cloroformo.
- Por último, se mantienen las muestras en viales sellados en refrigerador (4-6° C) o en algún caso congelados.

Tras el periodo de almacenamiento, los granos de polen se recuperan por filtración o evaporación del disolvente. Tras ello, el polen puede ser utilizado para polinizar o para la realización de cualquier prueba de viabilidad. A pesar de su sencillez, este es un método todavía poco explorado, y actualmente útil sólo para el almacenamiento a medio plazo (pocos meses) de un número limitado de especies. Por ejemplo, algunas especies de *Chrysanthemum, Camellia, Impatiens* o *Lilium*, como *Lilium auratum* o *Lilium longiflorum*. Curiosamente, los granos de polen de estas especies muestran, tras ser almacenados en algunos de los solventes antes mencionados, un crecimiento de sus tubos polínicos superior al del polen fresco, sin conservar. El caso más extremo es el de *Camellia sasanqua*, que muestra tubos polínicos de longitud hasta tres veces superior. Sin embargo, la eficacia de este método para el almacenamiento a largo plazo aún no se ha demostrado en otras especies. Dada la sencillez de la técnica, quizá valga la pena investigar más profundamente su idoneidad para el almacenamiento a largo plazo de polen de otras especies.

18.2. Pruebas de viabilidad del polen

Otro aspecto relevante de la biología del polen es la pérdida de calidad que experimenta progresivamente desde el momento en que es liberado de la antera, y hasta que germina en el estigma de la flor receptora. A la hora de iniciar un programa en el que se requieren cruces (hibridaciones) controladas, es necesario extraer el polen del individuo que se pretende que ejerza de parental masculino, y depositarlo en el estigma de la flor a fecundar. Para que este proceso se desarrolle con la máxima eficiencia posible, es esencial conocer la calidad del polen que se va a utilizar, y determinar si la pérdida de calidad antes mencionada va a ser decisiva en este proceso o no. Igualmente, la determinación de la calidad del polen es un prerrequisito antes del inicio de cualquier estudio experimental del polen, o para determinar el método de almacenamiento más adecuado, de entre los vistos en la sección anterior.

La calidad del polen se mide en base a su viabilidad y su vigor. Se define *viabilidad del polen* como la capacidad del polen para desarrollar su función de liberar las espermátidas en el saco embrionario. El periodo en el que el polen permanece viables varía según especies. Estas a su vez pueden ser clasificadas en función de la viabilidad de su polen como especies con polen de vida corta, media o larga. La viabilidad del polen está estrechamente relacionada con el

hecho de que este se libere en forma bicelular o tricelular, siendo los primeros más longevos que los segundos, probablemente por su menor tasa de respiración. También tiene que ver en esto el contenido inicial en agua del polen cuando es liberado. Para determinar la viabilidad del polen existen diversas pruebas que veremos a continuación.

18.2.1. Producción de frutos y semillas

Dado que la viabilidad del polen se define como la capacidad del polen para liberar sus espermátidas en el saco embrionario, la mejor forma de saber si esto ha sido así o no sería determinar qué porcentaje del polen utilizado para fecundar ha sido capaz de dar lugar a la formación de frutos y de semillas en su interior. Sin embargo, este método tiene importantes limitaciones, siendo la principal el tiempo. Habría que esperar mucho para que el fruto se desarrolle y ver semillas en su interior. Para entonces, puede que el polen a utilizar, aunque fuera viable en el momento de la realización de la prueba, ya no lo sea cuando se observen los resultados. Además, han de considerarse en esto otros factores ajenos al polen, como la receptividad del estigma, la existencia de fenómenos de incompatibilidad polen-estigma, o de barreras post-zigóticas a la hibridación. Hay que tener también en cuenta que esta prueba solo puede realizarse durante el periodo de floración de la especie e cuestión, y que los resultados que se obtienen son de carácter cualitativo más que cuantitativo. Por todos estos motivos, este tipo de prueba no se usa como prueba rutinaria, aunque sí puede utilizarse para confirmar la validez de otras pruebas, como las que veremos a continuación.

18.2.2. Germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en el pistilo

Como alternativas al método anterior, se ha intentado evaluar la viabilidad del polen mediante el estudio de la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico en el pistilo después de llevar a cabo polinizaciones controladas. Para ello, una vez efectuada la polinización, se suelen teñir los pistilos con tinciones que destaquen el tubo polínico, y después se observan en el microscopio. Por ejemplo el *azul de anilina* (Figura 18.2), una tinción fluorescente que se une específicamente a la calosa, componente principal de la pared del tubo polínico en crecimiento. Durante la observación, se cuenta el número de tubos polínicos, y se determina si el número supera o no un umbral mínimo. Por ejemplo, en *Brassica oleracea* se determinó que para considerar una muestra de polen totalmente viable, ha de producir 70 tubos polínicos o más en el estilo. Aunque este método reduce notablemente el tiempo necesario en comparación con el método anterior, presenta la mayoría de las otras limitaciones del método anterior. Además, no siempre es posible cuantificar el número de tubos polínicos creciendo en el estilo.

Figura 18.2: Germinación de polen de *Solanum peruvianum* y crecimiento del tubo polínico en un pistilo de *Solanum lycopersicum*. Tinción con azul de anilina.
Imagen cortesía de Javier Herráiz, del COMAV (Universidad Politécnica de Valencia).

18.2.3. Tinciones no vitales

Debido a las limitaciones de los métodos anteriores, se han desarrollado muchos otros métodos alternativos más sencillos, cómodos y rápidos. Muchas de las pruebas basadas en el uso de tinciones no vitales como el yodo - yoduro potásico, el azul de anilina en lactofenol, el acetocarmín (Figura 18.3), la fucsina ácida o la tinción de Alexander, consisten esencialmente en determinar la presencia de determinadas sustancias en el polen. Se trata de pruebas adecuadas

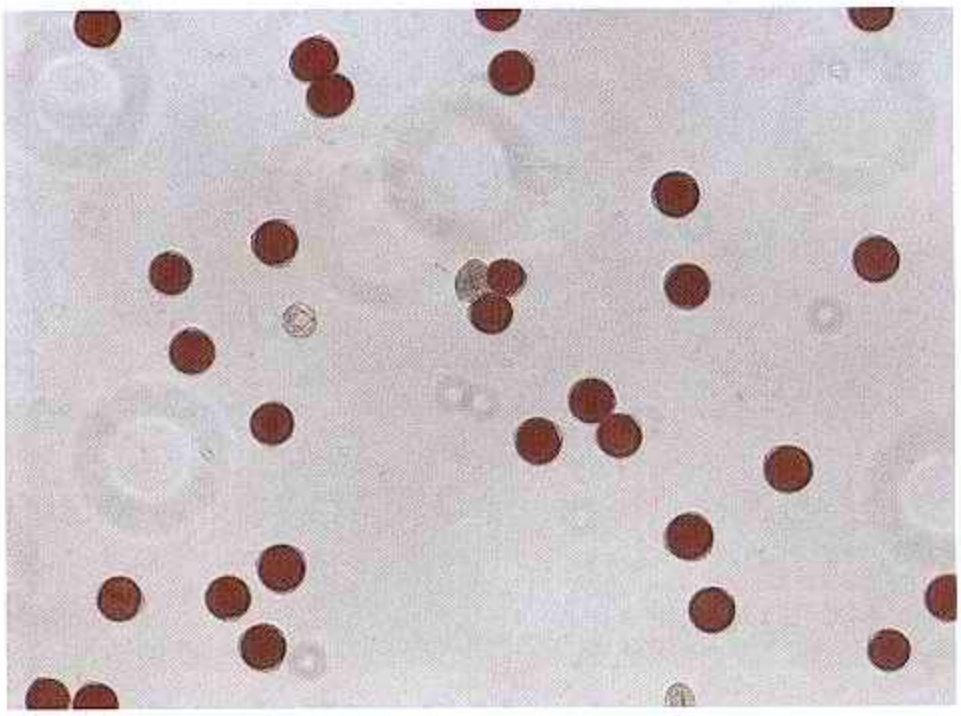


Figura 18.3: Tinción de polen de tomate con acetocarmín.
Imagen cortesía de Javier Herráiz, del COMAV (Universidad Politécnica de Valencia).

para la evaluación de la esterilidad del polen, pero no son realmente fiables para determinar su viabilidad.

En cambio, hay algunas tinciones cuyo mecanismo de tinción es el opuesto a las anteriores y que sí funcionan. Al ser incapaces de penetrar a través de la membrana plasmática de las células vivas, estas no son teñidas, pero sí las células muertas, con su membrana dañada. Tinciones de este tipo, como el azul de Evans y la fenosafranina, sí se consideran adecuadas para evaluar la viabilidad del polen. Sin embargo, los estudios que han utilizado estas tinciones no han sido muy numerosos hasta ahora, de modo que haría falta un uso más extendido a un mayor número de especies para evaluar una posible aplicabilidad más general.

18.2.4. Otras pruebas de uso limitado

Existe un método muy sencillo y rápido, que consiste en provocar la rápida hidratación del polen y la formación de tubos polínicos al ponerlo en contacto con ácidos inorgánicos. No se utiliza en gran medida porque se carecen de datos que establezcan una verdadera correlación de la exposición a los ácidos orgánicos con la viabilidad.

Otro método es la estimación del contenido de ATP mediante el método de la luciferasa-luciferina, que se demostró que correlacionaba con la capacidad germinativa de muchas coníferas. Sin embargo, este método ya no es muy utilizado, probablemente por ser lento y costoso.

Existe una prueba histoquímica, la *prueba de la bencidina*, que se basa en la oxidación de la bencidina por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno. Este método se utilizó durante años para evaluar la viabilidad del polen de muchas especies. En los últimos años esta prueba ha caído en desuso debido a la toxicidad de la bencidina y sobre todo a que ya hay disponibles métodos mejores y más efectivos.

18.2.5. Tinción de tetrazolio

La prueba del tetrazolio es una de las más utilizadas. Esta prueba se basa en la reducción de la sal soluble de tetrazolio (incolora), formando una tinción insoluble, denominada *formazan*, en presencia de deshidrogenasa (Figura 18.4). Para llevar a cabo la reacción se incuban los granos de polen en una solución de tetrazolio durante unos 30-60 minutos. Tras la incubación, se observan los granos de polen en un microscopio y aquellos que queden teñidos con un tono azulado se consideran viables (Figura 18.5). Para esta reacción se suele utilizar como sal soluble el cloruro de trifenil tetrazolio. Sin embargo, existen muchas otras sales, como el rojo de tetrazolio o el nitroazul de tetrazolio (específico para la succinato deshidrogenasa).

A pesar de sus buenos resultados en general, hay que observar que algunos investigadores han alertado acerca de falsas respuestas positivas. En ocasiones,

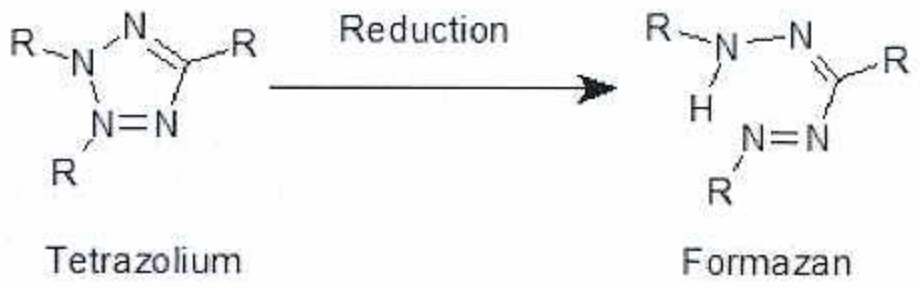


Figura 18.4: Reacción del tetrazolio
Imagen de Tim Vickers de dominio público, en Wikimedia Commons.

los resultados de la prueba del tetrazolio no tienen correlación con las otras pruebas de viabilidad, lo cual hace sospechar de la idoneidad del método. Por ejemplo, en un experimento con *Simmondsia* más del 95% del polen se teñía incluso en muestras incapaces de germinar in vitro. Del mismo modo, más del 90% del polen de *Helleborus niger* sometido a un tratamiento térmico o a DMSO, que incapacita para germinar o para dar positivo a la tinción con FDA (ver apartado 18.2.7), daba positivo al tetrazolio. Otra limitación de la prueba del tetrazolio es que la coloración que adopta el polen muestra una gradación desde un rojo muy claro hasta un rojo oscuro. Esto provoca serias dudas y subjetividad a la hora de establecer el umbral de color a partir del cual un polen ha de considerarse como viable. De ahí que la tinción con tetrazolio esté dejando de ser tan popular como venía siendo.

Figura 18.5: Polen de berenjena teñido con nitroazul de tetrazolio.
Imagen cortesía de Mariola Plazas, del COMAV (Universidad Politécnica de Valencia).

18.2.6. Germinación in vitro

El método más ampliamente aceptado para la evaluación de la viabilidad del polen es la prueba de germinación in vitro. Consiste en aislar el polen de la antera y ponerlo en un medio de cultivo in vitro durante un cierto tiempo, y en condiciones adecuadas para permitir su germinación (Figura 18.6). Pasado ese tiempo, se cuenta el número de granos que emiten tubo polínico, y se calcula su porcentaje frente al total de granos puestos en cultivo.

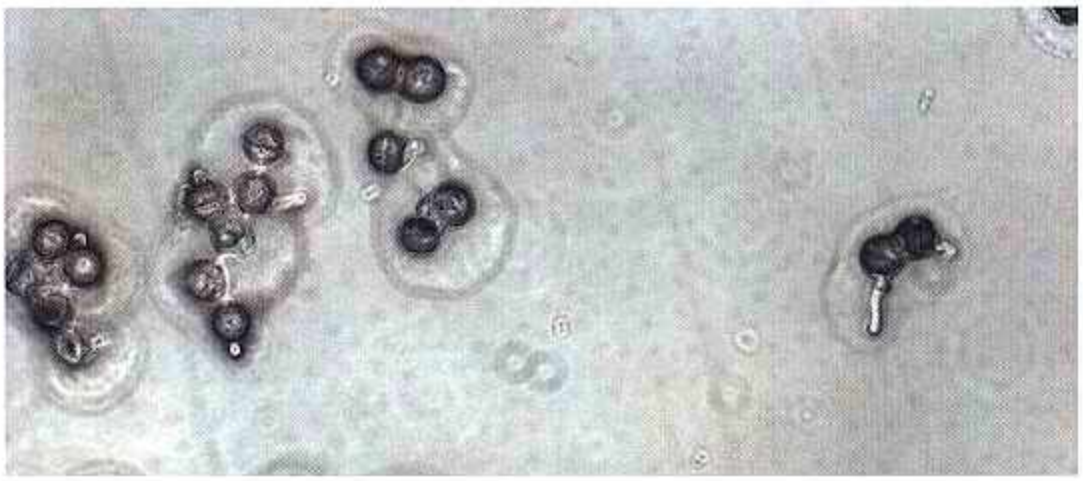


Figura 18.6: Cultivo de polen de tomate germinando in vitro.
Imagen cortesía de Javier Herráiz, del COMAV (Universidad Politécnica de Valencia).

Se trata de un método rápido y sencillo, cuyos resultados suelen coincidir generalmente con los de la prueba de producción de frutos y semillas. Sin embargo, esta relación depende de que el medio de cultivo in vitro esté correctamente optimizado. Son varios los medios que se emplean para la germinación del polen, y todos ellos tienen como componentes fundamentales una elevada concentración de sacarosa y la presencia de ácido bórico. Además de esto, otras condiciones del cultivo in vitro también influyen en que pueda germinar la mayoría del polen viable. Es muy importante dar con las mejores condiciones posibles, pues en condiciones no óptimas, esta prueba tiene el riesgo de dar falsos negativos. Esto es especialmente frecuente en casos de muestras de polen almacenadas que no son capaces de germinar in vitro, pero son capaces de polinizar correctamente y de dar lugar a frutos y semillas. Por tanto, una limitación importante de esta prueba es la falta de medios optimizados para la germinación del polen de muchas especies, particularmente las especies de polen tricelular.

18.2.7. Diacetato de fluoresceína

La tinción con *diacetato de fluoresceína* (FDA), también conocida como *reacción fluorocromática* (FCR), fue publicada por J. Heslop-Harrison y Y. Heslop-Harrison en 1970 como una prueba para medir la viabilidad del polen. En la actualidad es el método más comúnmente utilizado. La tinción con FDA evalúa dos propiedades del polen, la integridad de la membrana plasmática de la célula vegetativa y la presencia de esterasas activas en el citoplasma del polen.

El FDA es una molécula apolar, no fluorescente, que atraviesa libremente la membrana plasmática de la célula vegetativa del polen vivo y es capaz de penetrar en su citoplasma. Una vez allí, es hidrolizado por la actividad de las esterasas citoplásmicas, liberando fluoresceína. La fluoresceína es una molécula polar, que sí es fluorescente y como tal emite una señal detectable a través de un microscopio. El carácter polar de la fluoresceína hace que sea incapaz de salir a través de la membrana plasmática intacta con tanta facilidad como la FDA, y se queda acumulada en el citoplasma del polen. Por tanto, los granos de polen viables presentarán una intensa fluorescencia cuando se observan bajo el microscopio de fluorescencia. Los granos de polen inviables, que no tienen la membrana plasmática intacta, no se teñirán tan intensamente pues la fluoresceína podrá salir de ellos fácilmente. Darán una señal fluorescente uniforme y mucho menos intensa. Además, las esterasas son uno de los primeros enzimas en degradarse, a los pocos segundos de producirse la muerte celular. Por tanto, si no hay esterasas activas en el citoplasma por haber muerto, la fluoresceína no se formará y por lo tanto los granos de polen no serán fluorescentes. Como esta tinción y otras semejantes solo tiñen células vivas, se les denomina tinciones vitales. En los últimos años han surgido otro tipo de tinciones vitales, como la calceína (Figura 18.7), que tienen fundamentos similares pero resultan menos tóxicas para las células vivas o presentan una emisión del fluoróforo más intensa.

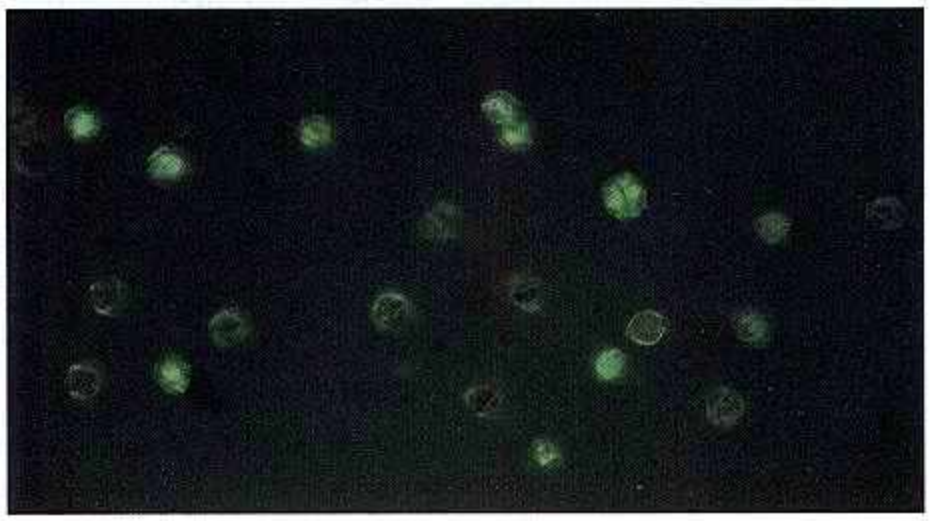


Figura 18.7: Polen de tomate teñido con calceina para evaluar su viabilidad.
Imagen de Seguí Simarro.

Al igual que en el método de la germinación in vitro, para aplicar este es necesario extraer el polen de la antera y mantenerlo vivo en presencia de FDA o algún derivado. Pero a diferencia del anterior, en este sí se ha evidenciado una estrecha correlación entre la tinción con FDA y otras pruebas incluso en condiciones subóptimas de cultivo. Además, proporciona un mejor índice de viabilidad que el método de la germinación in vitro. La prueba de la FDA ha demostrado ser satisfactoria en la evaluación de la viabilidad del polen en numerosas especies. Por ejemplo, se ha comprobado que funciona mejor y proporciona

una mejor resolución que cualquier otro método en el caso del algodón. Sin embargo, hay que tener presente que para obtener resultados válidos si se utilizan muestras de polen seco o desecado, deben tomarse algunas precauciones importantes. Estas muestras tienen que ser hidratadas de forma controlada (mantenerlos en condiciones de humedad alta durante aproximadamente 30 minutos) antes de la prueba de viabilidad. Si se tiñe directamente, puede que el polen no responda.

18.3. Pruebas de vigor del polen

El término *vigor del polen* hace referencia a la velocidad de germinación y a la tasa de crecimiento del tubo polínico. No es lo mismo ni equivalente a la viabilidad, dado que pueden haber casos de polen -y de hecho los hay- igualmente viables, pero que respondan a la germinación o emitan el tubo polínico de manera muy distinta. Durante mucho tiempo el parámetro "vigor" no se ha tenido en cuenta, y solo se consideraba la viabilidad para medir la calidad del polen, lo cual daba lugar a numerosos falsos negativos. Esto era especialmente importante en los casos de polen viejo o almacenado, que podía ser todavía viable, pero carecer del vigor suficiente.

Dada la amplia información disponible respecto al vigor en semillas, resulta un tanto sorprendente que en polen no se haya reparado en esto hasta hace relativamente poco. Por ejemplo, hoy se considera que el vigor de la semilla, evaluado sobre la base de la velocidad de germinación, es un índice más fiable de la calidad de la semilla que su capacidad de germinación sin más. La pérdida de vigor de la semilla se hace evidente por lo general antes de que pierda su capacidad germinativa. Las semillas con vigor reducido se ha demostrado que producen plantas inferiores, con rendimientos más bajos y más susceptibles al estrés medioambiental. Así, el deterioro de una semilla se define como el inverso de su vigor, y no de su capacidad germinativa. Como las semillas y los granos de polen son muy similares en muchos aspectos fisiológicos, se sugirió que los granos de polen también podían presentar una reducción del vigor como antesala de la pérdida de viabilidad. Muchas investigaciones durante los últimos 15 años han demostrado que el envejecimiento, así como diversos tipos de estrés ambiental -en particular la desecación, la temperatura y la humedad- afectan al vigor de polen antes de afectar a la viabilidad. Igual que sucedía con la viabilidad, existen métodos experimentales para determinar el vigor del polen. Veremos a continuación algunos de ellos.

18.3.1. Germinación in vitro

Además de ser útil para la evaluación de la viabilidad, la germinación in vitro del polen también se puede utilizar para evaluar su vigor. En las pruebas de viabilidad mediante germinación in vitro se medía la capacidad del polen para germinar sin tener en cuenta el factor tiempo: se ponía el polen en cultivo y tras un cierto tiempo -en general mucho más largo que el requerido para la

germinación en condiciones normales- se contaba el número de granos que emitían tubo polínico. En cambio, para evaluar el vigor la germinación se contabilizan cada cierto tiempo los granos que germinan y se comparan los valores obtenidos para cada intervalo de tiempo con los que se obtienen de una muestra de polen control (polen fresco en el caso de querer medir el vigor de una muestra almacenada, o polen no tratado en el caso de querer medir el vigor de una muestra a la que se le ha aplicado un determinado tratamiento). Aunque sigan siendo viables, los granos de polen con vigor reducido tardan más en alcanzar la máxima capacidad germinativa, la del polen fresco o no tratado.

18.3.2. Técnica semi-in vivo

En esta técnica, la muestra de polen a analizar se utiliza para polinizar de forma controlada un pistilo compatible y no polinizado previamente. Una vez polinizado, el pistilo puede mantenerse en la planta tomando precauciones para evitar posteriores polinizaciones, o bien diseccionarse y mantenerse in vitro, en laboratorio. Los pistilos polinizados se mantienen (durante 3-6 horas) hasta que los granos de polen germinen en el estigma, y sus tubos polínicos comiencen a extenderse a lo largo del estilo. Tras este tiempo de incubación, el estilo se corta y se siembra en un medio de cultivo semisólido adecuado para permitir la germinación y el crecimiento del tubo polínico. A partir de este punto, se dejan crecer los tubos hasta que salgan por la zona de corte del estilo y sean visibles en el medio de cultivo. En esta técnica, el vigor del polen se determina contando el tiempo necesario para que aparezcan tubos polínicos en el medio y el número de tubos polínicos que aparecen. Además, se puede medir la longitud de los tubos in situ o después de retirar el estilo. Esta técnica requiere que se realicen antes algunos estudios preliminares sobre cómo germina el polen de la especie a estudiar y cómo crece su tubo in vivo.

18.3.3. Germinación del polen in vivo y crecimiento del tubo polínico

El vigor de polen también puede ser evaluado in vivo, midiendo a intervalos regulares la germinación y el crecimiento del tubo polínico en pistilos polinizados con las muestras de polen a analizar. En este caso el vigor se mide comparando los granos que germinan y el crecimiento de los tubos de la muestra a analizar con los mismos parámetros de una muestra control (polen fresco o no tratado).

Una variante de este método también sencilla aunque algo más lenta sería extirpar el estigma y una parte del estilo a diferentes tiempos tras la polinización. Los tubos de los granos más vigorosos, es decir, los que hayan atravesado la zona del corte antes de extirpar el estilo, continuarán creciendo, fecundarán y darán frutos y semillas. En cambio, solo unos pocos -o ninguno- de los tubos de los granos menos vigorosos habrán alcanzado la zona de corte antes de que este se produzca. Por tanto, darán lugar a muchos menos frutos y semillas, o ninguno.

18.4. Resumen

En este tema hemos tratado un aspecto de la biotecnología del polen relevante desde el punto de vista de la mejora vegetal: la conservación del polen en condiciones que mantengan su capacidad germinativa durante un periodo de tiempo más allá de su viabilidad natural. La conservación de polen en bancos de polen es interesante para poder utilizarlo a voluntad en otros lugares o en otros momentos distintos a los de su creación. Para conservar el polen existen varios métodos, en su gran mayoría basados en la extracción del agua que contienen y en el almacenamiento a bajas temperaturas. En función del periodo de conservación que sea necesario se puede optar por uno u otro método. Pero lo más importante es determinar previamente si el polen a conservar resiste las condiciones de conservación o no. Esta es una característica muy dependiente del genotipo. Por ejemplo, el polen de los cereales es muy sensible a la deshidratación y solo puede ser conservado mediante criopreservación.

Una vez estamos dispuestos a utilizar el polen conservado, es necesario evaluar previamente si dispone todavía de una calidad suficiente. Para esta evaluación se suelen medir principalmente dos parámetros, la viabilidad y el vigor del polen. La viabilidad se cuantifica como el porcentaje del total de granos de polen que retiene su función biológica, la capacidad de emitir tubo polínico y de liberar las espermátidas cuando son expuestos a las condiciones adecuadas. Para ello existen distintas pruebas de gran utilidad, que estiman este parámetro en función de si permanecen vivos, o de si además son capaces de germinar (emitir tubo polínico) in vitro.

El vigor se entiende como el tiempo que necesitan los granos de polen para germinar y desarrollar el tubo polínico. Está relacionado con la viabilidad, pero es más preciso en cuanto a que informa del tiempo que un determinado polen necesita para germinar. Se determina por métodos muy similares a los de la viabilidad, pero introduciendo además el factor tiempo. Es decir, se determina midiendo el porcentaje de granos que han emitido tubo polínico a distintos intervalos de tiempo. Este parámetro nos puede dar información acerca de si nuestro polen es más o menos vigoroso (rápido en germinar), y por tanto de cuanto habría que esperar para tener un porcentaje de germinación suficiente para nuestros intereses.

18.5. Información adicional

- Bajaj Y.P.S. 1987. Cryopreservation of pollen and pollen embryos, and the establishment of pollen banks. International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology, 107: 397-420.
- Connor K.F., Towill L.E. 1993. Pollen handling protocol and hydration-dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. Euphytica, 68: 77-84.

- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; Intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain Technology, 45: 115-120.
- Hughes H.G., Lee C.W., Towill L.E. 1991. Low temperature preservation of Clianthus formosus pollen. Hortscience, 26: 1411-1412.
- Iwanami Y. 1972. Retaining viability of *Camellia japonica* pollen in various organic solvents. Plant and Cell Physiology, 13: 1139-1141.
- Iwanami Y., Nakamura N. 1972. Storage in an organic solvent as a means for preserving viability of pollen grains. Stain Technology, 47: 137-139.
- Jain A., Shivanna K.R. 1988. Storage of pollen grains in organic solvents. Effect of organic-solvents on leaching of phospholipids and its relationship to pollen viability. Annals of Botany, 61: 325-330.
- Jain A., Shivanna K.R. 1988. Storage of pollen grains in organic solvents. Effects of solvents on pollen viability and membrane integrity. Journal of Plant Physiology, 132: 499-501.
- Jain A., Shivanna K.R. 1989. Loss of viability during storage is associated with changes in membrane phospholipid. Phytochemistry, 28: 999-1002.
- Jain A., Shivanna K.R. 1990. Storage of pollen grains of Crotalaria retusa in oils. Sexual Plant Reproduction, 3: 225-227.
- Johri B.M., Vasil I.K. 1961. Physiology of pollen. Botanical Review, 27: 325-381.
- Mishra R., Shivanna K.R. 1982. Efficacy of organic solvents for storing pollen grains of some leguminous taxa. Euphytica, 31: 991-995.
- Rao G.U., Jain A., Shivanna K.R. 1992. Effects of high-temperature stress on brassica pollen. Viability, germination and ability to set fruits and seeds. Annals of Botany, 69: 193-198.
- Shivanna K.R. 2003. Pollen biology and biotecnology. Science Publishers, Inc. Enfield (USA).
- Shivanna K.R., Heslop-Harrison J. 1981. Membrane state and pollen viability. Annals of Botany, 47: 759-770.
- Shivanna K.R., Johri B.M. 1985. The angiosperm pollen. Structure and function. Wiley Eastern Limited, New Delhi (India).
- Stanley R.G., Linskens H.F. 1974. Pollen: Biology, Biochemistry and Management. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Towill L.E. 1981. Liquid nitrogen preservation of pollen from tuber-bearing solanum species. Hortscience, 16: 177-179.
- Towill L.E. 1984. Seed set with potato pollen stored at low temperatures. American Potato Journal, 61: 569-575.

- Towill L.E. 2004. Pollen storage as a conservation tool. Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild: 180-188.
- Yates I.E., Sparks D., Connor K., Towill L. 1991. Reducing pollen moisture simplifies long-term storage of pecan pollen. Journal of the American Society for Horticultural Science, 116: 430-434.

TEMA 19. Haploides y doble haploides (I). Androgénesis

En el tema 7 veíamos que a través de la microsporogénesis las esporas masculinas (microsporas) se desarrollaban y acababan finalmente dando lugar al polen, dentro del que se formarían los gametos masculinos. También veíamos en el tema 15 que gracias al cultivo in vitro es posible regenerar plantas completas a partir de prácticamente cualquier tipo de célula vegetal. Pues bien, si combinamos ambos conceptos, nos encontramos con la androgénesis. Es decir, si utilizamos como explantes los precursores del polen (las microsporas principalmente) y a estas les aplicamos una serie de técnicas especializadas de cultivo in vitro, podemos regenerar plantas completas a través de unas rutas experimentales de desarrollo que se conocen en general como *vías androgénicas*. Las plantas androgénicas resultantes tendrán unas características muy peculiares, de entre las que destaca el hecho de ser haploides o doble haploides. En este tema veremos cuales son estas vías, qué características tienen las plantas androgénicas y en qué consisten estas técnicas de cultivo in vitro.

19.1. Haploides y doble haploides

Los individuos haploides son aquellos que presentan un número de cromosomas que es la mitad del número normal de cromosomas de la especie. Entendemos como número "normal" el que presentan las células somáticas de los individuos de la especie. Por ejemplo, si los individuos de una especie son diploides (que es lo más habitual), tendrán dos copias de cada uno de sus cromosomas. En cambio, si surge un individuo haploide en esa especie, tendrá solo una copia de cada cromosoma. La mitad de lo normal. Si la especie fuera *autotetraploide* (cuatro copias de cada cromosoma), los haploides tendrían dos copias de cada cromosoma (serían en realidad *dihaploides*). Podríamos también decir que los individuos haploides son aquellos que tienen el mismo número de cromosomas que los gametos de su especie. O dicho de otro modo, los que tienen un *número gamético* de cromosomas. Como vimos en el tema 6, durante la meiosis se reduce a la mitad el número somático de cromosomas en las células germinales, que darán lugar a los gametos. Así, cuando se fusionen los dos gametos de sexos opuestos, en el nuevo individuo quedará restablecido el número somático de cromosomas de la especie.

Sin embargo, en ocasiones no se produce la fusión de los gametos, y se desarrolla un nuevo embrión y una nueva planta a partir tan solo de un gameto haploide, o de sus precursores, también haploides. A este proceso se le conoce como *ginogénesis* cuando se trata de gametos o precursores femeninos, y *androgénesis* cuando se trata de gametos o precursores masculinos. Existe algún caso en el que este proceso se da de forma espontánea. Pero en la mayoría de las ocasiones, este proceso de formación de individuos haploides es inducido de forma artificial por el ser humano, por las ventajas que estos individuos aportan para investigación genética básica.

Los haploides son un buen sistema para detectar mutaciones recesivas, pues al no haber alelos distintos se eliminan los efectos de la dominancia. Son útiles también para estudios de cartografía genética, para la elaboración de mapas de ligamiento. Por el contrario, desde un punto de vista biológico los haploides tienen claras desventajas frente a los diploides. Suelen ser individuos de porte reducido y con órganos de menor tamaño que los diploides (Figura 19.1). Esto es lógico, si pensamos que dentro de cada núcleo de cada célula hay exactamente la mitad de ADN que en las células diploides. Además, presentan mayor inestabilidad genética, un crecimiento más lento y son más susceptibles a enfermedades, ataques de patógenos, y en general cualquier influencia negativa del entorno. Por esta razón los haploides suelen estar biológicamente desfavorecidos frente a los diploides, cuyo genoma es mucho más estable. Pero por encima de todas, la principal desventaja evolutiva del haploide es que es estéril. Al tener solo la mitad de los cromosomas de la especie (Figura 19.2), a la hora de comenzar el desarrollo gametofítico la planta haploide tropezará con un gran problema en la meiosis: no tendrá cromosomas homólogos con los que formar entrecruzamientos y llevar a cabo la recombinación. Esto provoca un bloqueo de la meiosis que impide el desarrollo posterior de los gametos. Así, los individuos haploides presentan anteras y óvulos, pero sin gametos. Es fácilmente deducible que sin gametos estos individuos no podrán tener descendencia, al menos por vía sexual, que es la más común.

Una vez inducido el desarrollo del individuo haploide, en ocasiones este suele sufrir una duplicación de su genoma de forma espontánea, entendiendo por espontánea que no se hace nada específicamente para provocarla. En muchos

Figura 19.1: Individuo haploide (A), doble haploide (B) y diploide (C) en tomate.
Imagen de Segui Simarro.

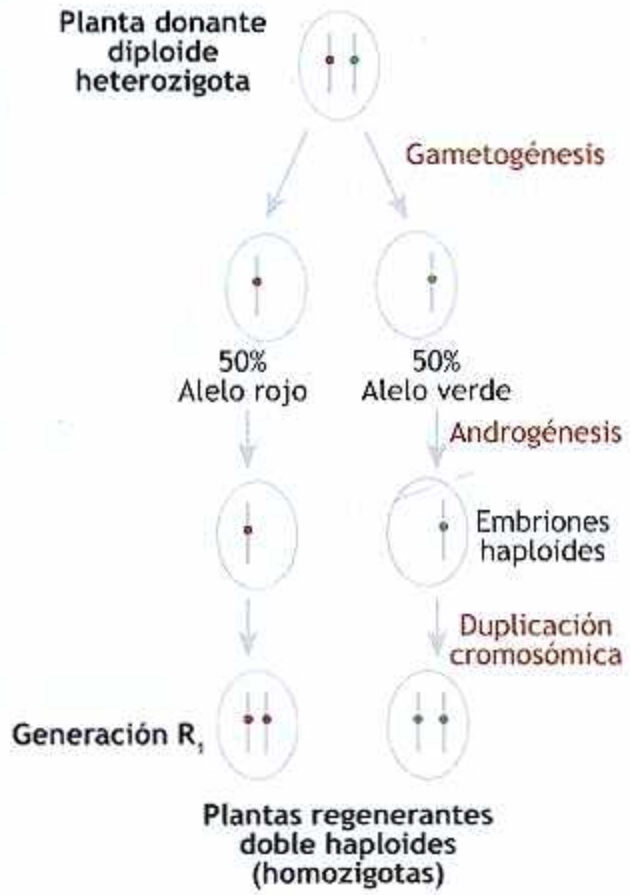


Figura 19.2: Esquema simplificado de la obtención de individuos doble haploides a partir de una de sus posibles vías de obtención, la androgénica.
Imagen de Seguí Simarro.

casos esta duplicación se debe precisamente a la mencionada inestabilidad del genoma haploide, que sufre una duplicación de modo que alcance un estado más estable, el diploide. En otros casos, no se da la duplicación a no ser que se induzca específicamente por el ser humano, mediante drogas y tratamientos experimentales. Lo veremos en la Sección 19.8, dedicada a la duplicación del genoma haploide).

Sea inducida o no inducida, lo que se obtiene tras la duplicación del genoma es un individuo *doble haploide*, cuyo genoma está formado por dos copias exactas del genoma inicialmente haploide (Figura 19.2). Es decir, en cada uno de los cromosomas homólogos habrán exactamente los mismos alelos. Serán homozigotas para todos y cada uno de sus genes. En términos genéticos, esto implica que los individuos doble haploides tendrán siempre la misma descendencia de autofecundación, no generarán jamás poblaciones segregantes para ningún carácter. Por más recombinación que sufran los gametos de los doble haploides, siempre se generarán las mismas combinaciones de genes, al haber los mismos alelos en cada cromosoma homólogo. Esto, claro está, será así en ausencia de mutaciones o de cualquier otro fenómeno generador de variabilidad más allá de la recombinación. En términos de mejora genética, a estos individuos genéticamente homogéneos se les denomina *líneas puras*. Es decir, un doble haploide es una línea pura, y esta es precisamente su gran ventaja desde un punto de vista biotecnológico, como veremos a continuación.

19.2. Utilidad de los doble haploides

Las empresas que se dedican a producir semillas para vender a los agricultores se basan en la producción de semilla híbrida, es decir, proveniente de un cruce (sexual) entre dos parentales distintos y genéticamente homogéneos (homozigotos) para todos sus caracteres, denominados líneas puras. Como las líneas puras no segregan, según la herencia mendeliana todas las semillas de primera generación producidas al cruzar las dos líneas puras van a ser híbridos (heterocigotos) genéticamente idénticos. Van a tener todos las mismas características, incluyendo las que le interesan al agricultor. Así el agricultor se asegura que toda su producción será uniforme en cuanto a calidad, tamaño, producción, etc. Pero si el agricultor decide obtener sus propias semillas, provenientes de su cultivo de primera generación, para sembrarlas y obtener un cultivo de segunda generación, también de acuerdo con las leyes de la genética mendeliana se encontrará con una enorme e indeseable variabilidad: frutos grandes y muy pequeños, mayor y menor coloración, mejor y peor sabor, plantas muy productivas y otras muy poco, cultivos más y menos resistentes a una determinada plaga, etc. Esta variabilidad es un grave inconveniente para el agricultor. Esta es la manera que tiene el productor de semillas de asegurarse de que al año siguiente el agricultor volverá a comprarle más semilla, pues solo él tiene las líneas puras capaces de dar semilla "de primera generación", 100% uniforme en todos sus caracteres.

En definitiva, el sistema actual de producción comercial de semilla híbrida se basa en la obtención previa de líneas puras. Las líneas puras se han venido obteniendo tradicionalmente mediante la fecundación recurrente de una planta por su propio polen (autofecundación) a lo largo de varias generaciones. Por lo general, de siete a nueve generaciones. En el caso de cultivos anuales, entre siete y nueve años. En el caso de leñosas, muchísimos más años. Esto le supone al productor una enorme inversión en tiempo (años), extensiones de cultivo y recursos económicos que luego traslada al precio final de la semilla, encareciéndola notablemente. Pero desde que se descubrió la posibilidad de obtener doble haploides, es posible obtener la misma línea pura en tan solo una generación. A efectos prácticos, la planta doble haploide, obtenida en tan solo una generación in vitro (pocos meses), es tan genéticamente uniforme, o más, que las líneas puras obtenidas por métodos tradicionales. De hecho, con las técnicas de mejora clásica nunca se alcanza el 100% de homozigosis, y los mejoradores consideran que una línea es pura cuando tras años de cruces se rebasa el 99% de homozigosis. Los doble haploides son pues, una forma rápida y barata de obtener líneas puras. Como se puede deducir, si el productor de semillas decide obtener sus líneas puras mediante la tecnología de los doble haploides, el ahorro económico (y en tiempo, que al final se traduce también en dinero) va a ser considerable.

En mejora vegetal, los doble haploides se han vuelto también imprescindibles para la cartografía genética de caracteres complejos como producción o calidad, que son los de mayor interés agronómico y son difícilmente abordables

actualmente mediante otras técnicas. Constituyen también una poderosa herramienta en transgénesis, para evitar hemizigotos y ahorrar tiempo y recursos en la obtención de plantas transformadas con el transgen en ambos alelos (Figura 19.3). Por otra parte, desde un punto de vista científico básico, estas líneas son también muy útiles para estudios básicos de ligamiento y estimas de fracciones de recombinación. Aunque estos estudios pueden también realizarse convencionalmente (retrocruces o F2), las líneas doble haploides tienen la ventaja de ser autoperpetuables, es decir se pueden perpetuar simplemente a partir de semillas de autofecundación. Son también una herramienta sumamente útil para la selección genética y la detección de mutantes recesivos, pues el fenotipo de las plantas resultantes no se ve afectado por los efectos de la dominancia, y los caracteres determinados por genes recesivos pueden ser fácilmente identificados.

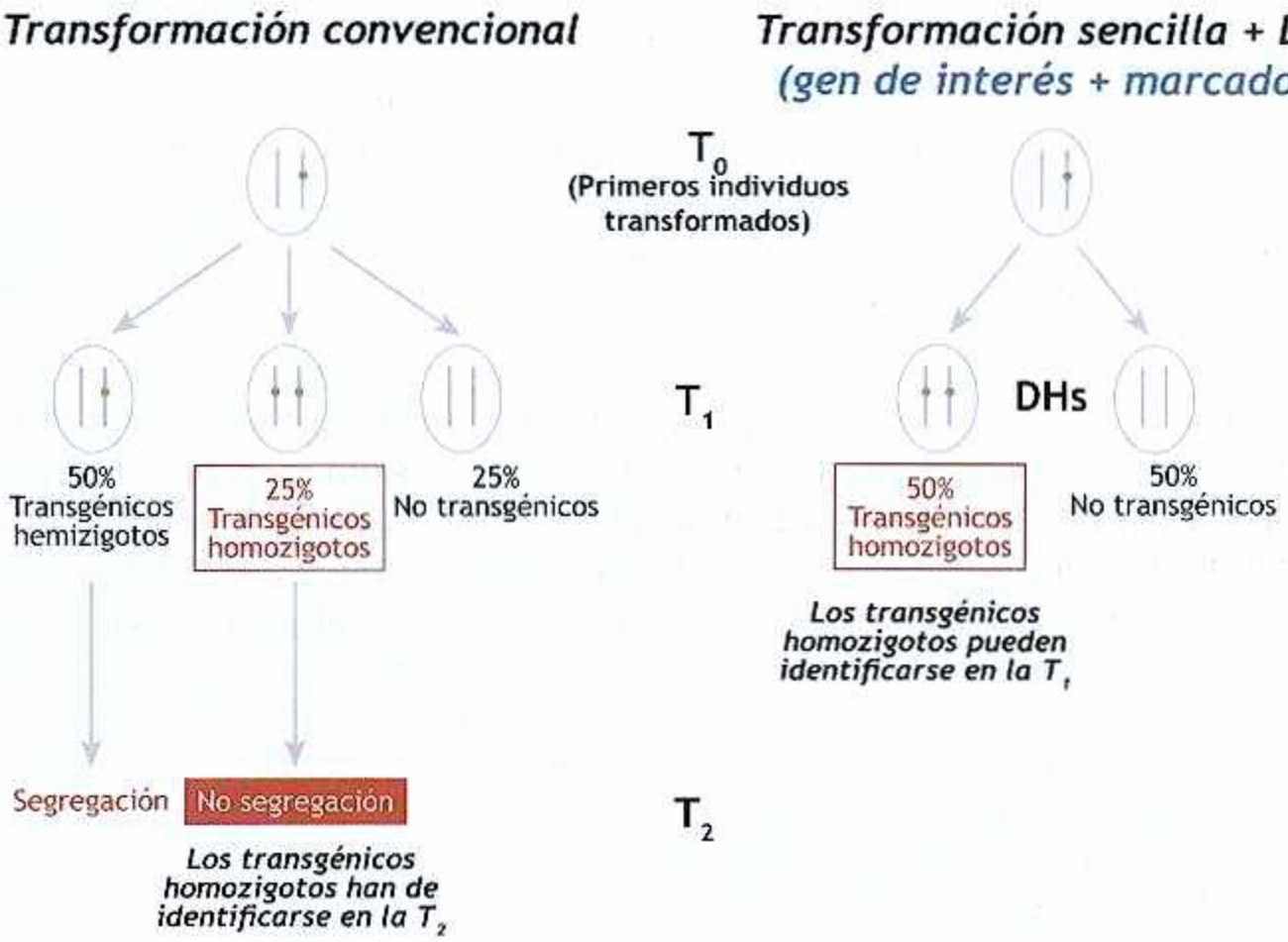


Figura 19.3: Esquema de las ventajas de combinar la transformación genética con la obtención posterior de doble haploides (DH), frente a la transformación, autofecundación y selección de los transformantes de manera convencional.
Imagen de Seguí Simarro.

19.3. Obtención de haploides y doble haploides

Es posible obtener haploides y doble haploides a través de diferentes vías de desarrollo, tanto del gametófito masculino como del femenino. A partir del gametófito femenino es posible obtener haploides y doble haploides través de una vía conocida como *ginogénesis*. También es posible mediante determinados tipos de hibridaciones interespecíficas entre especies cercanas, o utilizando

polen al que se le han aplicado tratamientos especiales. Veremos todas estas técnicas en el próximo tema, centrado en las aplicaciones biotecnológicas del gametófito femenino. En lo que ocupa a este tema, nos centraremos en la posibilidad de obtener haploides y doble haploides a partir del gametófito masculino, a través de una serie de rutas experimentales que se engloban dentro de un fenómeno conocido como la *androgénesis*.

19.4. Las distintas rutas androgénicas

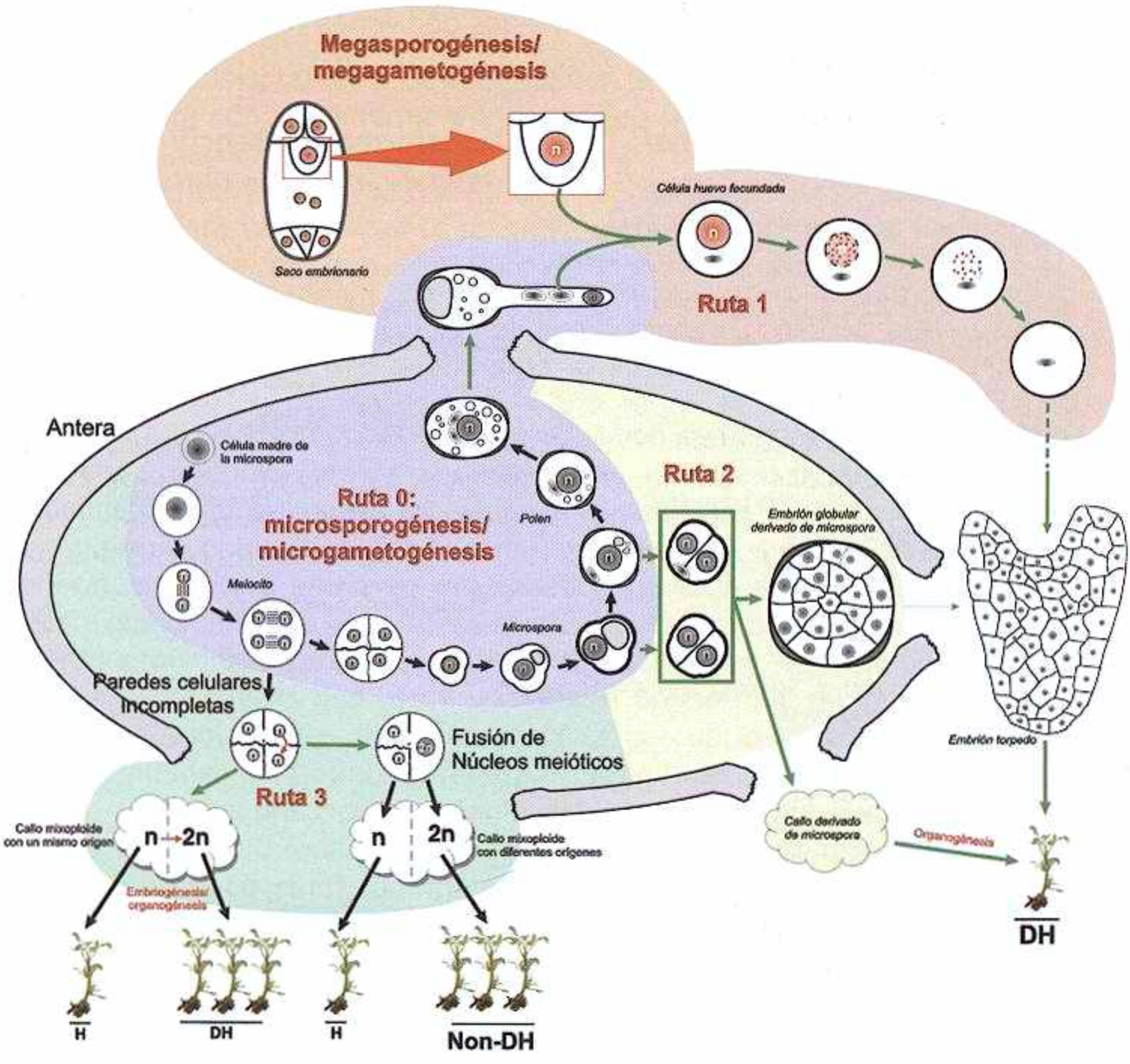


Figura 19.4: Distintas vías de reprogramación del desarrollo gametofítico de la microspora/polen (ruta 0) hacia androgénesis. La ruta 1 ilustra la formación de un individuo haploide mediante la fecundación de la célula huevo y posterior inactivación del genoma del núcleo femenino. La ruta 2 ilustra las diferentes etapas de la embriogénesis (o en algunos casos callogénesis) a partir de microsporas. La ruta 3 ilustra la formación de doble haploides, junto con otra serie de individuos no doble haploides, indeseados, a través de la organogénesis sobre callos derivados de meiocitos. Ver el texto para más información.

Imagen adaptada de Seguí-Simarro 2010 (ver Sección 19.11 Información adicional).

La androgénesis se define como el conjunto de vías de desarrollo que dan lugar a un individuo cuyo fondo genético proviene exclusivamente de un núcleo de origen masculino. En un lenguaje más coloquial, podríamos decir que consiste en obtener una planta a partir de un núcleo haploide procedente de un donante masculino. En el caso de planas hermafroditas, un donante masculino debería entenderse como una célula sexual, haploide, masculina, que generalmente suele ser una microspora o alguna de las células del grano de polen. En algún caso, muy concreto y poco frecuente, puede ser una espermátida, como ahora veremos.

Hasta donde se sabe a día de hoy, se puede conseguir un individuo de origen androgénico a través de tres vías, que se sintetizan en la figura 19.4:

- la inactivación del genoma femenino en un zigoto unicelular
- la embriogénesis de microsporas
- la callogénesis derivada de meiocitos.

De estas tres vías, la inactivación del genoma femenino en un zigoto unicelular es la primera que se conoció como capaz de dar lugar a individuos androgénicos. De hecho, la primera definición de androgénesis se hizo en base tan solo a esta posibilidad. Más tarde se descubrieron otras vías de llegar al mismo resultado final, involucrando el desvío experimental de alguno de los precursores de los gametos masculinos, bien el grano de polen o bien la microspora. En las próximas páginas veremos brevemente cada una de estas vías, para luego centrarnos en la segunda, la más prometedora y aplicable desde un punto de vista biotecnológico para la obtención de individuos doble haploides.

19.5. El concepto original de androgénesis

Según su definición inicial, el concepto "androgénesis" iba inexorablemente ligado a "fecundación". Fue acuñado originalmente para definir una ruta partenogénica específicamente masculina que implicaba reproducción sexual, fecundación de la célula huevo por parte de la espermátida, y la posterior inactivación del genoma del núcleo de la célula huevo, de manera que en el zigoto quedaba tan solo el núcleo haploide masculino. A partir de él se generaría un embrión haploide y finalmente una planta haploide de origen masculino (Figura 19.4, ruta 1).

En la naturaleza, esta parece ser una alternativa muy poco común a la reproducción sexual convencional, utilizada por ejemplo por algunas familias de almejas, los cipreses del Sáhara o el ajolote mexicano *Siredon mexicanum*. En angiospermas, esta vía espontánea de desarrollo androgénico fue descrita hace 80 años, en 1929. Pero curiosamente, 80 años después los casos documentados de ocurrencia de este fenómeno son todavía escasos, probablemente debido a la baja tasa de aparición de este fenómeno en la naturaleza. Además, la mayoría

de estos ejemplos datan de hace más de 40 años, sin nuevas aportaciones en estas últimas cuatro décadas. De entre los ejemplos documentados destaca el maíz, donde la máxima incidencia observada de este fenómeno es de 1 individuo por cada 80.000 observados sobre un tamaño muestral de 400.000. También se han documentado ejemplos en tabaco, y *Capsicum frutescens*, además de en algunos cruces interespecíficos del género *Nicotiana*.

En todos estos casos, la identificación del origen haploide masculino se basó en una caracterización fenotípica de los descendientes que expresaban sólo caracteres pertenecientes al parental masculino. Más allá de esto, es muy poco lo que se sabe, por ejemplo, del control genético de este proceso, o de sus aspectos celulares. En las angiospermas, se cree que el embrión androgénico haploide procede de un núcleo espermático, reducido. Aunque está claro que el material genético del embrión androgénico proviene del parental masculino, se asume en general que los haploides androgénicos vienen exclusivamente de las divisiones del núcleo de la espermátida tras la fecundación. Sin embargo, no parece haber suficiente evidencia que apoye esta idea. Bien podría ser el núcleo vegetativo del grano de polen el responsable del crecimiento proliferativo, como veremos más adelante que sucede en la embriogénesis de microsporas. La contribución del gametófito femenino tampoco está del todo clara. Otro aspecto interesante es la eliminación del genoma materno, de la que tampoco se sabe nada de cómo y por qué sucede.

La aplicación práctica de este fenómeno natural es bastante limitada. Solamente se hicieron algunos intentos de aplicación con unas líneas mutantes de maíz que tenían una frecuencia androgénica algo superior a la normal de la especie. Más allá del maíz, esta mutación no se ha descrito en ningún otro cultivo. En resumen, 80 años después poco nuevo se sabe de las bases celulares, moleculares o genéticas o de este curioso proceso, que se presenta como una rareza biológica. Tampoco es probable que se descubra nada nuevo en los próximos años probablemente debido a las dificultades impuestas por su baja frecuencia. Así, la androgénesis espontánea, in vivo, como un sistema natural para la producción de haploides y doble haploides androgénicos no parece que vaya a tener un impacto significativo en la biotecnología vegetal del futuro.

19.6. Embriogénesis de microsporas

La embriogénesis de microsporas (también llamada embriogénesis del polen, embriogénesis haploide o embriogénesis gamética) es la ruta androgénica más común y mejor estudiada. En esta ruta (Figura 19.4, Ruta 2), la microspora o grano de polen se desvía de su ruta gametofítica normal y es inducida *in vitro* a formar generalmente un embrión (o en ocasiones un callo haploide), bien directamente en el medio de cultivo en el que se aisla, o bien dentro de la antera cuando es ésta la que se aisla y cultiva *in vitro*. En cualquier caso se obtendrán plantas haploides en las que se induce posteriormente la duplicación cromosómica o directamente doble haploides (por duplicación no inducida del genoma haploide).

Esta ruta experimental fue descubierta en 1964 por S. Guha y S.C. Maheshwari, cuando demostraron que se podían regenerar plantas haploides mediante el cultivo in vitro de las microsporas y el polen contenido las anteras de una solanácea, *Datura innoxia*. Tras Guha y Maheshwari, numerosos investigadores se dieron cuenta de la importancia práctica de este descubrimiento y exploraron esta vía en muchas especies y géneros. Hoy en día se considera la herramienta más poderosa de entre las disponibles para la obtención de plantas doble haploides en diversas especies de angiospermas, tanto mono como dicotiledóneas.

19.6.1. Técnicas de cultivo in vitro para la inducción de embriogénesis de microsporas

Existen dos técnicas para conseguir que una microspora comience a proliferar como embrión: el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas aisladas. El cultivo de anteras (Figura 19.5) es la primera de estas técnicas que se puso en práctica por Guha y Maheshwari. Desde el punto de vista metodológico, es la alternativa más sencilla. Solo es necesario recolectar las yemas florales que contengan anteras con microsporas en la etapa de desarrollo adecuada, extraer de ellas las anteras, y ponerlas en cultivo con las condiciones oportunas, diferentes según la especie. A partir de este momento, las microsporas comenzarán a crecer dentro de la antera, al tiempo que los tejidos de esta última comenzarán a degenerar y necrosarse. Cuando el espacio disponible en el saco polínico ya no sea suficiente para albergar las estructuras proliferantes, estas emergerán al exterior en forma de embriones (Figura 19.5) o incluso de plántulas ya germinadas (Figura 19.6). La metodología y la infraestructura necesaria para esto no dista en nada de la que pueda haber disponible en cualquier laboratorio

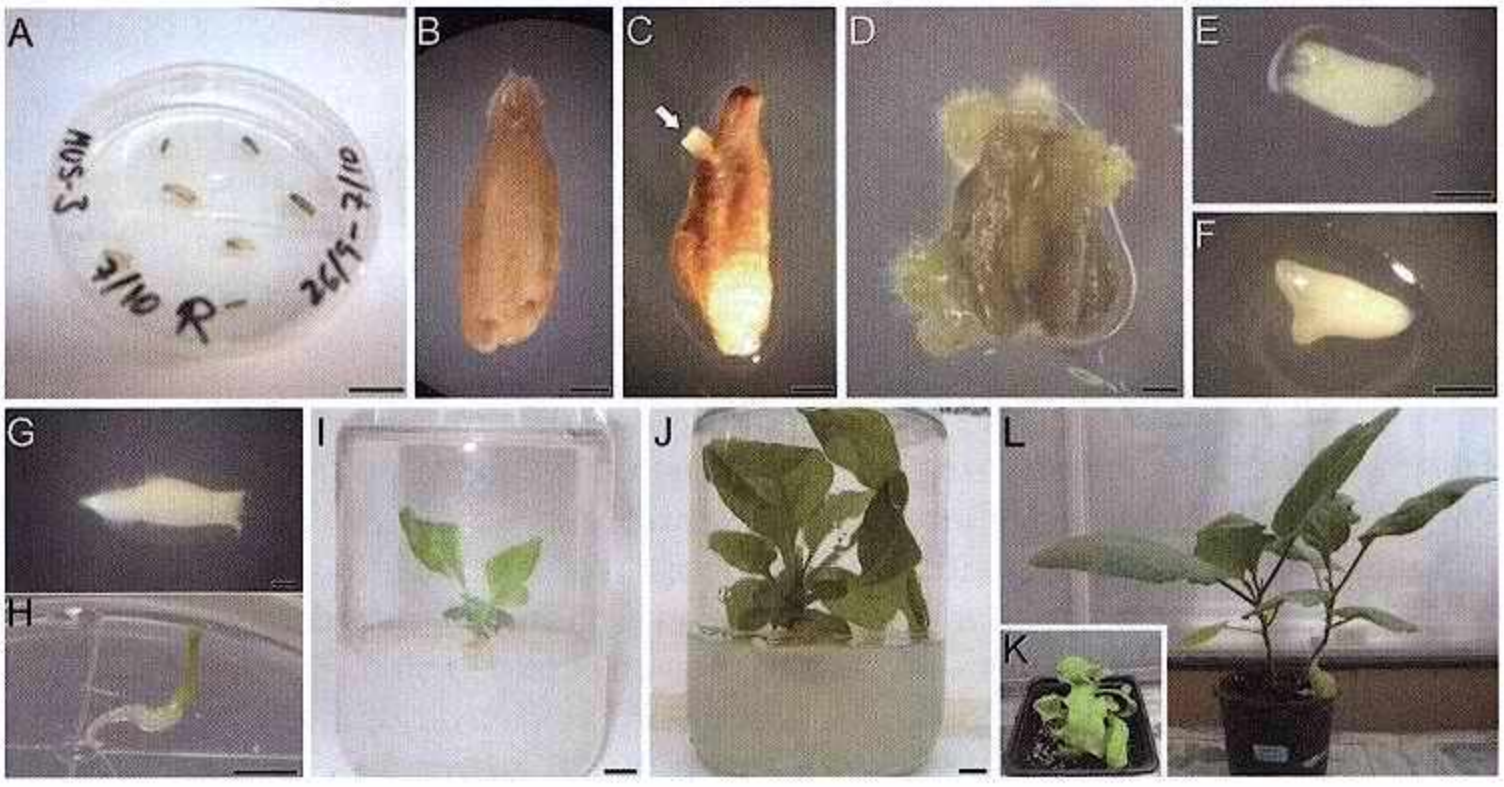


Figura 19.5: Las distintas etapas del cultivo in vitro de anteras, desarrollo y germinación de los embriones androgénicos, y obtención de las plantas doble haploides en berenjena.
Imagen de Seguí Simarro.

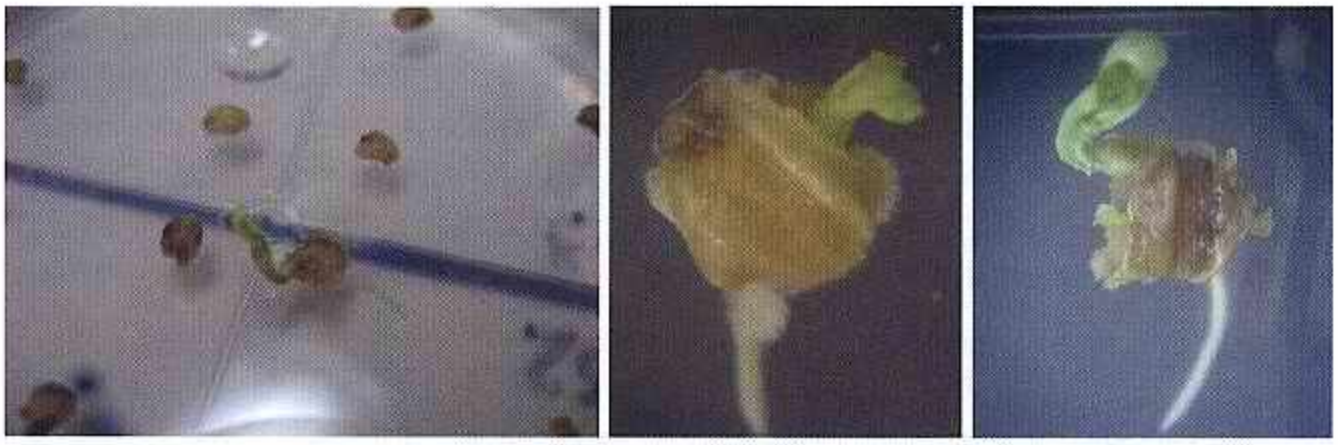


Figura 19.6: Germinación directamente en la antera de plántulas androgénicas en cultivos in vitro de anteras de pimiento.
Imagen de Seguí Simarro.

de cultivo in vitro. Además, esta técnica cuenta con la ventaja añadida de que durante las primeras etapas de desarrollo, los tejidos aún vivos de la antera continuarán secretando al medio una serie de sustancias que favorecen el crecimiento, o al menos la viabilidad de las microsporas. Esto permite que a la hora de diseñar un medio de cultivo para anteras, no sea de vital importancia el refinar su composición al máximo, pues siempre se contará con el aporte y el efecto modulador de los tejidos de la antera.

Sin embargo, el cultivo de anteras presenta también claras e importantes limitaciones. El hecho de que la antera esté presente en el cultivo hace posible la aparición esporádica de regenerantes provenientes de sus tejidos, somáticos y no necesariamente homozigotos. No doble haploides y no deseables, en definitiva. Estos fenómenos, inherentes a esta técnica, suponen un problema importante a la hora de traducir esta metodología experimental a una tecnología de producción, pues se hace necesaria la evaluación genética de cada regenerante de forma individual para determinar su origen y plodía, lo cual encarece y ralentiza el resultado final. Además, hay que tener en cuenta el efecto secretor incontrolable del tapetum que rodea el saco polínico de la antera. Aunque antes lo contábamos como una ventaja, no es menos cierto que también impide tener un control estricto sobre las condiciones que operan en el cultivo. Esto es especialmente importante cuando se quiere modificar la composición para tratar de mejorar algún parámetro. A esto hay que añadirle el hecho demostrado de que los cultivos de anteras tienen una eficiencia muy limitada, pudiendo obtener únicamente unos pocos embriones por cada antera cultivada.

Frente a estos problemas, surge la tecnología del cultivo de microsporas aisladas (Figura 19.7). En aquellas especies en las que los cultivos de microsporas aisladas están puestos a punto, es un método más eficiente. Al estar la microspora directamente expuesta a las condiciones del medio de cultivo, el efecto de este sobre la microspora será mucho más directo y rápido. En cambio, en los cultivos de anteras los componentes del medio se han de difundir pasivamente a través de los distintos tejidos de la antera hasta alcanzar el interior del saco polínico donde están las microsporas, lo cual limita mucho más el acceso de las microsporas a los nutrientes. Pero sobre todo, la principal ventaja de los cultivos de microsporas es que evitan los otros problemas antes citados para los

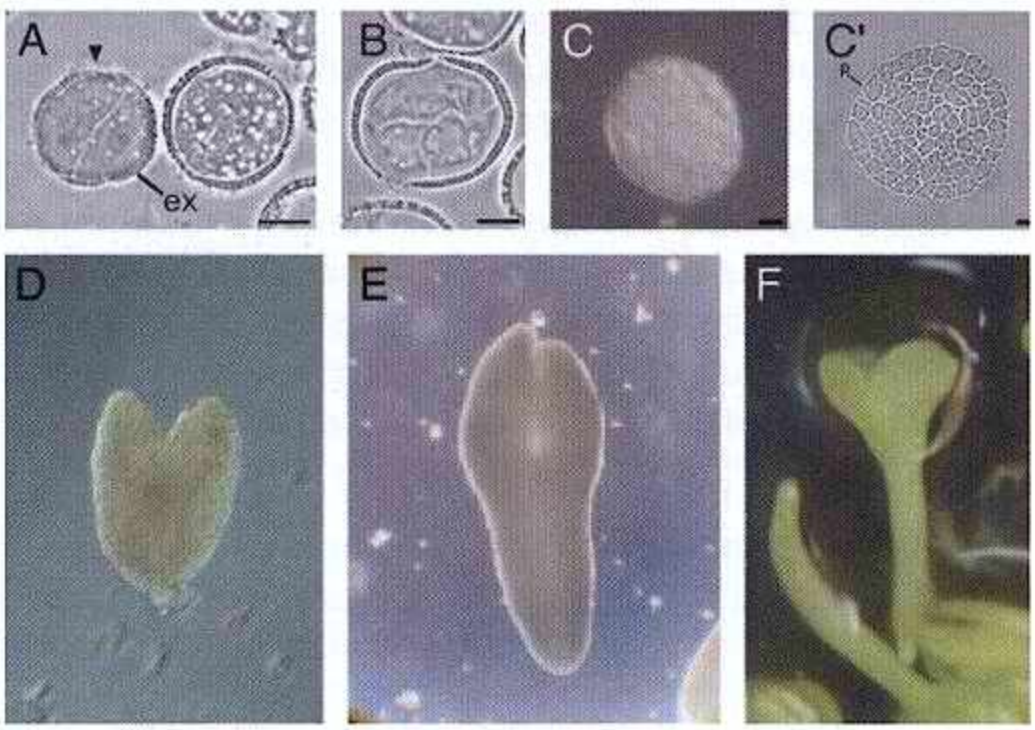


Figura 19.7: Las diferentes etapas del cultivo in vitro de microsporas aisladas y desarrollo de los embriones androgénicos en colza.
Imagen de Seguí Simarro.

cultivos de anteras: la aparición de regenerantes somáticos, el efecto incontrolable del tapetum sobre las condiciones de cultivo y la baja eficiencia.

El cultivo de microsporas es un método técnicamente más exigente, lo que limita su aplicación a un rango de especies más estrecho que el cultivo de anteras. Sin embargo, en aquellas especies donde hay protocolos establecidos para cultivo de microsporas aisladas, se pueden obtener cientos e incluso miles de embriones a partir de las microsporas contenidas en una antera. Es por tanto el método de elección debido a su mayor eficiencia y rapidez para obtener plantas haploides y/o doble haploides.

19.6.2. Factores que influyen en la inducción de embriogénesis

Los múltiples factores que influyen en que una microspora se reprograme hacia embriogénesis pueden ser englobados en tres grandes categorías:

- las condiciones de la planta donante
- las condiciones de aislamiento e inducción de la microspora
- las condiciones de cultivo.

19.6.2.1. Condiciones de la planta donante

De entre las características de la planta donante de microsporas, el genotipo es, con diferencia, la más importante. El genotipo de cada especie determina que haya sistemas modelo, muy fácilmente inducibles, y especies sumamente recalcitrantes, en las que a día de hoy sigue siendo imposible conseguir un protocolo de obtención de doble haploides.

No solo hay diferencias entre especies. También las hay dentro de una misma especie. En prácticamente todas las especies estudiadas hasta ahora es habitual ver respuestas muy diferentes entre los diferentes cultivares ensayados. Incluso dentro de las especies modelo, el genotipo tiene una fuerte influencia, habiendo cultivares de alta respuesta y otros de nula respuesta dentro de la misma especie. Es el caso, por ejemplo, de los cultivares 'Topas' (altamente embriogénico) y 'Westar' (no embriogénico en absoluto) de *Brassica napus*. Este hecho, junto con la demostración de que la competencia androgénica puede ser heredada por los descendientes, revela una clara base genética para este caracter, y por tanto la posibilidad de seleccionar a favor de este rasgo.

Además, del genotipo, se han descrito otros parámetros experimentales que tienen una cierta influencia a la hora de que las microsporas extraídas de la planta donante sean inducidas o no a embriogénesis. Estos factores son:

- *la edad de la planta*. En general, conforme la planta va envejeciendo pierde potencial androgénico.
- *las condiciones de crecimiento* de la planta:
    - *temperatura*
    - *fotoperiodo*
    - *tipo y cantidad de nutrientes*
    - *tipo de cultivo* (en campo, invernadero o cámara)
    - *estación del año* en que las plantas presentan mayor potencial androgénico.

19.6.2.2. Condiciones de aislamiento e inducción de la microspora

De entre las condiciones de aislamiento e inducción, la más importante con diferencia es el estadio de desarrollo que presente la microspora en el momento de ser puesta en cultivo (directamente o indirectamente dentro de la antera). La etapa del desarrollo microgametofítico más sensible a la inducción de embriogénesis es justo la transición entre el final de la microsporogénesis y el comienzo de la microgametogénesis. Como regla general, se acepta que las microsporas jóvenes y el polen maduro no pueden ser inducidos. Para la mayoría de las especies, el único período de sensibilidad a los tratamientos de inducción gira en torno a la transición de las microsporas vacuoladas hacia polen joven, recién dividido. En otras palabras, la ventana de inducción está alrededor de la primera mitosis de polen. Sin embargo, este hecho está todavía sujeto a un cierto grado de debate.

En especies no modelo, donde la inducción es más difícil de lograr, el rango de etapas inducibles es más estrecho, y la mayoría de los estudios realizados apoyan la idea de que la etapa inducible es la microspora tardía, vacuolada, cuando la microspora está lista para dividirse de forma asimétrica y dar lugar al grano de polen. Por otra parte, algunos laboratorios sostienen que para ciertas especies las mayores eficiencias se dan con polen temprano, recién dividido.

El pimiento (*Capsicum annuum*) es un buen ejemplo de esta discrepancia. Además, en varios cultivos, incluyendo especies modelo como la colza, también se ha logrado la inducción en etapas posteriores, incluso en polen medio. Por lo tanto, aunque no hay un consenso universal sobre el comienzo exacto y el final de la ventana idónea para la reprogramación de la microspora, parece ser que la microspora vacuolada y en algunos casos el polen bicelular joven es especialmente adecuado para ser inducido. Esto probablemente se deba a su estado proliferativo, reversible, todavía no completamente diferenciado. En el polen maduro, donde se activa un programa irreversible de expresión génica específico de maduración del polen, ya no es posible en ningún caso inducir la embriogénesis.

En cuanto a las características inherentes a la microspora en el momento de ser puesta en cultivo, también parecen tener cierto papel en la inducción la posición que ocupaba en la planta la inflorescencia de la que se obtienen las microsporas, y la posición de la yema dentro de la inflorescencia.

Además, hay otra serie de factores relacionados con la eficiencia de la inducción, que tienen que ver con las condiciones del medio en el que las microsporas se inducen. Nos referimos a la aplicación de tratamientos inductores a las microsporas, bien sea estando todavía en la inflorescencia, en la yema floral, en la antera, o bien ya aisladas de la antera y puestas en cultivo. Una vez que la microspora está en el momento oportuno, se debe aplicar un tratamiento de inducción adecuado. En la actualidad existe un amplio consenso sobre cómo deben ser este tipo de tratamientos: estresantes. Si algo parece claro en este proceso, todavía poco conocido, es que la microspora ha de ser estresada, en mayor o menor grado según la especie, para que ésta responda desviándose de su ruta normal de desarrollo. Las microsporas deben ser sometidas a un conjunto de factores físico-químicos que promuevan una respuesta de estrés, que a su vez, provocará la respuesta embriogénica.

En cuanto al tipo concreto de agentes inductores, los hay de muchos tipos. De entre los factores más común y exitosamente utilizados destacan el frío, el choque térmico y el ayuno (de fuente de carbono y/o de nitrógeno). Además están la centrifugación, el estrés osmótico (sacarosa, manitol, otros agentes osmóticos no metabolizables), condiciones anaerobias, el etanol, la colchicina y en general los inhibidores de ciclo celular. De todos modos, a la hora de desarrollar un protocolo adecuado para una especie en concreto, será necesario probar varios de ellos, y en diferentes cantidades y combinaciones, pues cada especie puede requerir combinaciones particulares.

19.6.2.3. Condiciones de cultivo

Junto con el genotipo y el estadio de desarrollo de la microspora, el tercer factor crítico para la inducción son las condiciones de cultivo. Es decir, el entorno físico-químico necesario para que, una vez inducida, la microspora pueda desarrollarse y transformarse adecuadamente en embrión y este en una planta.

De entre los múltiples factores que influyen en el cultivo in vitro, en este caso cabe destacar:

- el tipo de fuente de carbono (sacarosa, glucosa, maltosa, almidón)
- temperatura
- luz (intensidad, calidad y fotoperiodo)
- densidad de anteras/microsporas
- acondicionamiento previo o simultáneo de medio con tejidos (o extractos) procedentes de la misma u otra especie: ovarios, anteras o tejidos somáticos.
- medio base de cultivo (micronutrientes, macronutrientes, vitaminas y sus combinaciones).
- concentración y combinaciones de reguladores del crecimiento (fitohormonas).

A pesar de la relevancia que las distintas fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas) tienen en general en el cultivo in vitro, el papel de las hormonas en este proceso parece ser menos crítico para la inducción. Según algunos autores, la importancia relativamente baja de las hormonas en la embriogénesis de microsporas se debe a que la autotrofía hormonal es una condición inherente a la embriogénesis zigótica, a la cual este proceso es muy semejante.

19.6.3. Cambios en la microspora embriogénica

Una vez expuestas al tratamiento de inducción, las microsporas tienen varias alternativas de desarrollo (Figura 19.8). Muchas de ellas detienen su crecimiento y/o mueren. Algunas microsporas adoptan un tipo de desarrollo semejante al del grano de polen, aumentando mucho de tamaño y acumulando almidón en grandes cantidades. Sin embargo, no llegan a dividirse para formar las células vegetativa y generativa, y tarde o temprano acaban degenerando y muriendo.

Otras son efectivamente inducidas por el tratamiento de estrés y sufren un gran número de cambios hasta convertirse en embriones. Estos cambios se dan a diferentes niveles, desde la arquitectura celular a gran y pequeña escala, hasta la expresión génica. A gran escala, el núcleo se reposiciona en el centro de la célula, se reordenan los distintos elementos nucleares y del citoesqueleto, y se fragmenta la gran vacuola central.

19.6.4. Cambios en la expresión génica

En cuanto a la expresión génica, se ha identificado una gran cantidad de genes, proteínas y metabolitos como directa o indirectamente relacionados con la reprogramación a embriogénesis. En muchas ocasiones estos genes se han

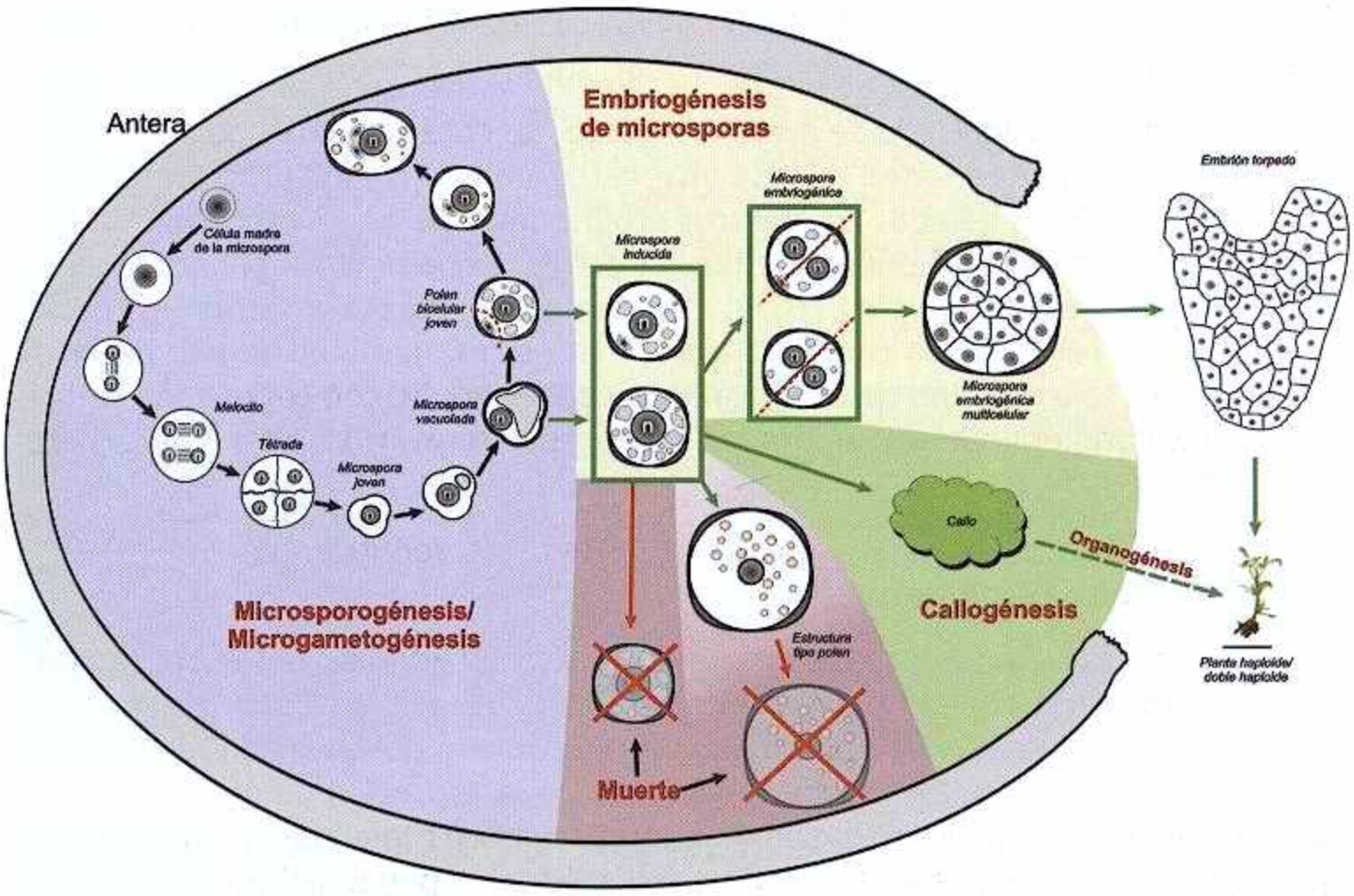


Figura 19.8: Distintas vias de reprogramación del desarrollo gametofítico de la microspora/polen (ruta 0) hacia androgénesis. La ruta 1 ilustra la formación de un individuo haploide mediante la fecundación de la célula huevo y posterior inactivación del genoma del núcleo femenino. La ruta 2 ilustra las diferentes etapas de la embriogénesis (o en algunos casos callogénesis) a partir de microsporas. La ruta 3 ilustra la formación de doble haploides, junto con otra serie de individuos no doble haploides, indeseados, a través de la organogénesis sobre callos derivados de meiocitos. Ver el texto para más información.
Imagen adaptada de Seguí-Simarro y Nuez 2008 (ver Sección 19.11 Información adicional).

propuesto como los auténticos "interruptores" capaces de activar, a nivel molecular, la inducción a embriogénesis. Sin embargo, en los últimos años se está llegando a la conclusión de que la reprogramación de la microspora no es un carácter genético monogénico, sino que parece el resultado de la coincidencia en el tiempo y el espacio de una serie de factores inductores, diferentes para cada especie. Estos factores, los vistos en la sección 19.6.2., provocan en la célula una serie de cambios profundos en sus perfiles de expresión génica que son los que finalmente acaban promoviendo la embriogénesis. Los numerosos cambios observados en la expresión génica se pueden agrupar en tres categorías principales:

- respuesta celular al estrés
- supresión del programa gametofítico
- expresión del programa embriogénico.

19.6.4.1. Respuesta celular al estrés

Para generar una respuesta de estrés, la señal de estrés debe ser primero internalizada. Aunque poco se sabe a este respecto, se cree que el ácido abscísico y las MAP quinasas intervienen en esta internalización activando programas específicos de expresión génica. Entre estos programas destaca la expresión de una serie de proteínas de respuesta celular al estrés, denominadas genéricamente *proteínas de choque térmico* (*HSP*). Se cree estas proteínas tienen un papel citoprotector relacionado con la tolerancia al estrés. También se han descrito aumentos en la expresión de otros genes relacionados con la protección frente al estrés oxidativo generado por las condiciones de cultivo in vitro Estos genes codifican para la catalasa y la glutatión transferasa.

19.6.4.2. Supresión del programa gametofítico

Aparte de activar el programa embriogénico, la célula debe cancelar el programa gametofítico. El bloqueo de la síntesis de almidón (un marcador de maduración del polen) y la eliminación de las reservas de almidón parecen ser eventos clave en este proceso. De hecho, se ha descrito la represión de genes implicados en la biosíntesis y acumulación de almidón en microsporas de cebada recién inducidas, junto con la activación de genes relacionados con la movilización de almidón y sacarosa. En paralelo, se cree que se activa un programa específico de desdiferenciación celular que eliminaría del citoplasma aquellas moléculas (proteínas, ARN mensajero) relacionadas con la microgametogénesis.

19.6.4.3. Expresión del programa embriogénico

La primera indicación del inicio del programa embriogénico es que las microsporas se dividen siguiendo un patrón simétrico, en lugar de la división asimétrica que define la primera mitosis del polen (comparar las microsporas de la ruta de "microgametogénesis" y las de la ruta de la "embriogénesis de microsporas" en la Figura 19.8). En la mayoría de los sistemas androgénicos, a la primera división le sigue una etapa de proliferación celular, en la que las divisiones están orientadas al azar, dando lugar a una masa globular indiferenciada de células embrionarias, en contraste con el patrón ordenado de división de los embriones zigóticos. A partir de este estadio, la morfología del embrión derivado de microsporas va aproximándose progresivamente a la del zigótico. Con carácter excepcional y gracias a un control más estricto de la temperatura de inducción, en un sistema modelo como la colza ha sido posible reproducir recientemente todas las fases que se suceden durante el desarrollo del embrión zigótico, incluida la formación del suspensor, que en general está ausente de los embriones derivados de microsporas (Figura 19.9). Esta posibilidad hace que en este caso concreto la embriogénesis de microsporas pueda servir como sistema modelo para el estudio del desarrollo embriogénico in vitro, sin la interferencia del tejido materno, pues como hemos visto, en colza la embriogénesis zigótica y la androgénica presentan un gran número de semejanzas (comparar Figuras

19.9A-F y 19.9.G-K). Otros aspectos del programa embriogénico también son similares entre embriones derivados de microsporas y zigóticos, pero no iguales. Tal es el caso de la regulación hormonal, entre otros aspectos. Se ha demostrado que reguladores del crecimiento como el etileno, el ácido indolacético (IAA) o el ácido abscísico (ABA) son importantes para ciertos aspectos del desarrollo del embrión derivado de microsporas, al igual que sucede con la embriogénesis zigótica.

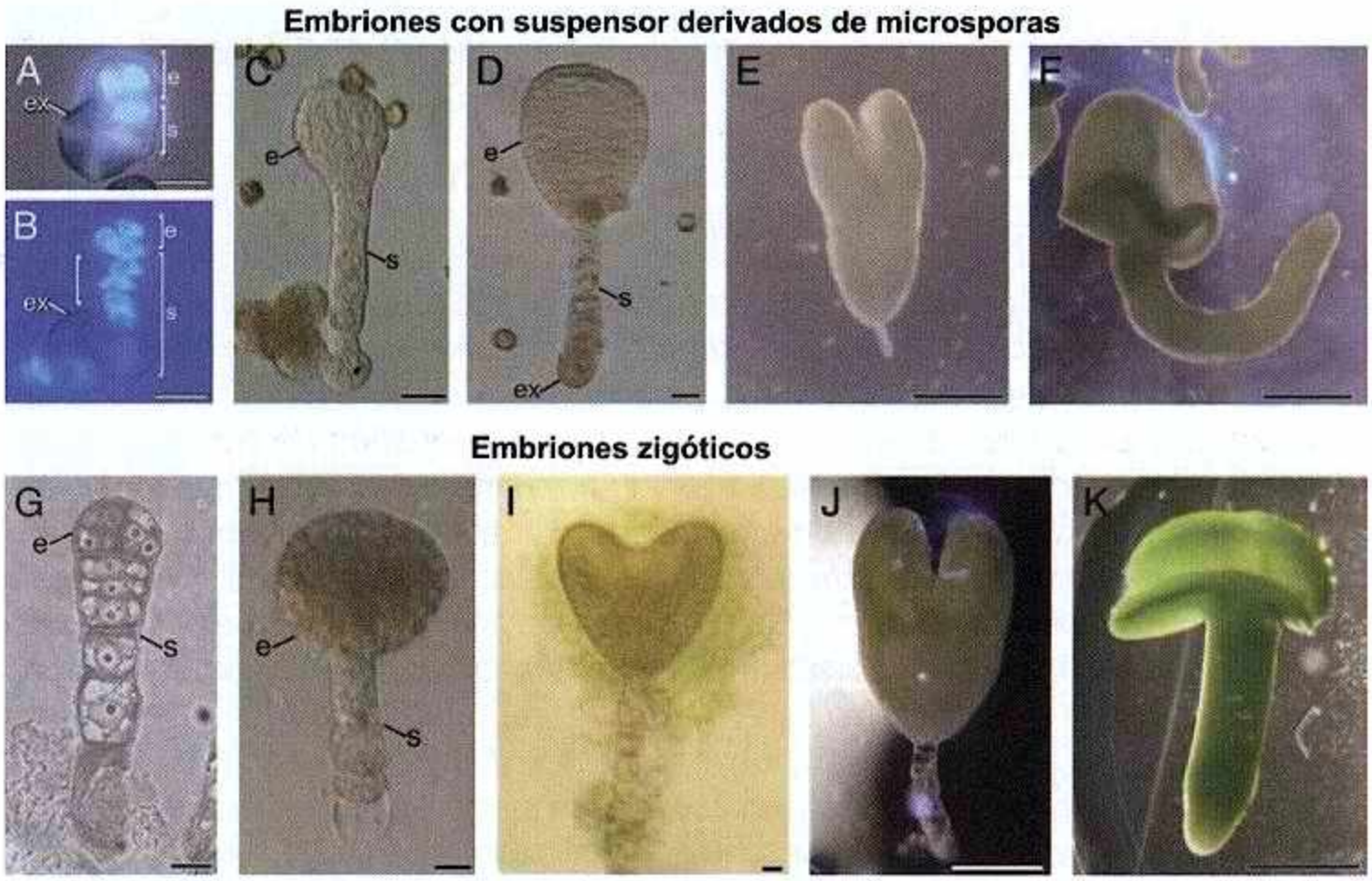


Figura 19.9: Comparación entre las distintas etapas del desarrollo del embrión androgénico de colza obtenido mediante técnicas recientes de cultivo de microsporas aisladas (A-F) y el desarrollo in vivo del embrión zigótico de esta misma especie (G-K).
Imagen de Seguí Simarro.

En algunas especies, la complejidad de sus requerimientos nutricionales u hormonales hace que no sea posible reproducir un desarrollo embriogénico adecuado, y la proliferación celular de las primeras fases no tiene continuidad en la diferenciación de un embrión, sino que esta continúa para dar lugar a un callo indiferenciado. Se cree que esta vía de desarrollo alternativa tiene que ver con una deficiente regulación de la diferenciación, atribuible a la ausencia de endospermo en este tipo de embriogénesis. El endospermo es una fuente de señales regulatorias. En su ausencia, no es de extrañar que la embriogénesis no se desarrolle correctamente. No obstante, también se puede conseguir regenerar plantas doble haploides a partir de este tipo de callos haploides o doble haploides (Figura 19.8, ruta "callogénesis"). De hecho, se ha conseguido en una amplia gama de especies, incluyendo el café, el níspero, diferentes

especies de álamo, cereales como el centeno o especies silvestres de cebada, y diversas plantas ornamentales como el lirio, el narciso, el clavel, la anémona o el crisantemo.

19.6.5. Panorama actual de la embriogénesis de microsporas

La revisión más exhaustiva del número de especies en las que se han conseguido protocolos reproducibles para la inducción de embriogénesis de microsporas data de 2003. En esta revisión se contabilizan hasta 250 especies distintas, incluyendo muchas especies de interés agronómico. Por ejemplo cultivos herbáceos como el trigo, la cebada, el arroz, la colza, el tabaco o el maíz, o frutales como el mandarino o el alcornoque, entre otros.

De entre todas estas especies potencialmente inducibles hacia embriogénesis de microsporas, algunas de ellas presentan una respuesta androgénica excelente. Nos referimos a la colza (*Brassica napus*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), la cebada (*Hordeum vulgare*) o el trigo (*Triticum aestivum*). Pero no todos los cultivos de interés responden con la misma eficiencia a la inducción de embriogénesis. Sólo en algunos de ellos (los antes citados) el potencial androgénico es lo suficientemente alto como para obtener un número de embriones y plantas doble haploides suficiente para ser utilizados en programas de mejora. Estas especies son consideradas como sistemas modelo. Otros cultivos tienen respuestas muy variables. Por ejemplo, los cereales, más allá de especies modelo como cebada o trigo, suelen mostrar en general respuesta androgénica, mayor o menor según la especie. Tal es el caso del centeno, el triticale, el arroz, la avena o el maíz. Sin embargo, otras especies científica o económicamente interesantes como Arabidopsis o tomate siguen siendo muy recalcitrantes a la inducción de embriogénesis de microsporas. Algo semejante ocurre en general con las cucurbitáceas. Sus requerimientos para ser inducidas son al parecer tan complejos que a día de hoy se siguen sin conocer exactamente.

A mitad de camino entre las especies modelo y las especies muy recalcitrantes, muchas otras están aún lejos de una respuesta aceptable. Este es el caso de las especies leñosas, donde la inducción de embriogénesis de microsporas solo se ha conseguido en un reducido número de especies, como el manzano, el mandarino, el naranjo, el alcornoque, el olivo o el níspero. Paradójicamente, es en estas especies donde estas técnicas serían especialmente ventajosas para los programas de mejora, fundamentalmente por el tiempo que se necesita en estas especies de crecimiento tan lento para obtener líneas puras por métodos convencionales. En las gimnospermas, el éxito es aún más reducido. Se han conseguido embriones en algunos casos, pero no la regeneración de plantas completas.

El caso de las solanáceas es un buen ejemplo de diversidad de respuesta entre especies relacionadas. Así, uno de los sistemas modelo mejor conocidos es el tabaco, que responde magníficamente tanto al cultivo de anteras como al de microsporas. Aunque con menor eficiencia, la patata (*Solanum tuberosum*)

también responde a ambas técnicas. A mitad de camino están la berenjena (Figura 19.5) y el pimiento, que responden al cultivo de anteras con una eficiencia moderada pero suficiente para ser utilizada la técnica en programas de mejora. Sin embargo, todavía no se ha conseguido poner a punto un método eficiente de cultivo de microsporas aisladas. En una situación semejante en cuanto a respuesta androgénica está *Datura innoxia*, la primera especie en que la embriogénesis de microsporas fue descrita. En el otro extremo estaría el tomate y muchas de sus especies relacionadas, en las que pese a los muchos esfuerzos realizados, todavía hoy no se conoce cómo hacer que respondan a la embriogénesis de microsporas.

19.7. Callogénesis derivada de meiocitos

Esta tercera ruta de obtención de haploides y doble haploides androgénicos es una ruta rara, mucho menos frecuente y documentada que la embriogénesis de microsporas. En esta ruta, bajo las condiciones adecuadas in vitro, es posible inducir a los meiocitos, siempre que hayan pasado ya por la recombinación, a proliferar en forma de callos. Una vez obtenidos los callos, haploides o doble haploides, se pueden regenerar de ellos plantas haploides y doble haploides mediante embriogénesis indirecta o a través de organogénesis sobre los callos (Figura 19.4, ruta 3). Esta vía se ha descrito como inducible en meiocitos inmaduros de *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, y *Digitalis purpurea*, aunque estos estudios pioneros nunca se continuaron. Sin embargo, la mayoría de los datos disponibles acerca de este proceso provienen de la investigación en tomate (Figura 19.10). Dada la extraordinaria importancia de este cultivo en todo

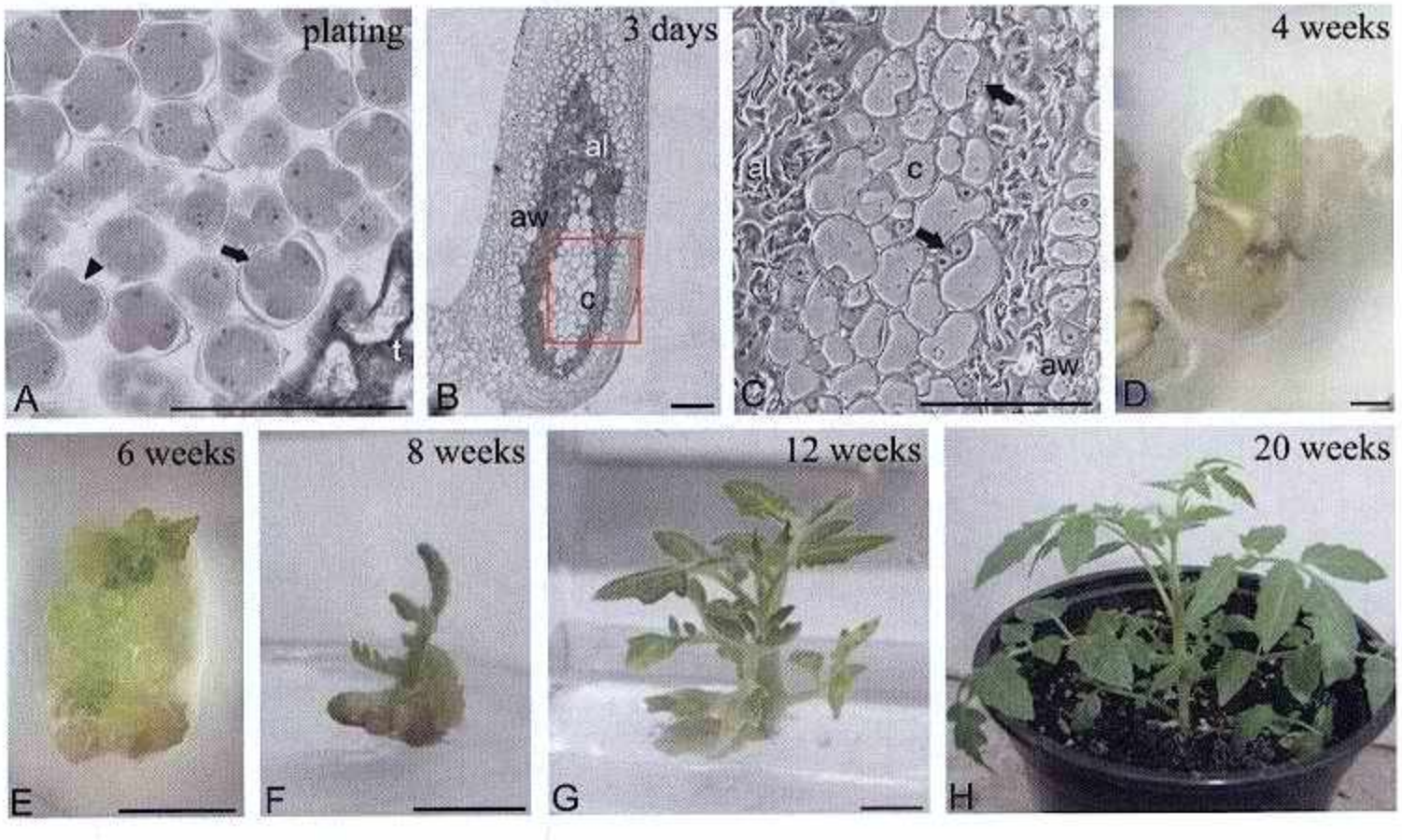


Figura 19.10: Inducción de callogénesis a partir de meiocitos de tomate cultivados in vitro dentro de la antera, y regeneración de plantas androgénicas mediante organogénesis.
Imágenes de Seguí Simarro.

el mundo, muchos laboratorios han trabajado en las últimas cuatro décadas tratando de inducir haploides a partir de anteras de tomate. Su extrema recalcitrancia ha impedido obtener haploides o doble haploides por vías más convencionales como la embriogénesis de microsporas. Por ello se han explorado otras vías alternativas como esta. De hecho, las pocas especies en las que esta ruta se ha documentado son curiosamente de las más recalcitrantes a la embriogénesis de microsporas. Esto quiere decir que es muy posible que si se estudiaran otras especies, por ejemplo los sistemas modelo para la embriogénesis de microsporas, se pudiera observar también este fenómeno. Simplemente no se han estudiado porque funciona directamente la opción más fácil y conocida, la embriogénesis de microsporas.

En esta ruta también hay una serie de factores que influyen en su éxito. De entre ellos, los más críticos parecen ser el genotipo y la etapa de desarrollo. Al igual que en las otras dos formas de haploidía androgénica, el genotipo juega un papel importante. En particular, las líneas mutantes con esterilidad masculina han demostrado ser especialmente sensibles a ser inducidas. La etapa de desarrollo inducible ha sido un tema de debate desde hace décadas, pero hoy en día parece estar claro son los meiocitos, entre la profase meiótica I y la telofase II, antes de convertirse en tétradas de microsporas.

Después de la inducción, los callos derivados de los meiocitos pueden originarse por dos vías diferentes, que implican:

1. que todas las células del callo provienen de un mismo producto meiótico haploide que, todavía encerrado en la tétrada, detiene su programa gametofítico y comienza a proliferar. En este caso, el callo y la planta obtenida de él sería haploide o doble haploide.

2. a partir de la fusión de dos productos meióticos haploides, separados por paredes celulares defectuosas o incompletas. En este caso, producto de la fusión obtendríamos una célula diploide, no genéticamente homogénea, pues procede de la fusión de dos núcleos que han sufrido eventos de recombinación diferentes, que generan nuevas combinaciones de alelos no necesariamente homozigotas. Es decir, estaríamos ante un diploide, no un doble haploide.

La aparición de plantas no doble haploides, indeseables, es una limitación de este método que hay que añadir a su baja eficiencia. Pero no es la única. Además de callos derivados de meiocitos, no se puede descartar la posibilidad de que se originen callos diploides, somáticos, procedentes del tejido conectivo de las paredes de la antera o de su filamento. Todos estos eventos indeseables obligan al análisis individual de cada regenerante obtenido para estar seguro de su origen y de su grado de homozigosis. Esto obviamente compromete la utilidad de este método con fines prácticos.

Se podría argumentar que esta vía no es lo suficientemente diferente de la embriogénesis de microsporas como para ser considerada como una vía distinta. De hecho, se pueden formar callos en ambos casos de inducción in vitro, y es

probable que un mejor conocimiento de este proceso y sus particularidades lo hagan aún más similar a la embriogénesis de microsporas. Sin embargo, las marcadas diferencias en las etapas inducibles en cada caso tienen profundas repercusiones en el resultado final de cada proceso. En particular, el hecho de que el meiocito sea la etapa inducible implica que por esta vía, los haploides o doble haploides androgénicos no sean el único producto final. Además de ellos, pueden aparecer diploides también androgénicos, pero con diferentes combinaciones alélicas en heterozigosis que los harían genéticamente distintos y por tanto inservibles como líneas puras. Así, parece razonable considerar que en la actualidad, con el conocimiento actual acerca de este proceso, esta ruta es distinta de la embriogénesis de microsporas.

A la luz de los datos actuales, es evidente que desde un punto de vista aplicado o económico, la utilidad de esta vía está muy lejos de la de la embriogénesis de microsporas, sobre todo debido a su baja eficiencia en términos de obtención de doble haploides. Sin embargo, es importante en términos biológicos, ya que refleja que la totipotencia de los gametofitos masculinos no se limitaría a la fase de microspora vacuolada y polen bicelular joven, como es generalmente aceptado. Este hecho, junto con otras evidencias, sugiere que la investigación en este y otros procesos similares podría ampliar el conocimiento que tenemos hoy en día sobre la totipotencia de la línea germinal masculina y la plasticidad de su desarrollo.

19.8. La duplicación del genoma haploide

En la sección 19.2 veíamos que lo realmente útil desde un punto de vista aplicado no es la obtención de un individuo haploide, sino doble haploide. Veíamos también que en algunos casos esto se consigue sin hacer nada específico para provocarlo. En otros muchos casos, es necesario un tratamiento específico que lo provoque.

Durante la androgénesis, la duplicación puede producirse a través de dos mecanismos principales: *endorreduplicación*, y *fusión nuclear* (Figura 19.11). Esta situación es algo distinta de la de la duplicación de las cromátidas durante la fase S del ciclo celular normal de las plantas (Figura 19.11, ruta A). También difiere de otros eventos de duplicación del genoma que se dan durante el ciclo vital de las plantas superiores, en los que el mecanismo en la mayoría de los casos es la endorreduplicación. La endorreduplicación (Figura 19.11, ruta B) consiste en la salida de ciclo celular de ciertas células diferenciadas, especializadas en una determinada función celular, que se instalan en una fase S reiterativa que tiene como consecuencia la duplicación de su genoma durante sucesivas rondas. De este modo, una célula inicialmente diploide acaba siendo poliploide, sin pasar por el resto de fases del ciclo celular. En la mayoría de los casos, estas células nunca vuelven a entrar en ciclo, y permanecen así hasta el momento de su muerte.

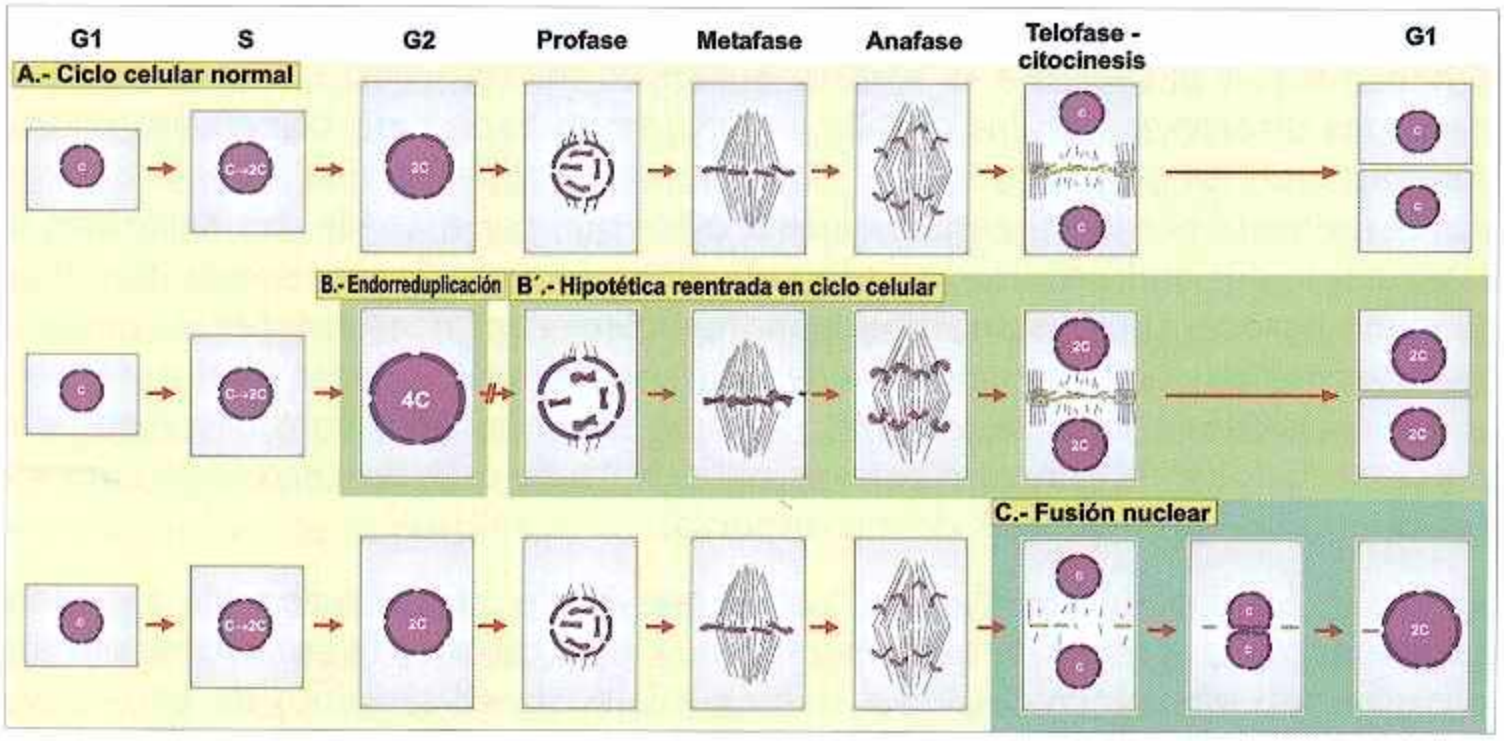


Figura 19.11: Comparación entre Un ciclo celular normal (A), la endorreduplicación (B) y la fusión nuclear (C) como mecanismos celulares para la duplicación del genoma haploide. Imagen de Seguí Simarro.

Poco después del descubrimiento de la inducción experimental de la androgénesis, los datos existentes llevaron a muchos investigadores a pensar que la endorreduplicación también podría ser el mecanismo principal durante la androgénesis, en un proceso por el cual tras la duplicación, la célula duplicada podría de algún modo volver a entrar en ciclo celular. Sin embargo, en la actualidad se tiende a pensar que en realidad el genoma se duplica debido a fusiones nucleares (Figura 19.11, ruta C). En la última década, el uso de técnicas microscópicas modernas, junto con la disponibilidad de protocolos para inducir la androgénesis en diversas especies, ha permitido la documentación de multiples eventos de fusión nuclear (Figura 19.12), y ha proporcionado sólidas pruebas de que este es el mecanismo predominante, si no único. Es probable que a medida que más especies se estudien en detalle, más ejemplos de fusión nuclear se muestren.

La duplicación de los cromosomas está muy influida por el entorno físico-químico de los cultivos in vitro. Esta es la causa de la duplicación no inducida, "espontánea", que se observa en algunos individuos. Pero siempre hay un porcentaje que no es sensible a estas mismas condiciones y permanece haploide. Es conocido que cada especie presenta una propensión mayor o menor a la duplicación durante la etapa de inducción o durante el desarrollo del embrión haploide, sin necesidad de aplicar tratamientos específicos para ello. Esta propensión varía enormemente entre especies, y también entre genotipos de una misma especie. Por ejemplo, en distintos genotipos de maíz la tasa de duplicación no inducida puede oscilar entre el 0 y el 21,4%, y en colza entre el 10 y el 40%. Excepcionalmente, en algunos cultivares élite de cebada esta tasa puede ser lo suficientemente alta (hasta el 87%) como para no haber necesidad de plantearse tratamientos adicionales de duplicación. Pero por lo general, es necesario plantearlos.

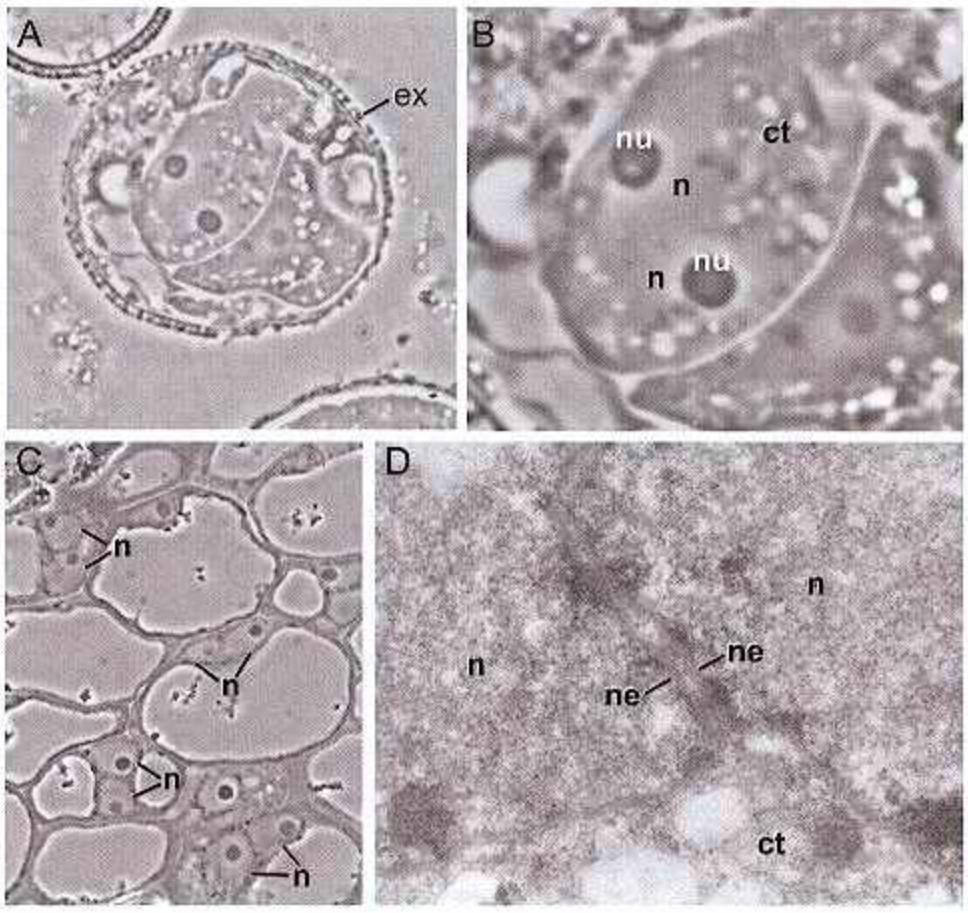


Figura 19.12: Fusión nuclear en microsporas de colza inducidas a embriogénesis (A y B) y en callos androgénicos derivados de meiocitos de tomate (C y D). En A-C claramente se pueden ver dos núcleos (n) contiguos, dentro de un mismo citoplasma, y en D se observan dos envolturas nucleares (ne) de dos núcleos contiguos, próximos a fundirse en uno solo.
Imágenes de Segui Simarro.

Para aquellas plantas (dicotiledóneas principalmente) que no duplican o lo hacen a una tasa muy baja, la aplicación de *colchicina* a la planta haploide ha sido utilizada con éxito para convertir haploides en doble haploides en una gran diversidad de especies. La colchicina presenta un potente efecto antimitótico. Se trata de un desestabilizador de los microtúbulos que cuando actúa sobre los del *fragmoplasto* (el armazón que sostiene la placa celular en formación) impide el correcto desarrollo de la citocinesis. De este modo se crean paredes celulares defectuosas, incompletas, con multitud de agujeros por los que los núcleos de las células hermanas, no separadas del todo, pueden llegar a juntarse y fundir sus envolturas. En esto consiste la fusión nuclear, y de este modo la colchicina la favorece. No obstante, no podemos olvidar que por esta misma razón, la colchicina es también altamente citotóxica. Por ello hay que evaluar previamente en qué momento hay que aplicar la droga (directamente sobre las microsporas desde el inicio del cultivo, durante el desarrollo de los embriones, sobre la plántula recién germinada o sobre yemas axilares de la planta haploide, una vez regenerada y aclimatada) y en qué dosis, para conseguir un compromiso óptimo entre duplicación y citotoxicidad (y aparición de niveles de ploidía no deseables).

En algunos casos no se consigue el efecto deseado con la colchicina (por falta efecto en la duplicación o por exceso de toxicidad). Para estos casos se suelen utilizar otra serie de sustancias, menos comunes, pero también utilizadas con éxito, aunque en un rango más reducido de especies. Entre ellas

cabe mencionar el *manitol* (utilizado sobre todo en cereales, presenta también cierto efecto promotor de la androgénesis), la *orizalina* o herbicidas como el *trifluralin* o el *amiprofos-metil* (APM). Estas tres últimas sustancias son antimitóticos como la colchicina, pero tienen la ventaja de que ejercen su efecto a concentraciones mucho menores que la colchicina, con lo que el efecto tóxico se reduce notablemente. De hecho, en colza, las tres sustancias se han demostrado tan efectivas como la colchicina, aunque mucho menos tóxicas.

Si las anteriores tampoco resultan efectivas, existe un tercer grupo de factores también descritos como útiles, aunque en un rango de especies aún más reducido. Sería por tanto una tercera opción, a valorar solo en caso de ser necesaria. Por ejemplo, el uso de *óxido nítrico*, aunque algo controvertido en dicotiledóneas, ha dado también resultados satisfactorios en monocotiledóneas. Otros agentes, en este caso físicos son las *radiaciones X* o *gamma*, o los *tratamientos térmicos* (frio o calor). También ha sido descrita la influencia en la tasa de duplicación de ciertos factores epigenéticos tales como las condiciones de cultivo (composición y duración especialmente), la presencia de determinadas hormonas (especialmente auxina), y el estadio de la microspora al ser aislada.

19.9. Técnicas de análisis de los callos y regenerantes androgénicos

A lo largo de este tema hemos visto que en muchas ocasiones es necesario analizar los callos obtenidos, y los regenerantes que de ellos se obtienen. En primer lugar, para determinar si estamos ante un auténtico doble haploide (el objetivo buscado) o ante un haploide al que habría que duplicar su genoma. Para este tipo de análisis habría que utilizar técnicas de análisis de la ploidía. En segundo lugar, es necesario en muchos casos (por ejemplo en los regenerantes obtenidos de cultivos de anteras) distinguir entre un verdadero doble haploide y un diploide. En ambos casos la ploidía es la misma, y las técnicas de análisis de la ploidía resultan insuficientes para este fin. Para ello hay que optar por técnicas capaces de distinguir entre homocigotos y heterocigotos para un determinado marcador genético. Nos estamos refiriendo a las técnicas de análisis mediante marcadores moleculares.

19.9.1. Técnicas de análisis de la ploidía

Existen varias formas de determinar la ploidía de una célula. Tradicionalmente se ha venido determinando mediante métodos citogenéticos basados en la observación al microscopio óptico de de muestras teñidas con tinciones específicas de ADN como el DAPI, Feulgen, acetocarmin, etc. De este modo, una vez teñida la muestra se buscan células en división, concretamente en metafase (Figura 19.13), donde los cromosomas están en su estado máximo de condensación, y directamente se cuentan los cromosomas. Comparando el número resultante con el típico de la especie, podemos saber si la célula en cuestión es haploide, diploide o presenta ploidías superiores. Otro método también utilizado tradicionalmente es el recuento del número de cloroplastos de las células de

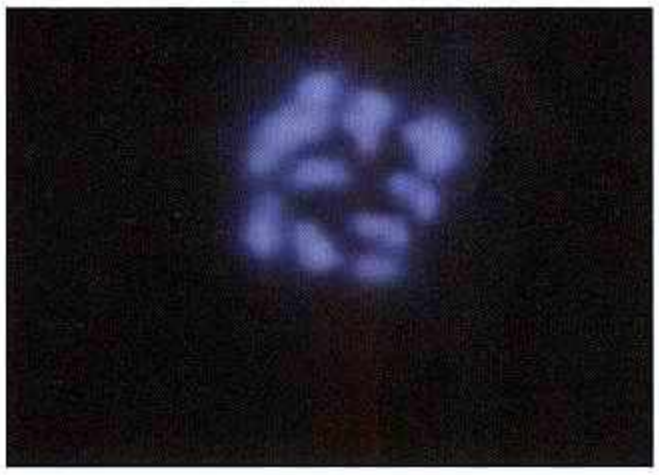


Figura 19.13: Cromosomas metafásicos de tomate teñidos con DAPI.
Imagen de Seguí Simarro.

los estomas de las hojas. Al parecer, el número de cloroplastos en estas células es directamente proporcional a la ploidía de estas células, y por tanto del individuo. Estos métodos basados en la identificación de determinadas células y su observación son bastante laboriosos, pues lógicamente no es suficiente con observar una sola célula, sino que hay que observar varias de ellas, entre 20 y 50 como mínimo. Además, en determinados tejidos no especialmente proliferantes no es fácil encontrar células en metafase, y en el caso del recuento de cloroplastos, hay que esperar a tener plantas regeneradas, con hojas, para poder estudiar sus estomas.

Otra alternativa para detectar diferencias de ploidía es el análisis de caracteres fenotípicos diferenciales. Las plantas haploides suelen presentar flores estériles, menor tamaño, y órganos por lo general más pequeños que las diploides, como vimos en la sección 19.1, debido al menor tamaño de sus núcleos. Por el mismo motivo, los individuos poliploides suelen presentar órganos más grandes y en menor número. Es lo que se conoce como *efecto gigas*. Así, podemos identificar individuos haploides tan solo observando estos caracteres fenotípicos en la planta regenerada. Sin embargo, este modo de análisis no es del todo fiable. Es bien conocido que el tamaño de una planta y de sus distintos órganos no depende únicamente de su ploidía, sino que también está claramente influenciado por las condiciones de cultivo (presencia de nutrientes en cantidad y composición adecuada, luz, temperatura, etc.). Por tanto, aunque este es un método muy sencillo, no es el más aconsejable en cuanto a su fiabilidad.

Frente a estas técnicas que requieren mucho tiempo y dedicación o que no son muy fiables, está la citometría de flujo. La citometría de flujo es un método rápido y sencillo de contar y diferenciar células y pequeñas partículas, basándose en su capacidad de emitir fluorescencia, o de asociarse con moléculas capaces de emitirla (fluorocromos). Para analizar una muestra de este modo primero hay que extraer sus núcleos, que es lo que realmente interesa analizar. En segundo lugar hay que incubarlos con un agente de tinción que sea fluorescente (para poder ser detectado), que tiña específicamente el ADN, y que lo haga de modo proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra. Las tinciones candidatas para ser utilizadas según estas premisas son todas aquellas

que se intercalen en la doble hélice de ADN y que incluyan un fluorocromo. Por ejemplo, el DAPI o el bromuro de etidio. Una vez teñido el ADN de los núcleos, solo resta detectar y cuantificar la señal. Para ello se utiliza un aparato denominado citómetro de flujo (Figura 19.14). Las muestras, una vez pasadas por el citómetro de flujo generan un histograma donde se recogen las frecuencias con las que cada núcleo, con su contenido correspondiente de ADN, pasan por el detector. Por ello, en un histograma típico tendremos dos picos principales, un primer pico correspondiente a la cantidad de núcleos en G1 detectados, y un segundo pico correspondiente a los núcleos en G2 (con el doble de ADN) detectados. Para determinar la ploidía de nuestra muestra basta con comparar el histograma obtenido con el generado, en iguales condiciones, por una muestra de ploidía conocida (Figura 19.15).

Figura 19.14: Citómetro de flujo.
Imagen de Seguí Simarro.

La citometría de flujo, en definitiva, es una técnica muy rápida y sencilla que nos permite detectar diferencias en contenido (cantidad) de ADN entre dos muestras. Pero además, la citometría de flujo nos puede dar valiosa información sobre la posible aparición de alteraciones cromosómicas (aneuploidías, etc...), típicas de muchos procesos de cultivo in vitro.

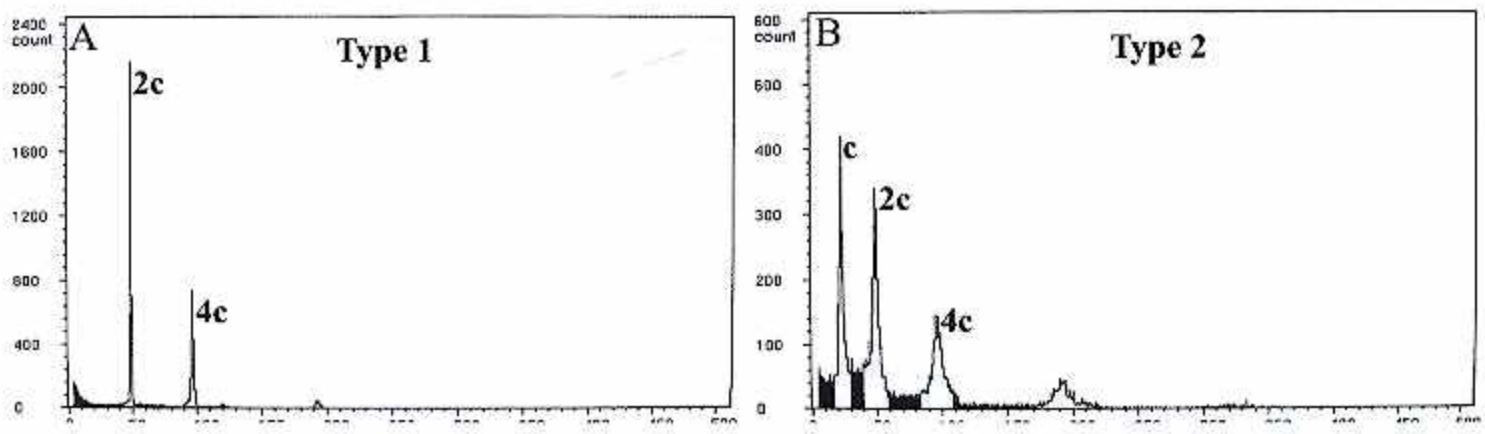


Figura 19.15: Ejemplos de histogramas obtenidos en un citómetro de flujo. A muestra los picos correspondientes a una muestra diploide de referencia, y B los correspondientes a una muestra de un callo androgénico mixoploide, con células haploides (c) y células diploides (2c).
Imagen de Seguí Simarro.

19.9.2. Análisis mediante marcadores moleculares

A pesar de las ventajas de la citometría de flujo, hay cosas para las que no sirve. Por ejemplo, para discriminar entre una muestra diploide y una doble haploide. En ambos casos el contenido total en ADN es el mismo. Por esta razón el citómetro de flujo resulta inservible. Sin embargo, esta distinción puede hacerse mediante el análisis de marcadores moleculares del tipo microsatélite.

Los microsatélites (SSR) presentan una serie de características que los convierten en los ideales para determinar inequívocamente el origen haploide de los regenerantes, independientemente de la ploidía que tengan. Esto es así porque además de ser una técnica rápida, sencilla y muy reproducible, los SSR son altamente polimórficos y presentan codominancia. El hecho de ser altamente polimórficos permite detectar secuencias diferentes en muestras genéticamente muy parecidas. La codominancia es la característica clave para poder distinguir entre haploides y doble haploides. El hecho de ser codominante significa que cuando un determinado marcador está en homozigosis, ambos alelos van a ser detectados, y no solo el dominante. Y por la inversa, si solo se detecta un alelo, es que necesariamente ha de estar en homozigosis. Aunque tradicionalmente estos y otros marcadores moleculares se han detectado mediante el análisis de las bandas de ADN separadas en geles de agarosa sometidos a electroforesis, los modernos secuenciadores automáticos permiten que esto se haga de forma mucho más rápida y masiva. En lugar de un patrón de bandas en un gel, lo que se analizan son los cromatogramas generados por el secuenciador (Figura 19.16).

Hace años, antes de que se estandarizara el uso de los marcadores moleculares, este tipo de análisis se realizaba analizando los patrones de isoenzimas de las muestras a comparar, entendiendo que cada isoenzima correspondía a una variante alélicas distinta del individuo. Pero desde que es posible utilizar los microsatélites, los patrones de isoenzimas apenas se utilizan. Además, los marcadores moleculares proporcionan información muy valiosa acerca de la generación de variación inducida por la propia técnica de cultivo in vitro de anteras o microsporas, así como de los embriones o callos androgénicos.

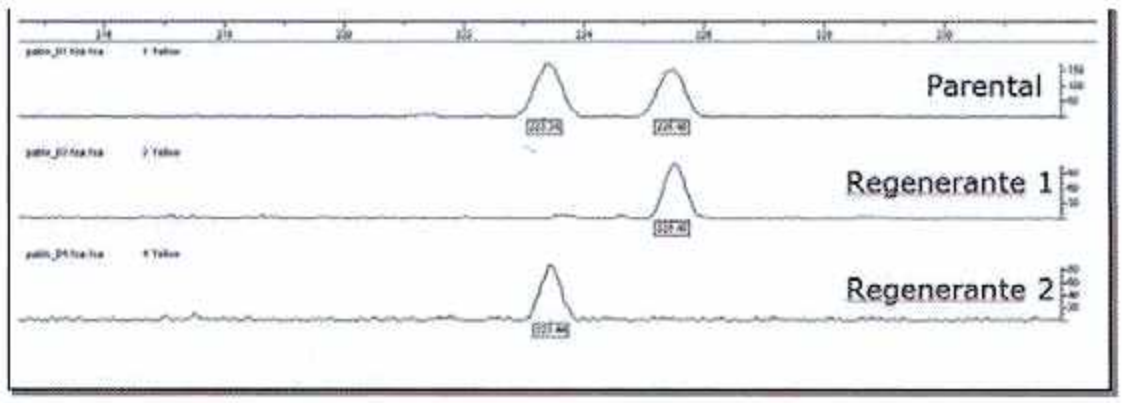


Figura 19.16: Ejemplo de cromatograma obtenido en un secuenciador automático para el análisis de dos regenerantes mediante marcadores microsatélites. En la primera carrera se muestran los dos picos correspondientes a los dos polimorfismos observados en el parental (heterozigoto), mientras que las otras dos carreras muestran que los dos regenerantes son homocigotos para ese marcador, portando cada uno de ellos uno de los dos alelos del parental.
Imagen de Seguí Simarro.

19.10. Resumen

La obtención de individuos haploides es una herramienta útil sobre todo para estudios básicos, procipalmente de tipo genético. Sin embargo, su principal ventaja es que sirven como punto de partida para obtener doble haploides. Los doble haploides son extremadamente útiles en muchos ámbitos, de entre los que destaca la mejora genética. Los doble haploides son genéticamente homogéneos, 100% homocigotos. Es decir, constituyen líneas puras, que son la base para la producción de semilla híbrida. Por tanto, la obtención de doble haploides de forma rápida y económica es un claro objetivo biotecnológico. Y aunque existen diversas vías para ello, la mejor forma posible es la inducción de la androgénesis.

La androgénesis fue originalmente definida como una forma exclusivamente masculina de partenogénesis por la cual un zigoto (un óvulo fecundado) ve inactivado su núcleo femenino antes de la cariogamia, de modo que solo permanece el núcleo masculino. De este modo se obtiene un embrión haploide que acaba formando una planta haploide de origen masculino. Esta vía androgénica, aunque está presente en la naturaleza, es extremadamente rara y muy poco es lo que se sabe sobre ella, probablemente debido a su nulo potencial de explotación comercial. Hoy en día sabemos que además de esta, existen otras vías para conseguir haploides o doble haploides androgénicos, mediante embriogénesis de microsporas y mediante la formación de callos derivados de meiocitos. Estas tres alternativas androgénicas difieren claramente en la etapa en la que es posible la inducción, pero dan lugar al mismo producto haploide o doble haploide final.

Mediante la embriogénesis de microsporas es posible obtener un individuo haploide o doble haploide de origen masculino a través de una vía de desarrollo diferente, que no implica la fecundación de la célula huevo. De hecho, consiste en el desvío del desarrollo gametofítico al nivel de la microspora vacuolada o el polen bicelular joven, recién dividido, directamente hacia un desarrollo embriogénico haploide. Esta variante androgénica tiene unas enormes posibilidades tanto en la investigación básica como aplicada. Esta técnica, aunque descrita hace más de 40 años, ha adquirido una gran importancia práctica para la industria agronómica en la última década debido a su enorme utilidad para la producción de líneas puras, homocigóticas, de forma mucho más rápida y barata que mediante técnicas clásicas de mejora genética.

Es posible inducir la embriogénesis de microsporas de dos maneras: mediante cultivo de anteras y mediante cultivo de microsporas. Cada una de ellas tiene sus ventajas e inconvenientes, aunque en aquellas especies en las que ambas técnicas están disponibles, el cultivo de microsporas es claramente la alternativa a elegir. El éxito experimental tanto en una como en otra técnica depende de una correcta combinación de un gran número de factores, que en general se podrían englobar en tres grandes categorías: las condiciones de la planta donante, las condiciones de aislamiento e inducción de la microspora, y las condiciones de cultivo. Además, de entre todos los factores, hay tres que destacan

por su especial influencia en la inducción: el genotipo de la planta donante, el estadio de la microspora en el momento del aislamiento y el tipo de tratamiento inductor que se le aplique.

Una vez inducida, la microspora sufre una serie de cambios que le llevan a reprogramarse hacia embriogénesis. Estos cambios son a tres niveles. En primer lugar, se dispara en la célula una respuesta frente al estrés celular generado por el tratamiento inducidor y la puesta en cultivo. En segundo lugar, la célula ha de suprimir toda la maquinària molecular (proteínas y ARN mensajero) que ha sido sintetizada para continuar con su desarrollo gametofítico hacia grano de polen. En tercer lugar, ha de sintetizar toda la maquinaria necesaria para pasar a desarrollarse como embrión. Todo ello implica una serie de cambios y reordenaciones celulares que van desde la arquitectura de la célula hasta la expresión génica.

Además de las dos vías anteriores, hay una tercera alternativa para producir un haploide o doble haploide androgénico: la regeneración de plantas a partir de callos haploides derivados de los meiocitos. Aunque es mucho menos frecuente que la anterior y menos explorada, ya existen una serie de ejemplos documentados que avalan su existencia. Sin embargo, al igual que sucedía con la primera de las rutas androgénicas descritas, su utilidad práctica es muy limitada, al menos a día de hoy.

En cualquiera de los casos, una vez se obtiene un embrión o un callo haploide, es necesario que este duplique su genoma para convertirse en doble haploide. En muchos casos, este paso necesita de ser inducido de forma exógena. Para ello, hay muchos agentes químicos que posibilitan la duplicación. De entre ellos destaca la colchicina por su efectividad, aunque no hay que olvidar que tiene también un cierto efecto citotóxico. Una vez obtenida la planta regenerada, es necesario comprobar si realmente es un doble haploide, un haploide o presenta otras ploidías diferentes, o incluso otros orígenes diferentes. Hay que tener presente que también pueden regenerarse callos y embriones a partir del tejido somático de la antera, cuando es esta lo que se pone en cultivo. Para estas comprobaciones las técnicas más comúnmente utilizadas son la citometría de flujo (para análisis de la ploidía) y el análisis mediante marcadores moleculares de tipo microsatélite (para discriminar entre doble haploides y diploides).

19.11. Información adicional

- Andersen S.B. 2005. Haploids in the improvement of woody species. En Haploids in crop improvement II, Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K.J., eds Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 243-257.
- Bal U., Abak K. 2007. Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): a critical review. Euphytica, 158: 1-9.
- Binarova P., Hause G., Cenklova V., Cordewener J.H.G., van Lookeren-Campagne M.M. 1997. A short severe heat shock is required to induce

embryogenesis in late bicellular pollen of Brassica napus L. Sexual Plant Reproduction, 10: 200-208.

- Campos F.F., Morgan D.T.J. 1958. Haploid pepper from a sperm. Journal of Heredity, 49: 135-137.
- Chase S.S. 1963. Androgenesis - Its use for transfer of maize cytoplasm. Journal of Heredity, 54: 152-158.
- Corral-Martínez P., Nuez F., Seguí-Simarro J. M. 2001. Genetic, quantitative and microscopic evidence for fusion of haploid nuclei and growth of somatic calli in cultured *ms10*^{35} tomato anthers. Euphytica. En prensa. DOI: 10/1007/s10681-010-0303-z.
- Goodsell S.F. 1961. Male sterility in corn by androgenesis. Crop Science, 1: 227-228.
- Clausen R.E., Lammerts W.E. 1929. Interspecific hybridisation in Nicotiana. X. Haploid and diploid merogony. American Naturalist, 43: 279-282.
- de Fossard R.A. 1974. Terminology in "Haploid" research. En Haploids in higher Plants: advances and Potential, Kasha K.J., ed. Guelph, Canada: University of Guelph, 403-410.
- Dunwell J.M. 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnology Journal, 8: 377-424.
- Germana M. 2006. Doubled haploid production in fruit crops. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 86: 131-146.
- Guha S., Maheshwari S.C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature, 204: 497.
- Kim M., Jang I.-C., Kim J.-A., Park E.-J., Yoon M., Lee Y. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Reports, 27: 425-434.
- Kim M., Kim J., Yoon M., Choi D.-I., Lee K.-M. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 77: 63-72.
- Kimber G., Riley R. 1963. Haploid Angiosperms. Botanical Review, 29: 480-531.
- Lacadena J.R. 1974. Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis. En Haploids in higher Plants: advances and Potential, Kasha K.J., ed. Guelph, Canada: University of Guelph, 13-32.
- Malik M.R., Wang F., Dirpaul J., Zhou N., Hammerlindl J., Keller W., Abrams S.R., Ferrie A.M.R., Krochko J.E. 2008. Isolation of an embryogenic line from non-embryogenic *Brassica napus* cv. Westar through microspore embryogenesis. Journal of Experimental Botany, 59: 2857-2873.

- Malik M.R., Wang F., Dirpaul J.M., Zhou N., Polowick P.L., Ferrie A.M.R., Krochko J.E. 2007. Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. Plant Physiology, 144: 134-154.
- Maluszynski M., Kasha K.J. Forster B.P,. Szarejko I. 2003. Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic Publishers.
- Maraschin S.F., de Priester W., Spaink H.P., Wang M. 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. Journal of Experimental Botany, 56: 1711-1726.
- Pandey K.K. 1973. Theory and practice of induced androgenesis. New Phytologist, 72: 1129-1140.
- Pauls K.P., Chan J., Woronuk G., Schulze D., Brazolot J. 2006. When microspores decide to become embryos - cellular and molecular changes. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique, 84: 668-678.
- Raghavan V. 1986. Polen embryogenesis. En Embryogenesis in Angiosperms, a developmental and experimental study, Barlow P.W., Green P.V., Wylie C.C., eds. London: Cambridge University Press, 152-189.
- Seguí-Simarro J.M. 2010. Androgenesis Revisited. The Botanical Review, 76:377-404.
- Seguí-Simarro J.M., Corral-Martínez P., Parra-Vega V., González García B. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. Plant Cell Reports. Special issue-Plant Biotechnology in Support of the Millenium Development Goals. En prensa. DOI: 10.1007/s00299-010-0984-8.
- Seguí-Simarro J.M., Nuez F. 2008. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. Physiologia Plantarum, 134: 1-12.
- Seguí-Simarro J.M., Nuez F. 2008. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. Cytogenetic and Genome Research, 120: 358-369.
- Seguí-Simarro J.M., Nuez F. 2007. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. Journal of Experimental Botany, 58: 1119-1132.
- Shariatpanahi M.E., Bal U., Heberle-Bors E., Touraev A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. Physiologia Plantarum, 127: 519-534.
- Shivanna K.R. 2003. Pollen biology and biotecnology. Science Publishers, Inc. Enfield (USA).

- Srivastava P., Chaturvedi R. 2008. In vitro androgenesis in tree species: An update and prospect for further research. Biotechnology Advances, 26: 482-491.
- Touraev A., Pfosser M., Heberle-Bors E. 2001. The microspore: A haploid multipurpose cell. Advances in Botanical Research, 35: 53-109.
- Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. 2009. Advances in haploid production in higher plants. (Springer).
- Trigiano R.N., Gray D. 2010. Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology. CRC Press.
- Recurso online: http://www.scri.ac.uk/assoc/COST851/DHtable2005.xls. En esta web se puede consultar una lista de protocolos de embriogénesis de microspora publicados para especies y variedades de interés agronómico.

TEMA 20. Haploides y doble haploides (II). Alternativas a la androgénesis

En el tema anterior hemos mostrado la importancia que tienen los individuos haploides y fundamentalmente los doble haploides en muchos ámbitos, pero sobre todo en el de la mejora vegetal. Hemos visto también que la forma más eficaz y utilizada de obtener doble haploides es la inducción de androgénesis. Sin embargo, no todas las especies responden por igual a la androgénesis. De hecho, las hay que ni tan siquiera responden. En esos casos es necesario encontrar vías alternativas a la androgénica para conseguir los doble haploides. En este tema veremos dos de esas vías, la ginogénesis (la versión femenina de la androgénesis), y la hibridación interespecífica. Aunque la finalidad de esta última es principalmente obtener híbridos interespecíficos con combinaciones genéticas únicas, en determinados cruces es también una fuente de obtención de haploides. En este tema veremos la hibridación interespecífica desde ese enfoque.

20.1. Ginogénesis

Por analogía con la definición de androgénesis, podríamos definir la ginogénesis como la capacidad de una especie para generar individuos haploides o doble haploides a partir de un núcleo haploide (reducido) proveniente del parental femenino. Esta vía de desarrollo experimental del megagametófito fue descubierta y demostrada experimentalmente por primera vez en 1976 por San y colaboradores. A través de ella, en el saco embrionario se desarrolla un embrión ginogénico, generalmente haploide, sin necesidad de polinización previa. Sería, pues, una forma de partenogénesis femenina. En algunas especies se cree que el embrión ginogénico se origina a partir de las células antípodas o las sinérgidas, pero en la gran mayoría de los casos el embrión ginogénico deriva de la célula huevo.

Desde el punto de vista metodológico, esta técnica consiste en cultivar in vitro óvulos, ovarios o incluso flores completas inmaduras (no abiertas y por tanto, no polinizadas; Figura 20.1) hasta que madure el saco embrionario y se desarrolle el embrión ginogénico. Los embriones ginogénicos son en su mayoría haploides, lo que implica que para obtener el deseado doble haploide, se debe considerar en casi todos los casos la aplicación de tratamientos adicionales para la duplicación de los cromosomas. Al igual que en el caso de la androgénesis, la colchicina es el antimitótico más efectivo y por tanto más utilizado. Otros agentes antimitóticos como la orizalina o el amiprofos metil (APM) también se han utilizado en ocasiones.

Al igual que en la androgénesis, en el éxito de la inducción de la ginogénesis influyen multitud de factores de diversa índole. También pueden englobarse estos factores en las mismas tres categorías: condiciones de la planta donante, condiciones de inducción, y condiciones de cultivo. Sin embargo, en el caso de

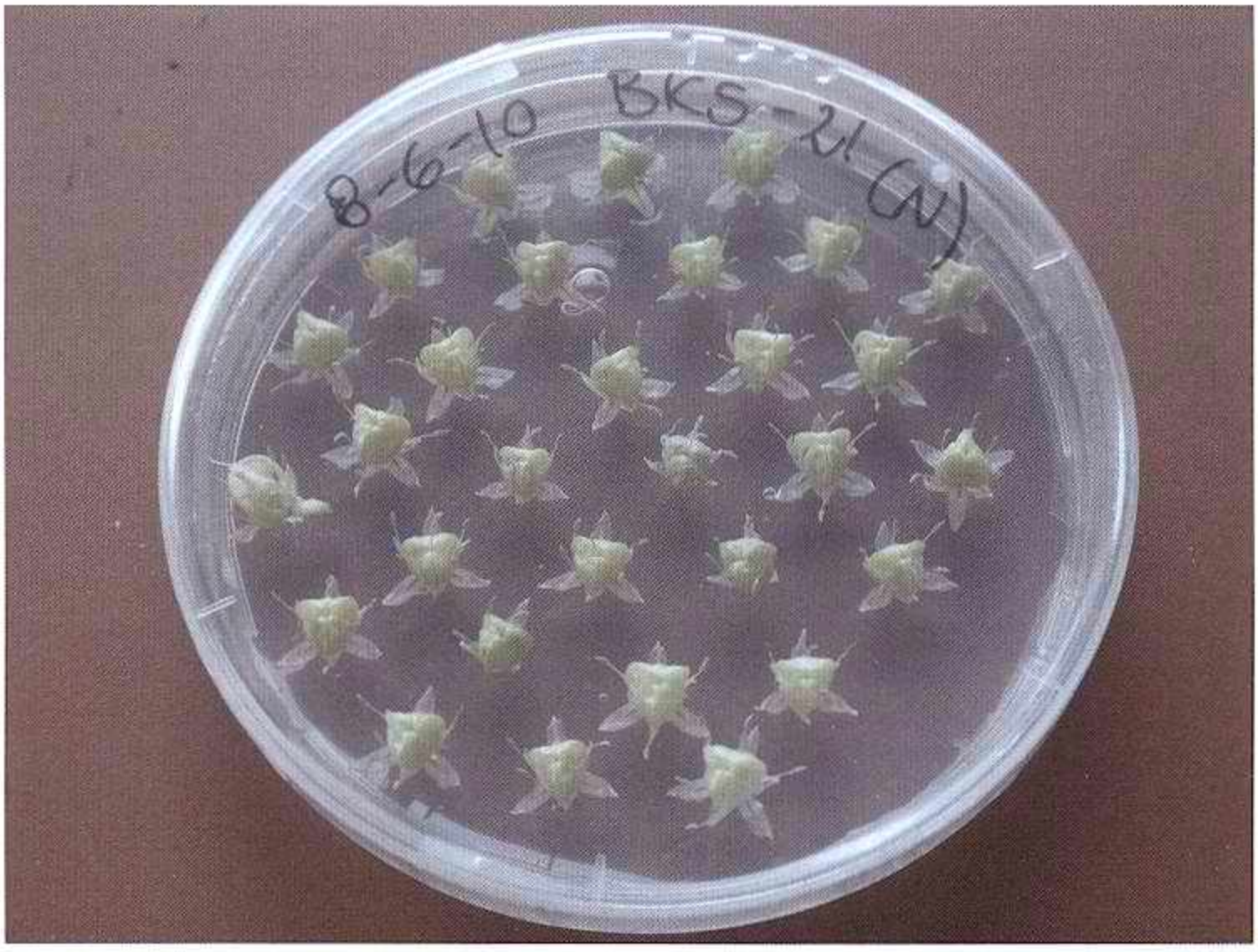


Figura 20.1: Flores de cebolla inoculadas en cultivo in vitro e inducidas a ginogénesis. Imagen cortesía del Prof. Borut Bohanec, de la University of Ljubljana, Eslovenia.

la ginogénesis el genotipo juega un papel aún mayor incluso. De hecho es el factor con diferencia más limitante en la aplicación de esta técnica, pues son muy pocos los genotipos que responden a esta técnica. Muchos menos que los que responden a la androgénesis.

Siendo el más importante, la influencia del genotipo no es el único factor que limita el uso de esta técnica frente a otras como la androgénesis. Existen otra serie de limitaciones frente a la androgénesis:

- Al haber menos óvulos que microsporas, la eficiencia de producción de embriones por flor siempre será mucho menor, por muy sensible que sea el genotipo.
- En general, la ginogénesis presenta una tasa de duplicación espontánea del genoma muy baja. Se necesitan, como hemos visto, agentes de duplicación cromosómica como parte integral de los protocolos de ginogénesis.
- Fruto de la baja tasa de duplicación, se generan haploides cuyo número cromosómico es muy inestable, generando diversas alteraciones cromosómicas.
- Presenta bajos niveles de regeneración de embriones.

Todas estas limitaciones hacen que la ginogénesis se utilice en un reducido abanico de especies. Solo se usa en aquellas que responden a la ginogénesis, y en las que además otras técnicas de inducción de doble haploides se han demostrado ineficaces o no producen un número suficiente de regenerantes viables. Esta es la única ventaja que tiene esta vía experimental, que hay especies en las que no funciona la androgénesis y sí lo hace la ginogénesis. Hasta hoy se ha conseguido reproducir la ginogénesis en al menos 24 especies, y existen protocolos detallados para especies de elevada importancia económica como cebolla, remolacha azucarera, pepino, girasol y gerbera (margarita multicolor).

La especie modelo para el estudio de la ginogénesis es la cebolla (*Allium cepa*). La cebolla es la especie que mejor cumple con las premisas antes expuestas de no responder a otros métodos de obtención de doble haploides, y si hacerlo a la ginogénesis, aunque con la baja frecuencia característica de esta vía de desarrollo. La ginogénesis en cebolla suele presentar un requerimiento especial de poliaminas en el medio como inductor. Así pues, los explantes (las flores completas en este caso) se inoculan en un primer medio de inducción con putrescina (Figura 20.1). A los 15 días se cambian a medio fresco, pero sustituyendo la putrescina por otra poliamina, la espermidina. A partir de estos primeros 15 días ya pueden empezar a aparecer embriones ginogénicos, que emergerán directamente del ovario (Figura 20.2A). Conforme van saliendo, los embriones se aíslan y se regeneran individualmente en medio MS basal suplementado con glucosa (Figura 20.2B).

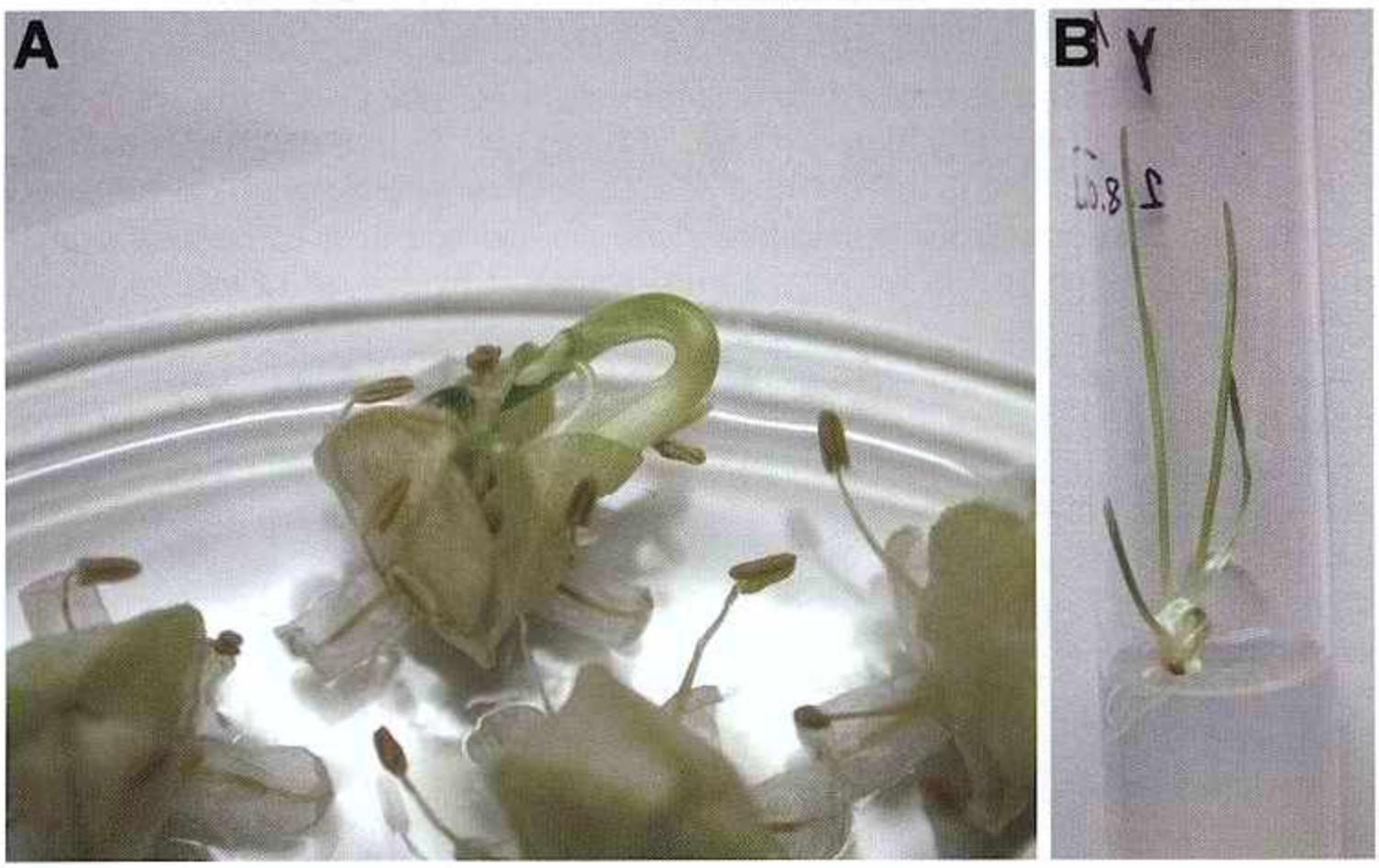


Figura 20.2: A: Embrión ginogénico emergiendo del ovario de una flor de cebolla inducida a ginogénesis. B: Plántula regenerada procedente de un embrión aislado
Imágenes cortesía del Prof. Borut Bohanec, de la University of Ljubljana, Eslovenia.

Por último, las plantas haploides son sometidas a tratamientos con colchicina para inducir la duplicación del genoma, y son aclimatadas a las condiciones de invernadero (Figura 20.3).

Figura 20.3: Plantas doble haploides ginogénicas de cebolla aclimatándose en invernadero. Imagen cortesía del Prof. Borut Bohanec, de la University of Ljubljana, Eslovenia.

20.2. Ginogénesis inducida por polinización

Veíamos en el tema 19 que en algunos sistemas androgénicos es necesario añadir al medio algún tejido externo como ovarios u óvulos de la misma u otra especie, para que estos tejidos secreten alguna sustancia (no identificada) que favorezca la inducción de la androgénesis. De modo semejante, existen algunas especies en las que para inducir la ginogénesis, hay que aplicar un factor "extra", que desencadene el proceso. En realidad, dicho factor no es otro que el polen. Al aplicar polen sobre los tejidos del gineceo, se disparan una serie de respuestas típicas de la germinación, como antesala de la fecundación. En algunas especies, estas respuestas a la polinización tienen como consecuencia, en ausencia de fecundación, la inducción de la ginogénesis. Es importante remarcar la ausencia de fecundación, porque precisamente es eso lo que se desea para obtener el embrión doble haploide. Por ello, se utiliza polen, pero en condiciones tales que nos aseguremos de que no va a ser capaz de fecundar, tan solo de provocar la deseada respuesta a la polinización en forma de inducción de ginogénesis. A este polen, de la misma especie o de otra, pero que no es capaz de fecundar sino de inducir otra serie de procesos, se le denomina *polen mentor*.

El polen mentor se puede aplicar directamente in situ, sobre la flor sin separar de la planta. Lógicamente, esta flor ha de haber sido previamente emasculada para asegurarnos de que en el estigma solo va a estar presente el polen que nosotros pongamos. Es decir, se trataría de una polinización manual más, sin otra complicación técnica distinta de la habitual. Sin embargo, el tratamiento que en ocasiones hay que aplicarle al polen para asegurarnos de que no fecunde es costoso, y no es deseable dejar todo este proceso al albur de las condiciones atmosféricas en campo. Por ejemplo, en el caso de los cítricos, que están entre las especies más utilizadas para este tipo de técnicas, la polinización de las flores emasculadas es sumamente difícil, y una vez se consigue, puede quedar destruido si las condiciones atmosféricas son adversas. Por estas razones en la práctica muchos de estos ensayos suelen realizarse in vitro, de las maneras que veremos a continuación.

20.2.1. Estrategias de polinización in vitro para ginogénesis

Para inducir la ginogénesis mediante polinización in vitro se utilizan fundamentalmente dos estrategias: la polinización estigmática y la polinización placentaria.

20.2.1.1. Polinización estigmática in vitro

La *polinización estigmática in vitro* consiste en aislar pistilos completos de la flor, ponerlos en cultivo in vitro, y aplicar polen a la parte apical del estigma (Figura 20.4). De esta forma se induce la ginogénesis mediante polinización in vitro. Además del hecho de polinizar, es esencial para esta técnica que los pistilos que se utilicen estén en el momento óptimo para su polinización. Han de estar maduros, receptivos. No hay que olvidar que una vez se separan del resto de la flor, su desarrollo se ve bloqueado por la ausencia de señales reguladoras

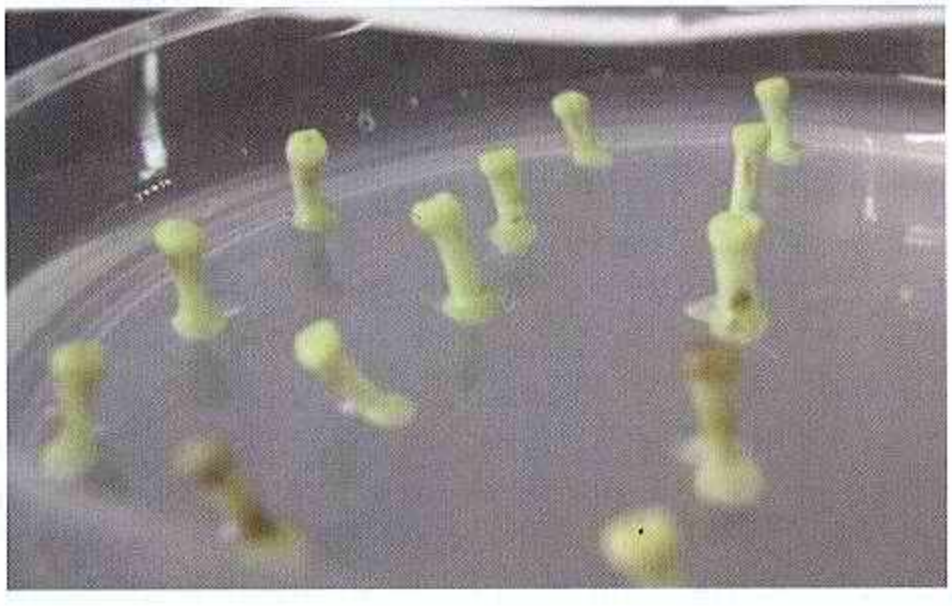


Figura 20.4: Cultivo in vitro de pistilos polinizados de *Citrus clementina*, cv. Nules.
Imagen cortesía de Benedetta Chiancone y Maria Antonietta Germanà, del Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo.,
Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Palermo, Italia.

procedentes del resto de la flor y de la planta. De hecho, en lugar de continuar con su desarrollo, al cabo de un tiempo los ovarios se transforman en callos, dentro de los cuales persisten los óvulos. A los cuatro o cinco meses, comenzarán a emerger los embriones ginogénicos desde dentro de los óvulos. Este tipo de técnica no requiere de ninguna manipulación especial, salvo la emasculación de la flor para asegurar que el estigma no sea previamente polinizado. Es por tanto una estrategia técnicamente sencilla.

20.2.1.2. Polinización placentaria in vitro

La *polinización placentaria in vitro* es algo mas compleja técnicamente, puesto que consiste en aislar los óvulos del ovario, pero manteniendo un fragmento de la placenta. Este fragmento de tejido ayudará a la viabilidad del óvulo. El procedimiento pasa por dividir el ovario en varias partes. Cada una de estas partes es colocada en el medio de cultivo de forma que los óvulos queden expuestos. Así es luego mucho más fácil el aislamiento de los óvulos, y hay menos posibilidades de dañarlos. Este hecho no es nada trivial, pues los óvulos son extremadamente delicados, muy sensibles a la manipulación y a la pérdida de agua. Al éxito de la técnica contribuye también la presencia de la placenta, sobre todo a paliar la pérdida de agua inherente a su exposición en el cultivo in vitro.

20.2.2. Estrategias de inactivación del polen para ginogénesis

Para asegurarse de que no va a haber fecundación, se utiliza polen "especial", tratado para que le sea imposible dicha función. Aunque hay casos excepcionales de tratamientos "infrecuentes", como por ejemplo la aplicación de azul de toluidina al polen de *Populus nigra*, se utilizan principalmente dos tipos de polen inactivado para este tipo de polinizaciones: el polen irradiado y el polen triploide.

20.2.2.1. Polen irradiado

El *polen irradiado* es una forma segura de evitar su capacidad de fecundación, manteniendo la compatibilidad con el estigma, al ser de la misma especie. Este tipo de polen se obtiene de los mismos individuos a polinizar, pero se trata previamente con rayos gamma o X. Esta radiación destruye el núcleo generativo del polen, pero no el vegetativo. De este modo, el polen así irradiado sigue siendo capaz de germinar, aunque no de fecundar. Al germinar, estimula la célula huevo hacia un desarrollo embriogénico haploide (ginogénesis), que es justo lo que se pretende. Una vez irradiado, el polen se aplica al tejido receptor, generalmente estigmas de pistilos completos cultivados in vitro. Esta técnica también se puede utilizar in situ, aplicando el polen a estigmas de flores sin separar de la planta, emasculadas previamente. En cualquier caso, es importante rescatar los embriones haploides y madurarlos in vitro, pues son muy delicados.

Lógicamente, el éxito de esta técnica va a depender de la dosis de radiación utilizada, pero también del estadio de los embriones en el momento del rescate y la puesta en cultivo, y como en toda técnica de cultivo in vitro, de la composición del medio.

Este es un método útil sobre todo en frutales, donde es dificil obtener haploides por otros métodos. Así, mediante la irradiación de polen con rayos gamma se ha conseguido inducir ginogénesis en cítricos, manzano, peral, kiwi o chopo tricocarpa, Pero además de frutales, la utilidad de la irradiación con rayos gamma también ha sido exitosa en cebada, petunia, clavel, rosa, melón, pepino, cebolla, zanahoria, sandía y calabacín. Por su parte, los rayos X han sido utilizados con éxito en *Capsicum frutescens, Nicotiana rustica* y en especies de *Triticum* como *T. aestivum, T. monococcum* y *T. durum.* En mora, se ha utilizado también esta estrategia para reducir la ploidía, de tetraploides a dihaploides.

20.2.2.2. Polen de triploides

El polen de individuos triploides tiene un efecto similar al polen irradiado, en cuanto a que es capaz de germinar, pero no de fecundar. Además, mantiene el efecto estimulador del desarrollo de embriones ginogénicos a partir de óvulos no fecundados. Lo que suele hacerse es utilizar polen de variedades triploides o de especies triploides relacionadas con la del individuo en el que se quiere inducir la ginogénesis.

Esta técnica ha sido utilizada con éxito sobre todo en variedades de cítricos, y utilizando tanto aproximaciones in situ como in vitro. Como ejemplo de la primera, podemos citar el caso de ginogénesis en *Citrus clementina* Hort. ex Tan (diploide), inducida mediante polinización in situ (en el árbol) con polen de *Citrus natsudaidai Hayata.* (triploide). Como ejemplo de éxito con la aproximación in vitro podemos mencionar la obtención de haploides mediante la polinización in vitro de *Citrus clementina* Hort. ex Tan., cultivar 'Nules', con polen de un cultivar triploide de pomelo (*Citrus paradisi*) denominado 'Oroblanco' (Figura 20.5).

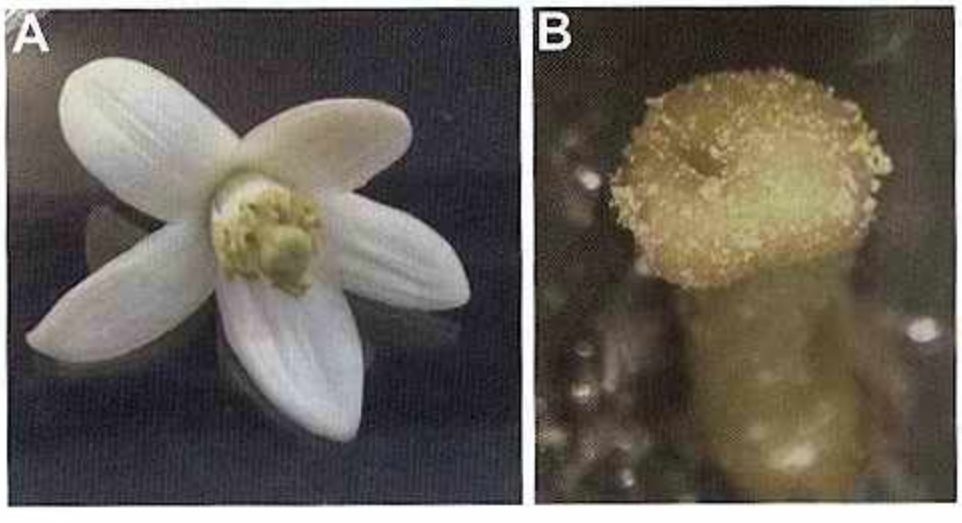


Figura 20.5: A: Flor triploide de pomelo 'Oroblanco'. B: Estigma de pistilo de *Citrus clementina*, cv. Nules polinizado con polen triploide de pomelo 'Oroblanco'.
Imagen cortesía de Benedetta Chiancone y Maria Antonietta Germanà, del Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo., Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Palermo, Italia.

20.3. Hibridación interespecífica

Otra manera de obtener plantas haploides y doble haploides en ciertas especies es mediante cruces interespecíficos o intergenéricos. Es lo que se denomina en inglés *wide hybrydization* (hibridación "lejana"). El mecanismo sería similar al visto con polen irradiado de la misma especie. Al cruzar dos especies sexualmente incompatibles, el polen germina, pero no puede llegar a fecundar la célula huevo. De todos modos, sí que es capaz de inducir directa o indirectamente su desarrollo ginogénico, excluyendo cualquier fondo genético del parental masculino. Un ejemplo de este tipo de inducción ginogénica lo tenemos en los cruces entre patata cultivada (*Solanum tuberosum*, 4x) y una especie relacionada, pero sexualmente incompatible, *Solanum phureja* (2x). El objetivo de estas hibridaciones es reducir la ploidía de *S. tuberosum* (tetraploide) a dihaploide. En este caso, la célula huevo no se llega a fecundar. En cambio, sí lo hace el núcleo secundario (4x), al cual se fusionan no una sino las dos espermátidas de *S. phureja* (1x). De este modo se forma un endospermo hexaploide (6x) que prolifera con normalidad, y además induce y promueve el desarrollo de un embrión dihaploide a partir de la célula huevo. Otro ejemplo de éxito es su uso para reducir la ploidía en la fresa, de octoploides a tetrahaploides.

20.3.1. El método bulbosum

Sin embargo, el ejemplo más conocido y utilizado es el que se conoce como *método bulbosum*. Este método se utiliza para obtener doble haploides de cebada (*Hordeum vulgare*) mediante la hibridación con una especie silvestre relacionada con la cebada pero incompatible, *Hordeum bulbosum*. Este método fue descubierto inicialmente en 1970 por Kasha y Kao, y fue el primer método basado en la hibridación interespecífica en cereales. Hoy está ampliamente extendido en la mejora de la cebada para la obtención de variedades comerciales por todo el mundo. En este método, tras la germinación del polen de *H. bulbosum* lo que sucede es que se forma un embrión híbrido producto de la fusión de un gameto masculino de *H. bulbosum* con una célula huevo de *H. vulgare*. Sin embargo, las barreras de postzigóticas de incompatibilidad a nivel de los cromosomas de las dos especies conducen a la eliminación progresiva de los cromosomas de *H. bulbosum*, de modo que el embrión resultante es haploide y con un fondo genético de *H. vulgare*, el parental femenino. Posteriormente durante el desarrollo del embrión se manifiesta una incompatibilidad entre dicho embrión y el endospermo que le rodea, que hace obligatorio el aislamiento y el rescate in vitro del embrión haploide. Por último, el individuo haploide obtenido ha de ser transformado en doble haploide mediante duplicación cromosómica.

Técnicamente, este método consta de los siguientes pasos:

1. Emascular la planta de cebada (*H. vulgare*) receptora del polen. Este paso es esencial, como en el caso de la polinización in vitro, para asegurarnos de que no tendremos polinización indeseado con polen de *H. vulgare*.
2. Recoger el polen de *H. bulbosum* cuando las anteras entran en dehiscencia.
3. Polinizar las espigas de *H. vulgare* con el polen de *H. bulbosum*.
4. Tratamiento post-polinización de las espigas fecundadas. Para un correcto desarrollo de la semilla y del embrión durante sus primeras etapas, es necesario aplicar a las espigas ácido giberélico en spray 1-2 días tras la polinización. Si no se aplica, los embriones mueren antes de poder rescatarlos.
5. Se protegen las espigas y se deja crecer el embrión.
6. En su momento, se rescata el embrión haploide de la semilla, antes de que aborte.
7. Se siembra el embrión en un medio de cultivo adecuado.
8. Los embriones se dejan germinar y se regeneran las plantas.
9. Las plantas regeneradas han de transferirse a tiesto y aclimatarse.
10. Se sacan las plantas del tiesto, se lavan y se tratan con colchicina para duplicar el genoma.

Su gran utilidad en la mejora de la cebada llevó a plantear la posibilidad de aplicar este método para la obtención de doble haploides en otras especies. Sin embargo, los investigadores pronto se dieron cuenta de que la aplicabilidad de este método se limita a la cebada. *Hordeum bulbosum* presenta barreras de cruzabilidad con la mayoría de cereales de grano pequeño, lo cual limita enormemente su aplicación como polinizador de más amplio espectro. Por esta razón, en los últimos años se han centrado en estudiar el potencial del polen de maíz como polinizador para hibridaciones lejanas (intergenéricas en este caso). Los resultados están siendo más prometedores que con *H. bulbosum*, como veremos a continuación.

20.3.2. El uso de polen de maíz como polinizador lejano

El uso del polen de maíz como mentor para inducir el desarrollo de embriones haploides en otros géneros mediante hibridaciones interespecíficas ha sido ampliamente explotado en los últimos 20 años, habiéndose ensayado en la mayoría de cereales. Por ejemplo, el triticale y el trigo tetraploide y hexaploide son eficientemente inducidos mediante polinización con polen de maíz. Aunque

en menor medida, el polen de maíz también parece funcionar con centeno y avena.

En estos cruces con polen de maíz, la célula huevo de la especie inducida llega a fertilizarse, pero el material genético masculino, proveniente del maíz, es eliminado durante las primeras tres divisiones del embrión híbrido, quedando un haploide proveniente únicamente del parental femenino. Es decir, se trata de un evento ginogénico semejante al descrito para el método bulbosum. Sin embargo, y a diferencia de este, no hay doble fecundación. No se fecunda el núcleo secundario y no se forma endospermo. Esto en la práctica tiene la misma consecuencia que en el método bulbosum: hay que aislar prematuramente el embrión haploide y rescatarlo in vitro. Otras semejanzas entre la hibridación con polen de *H. bulbosum* y de maíz es que hay que aplicar análogos de auxinas para mantener el crecimiento del embrión e inducir la elongación del grano del cereal, y que no se duplica el genoma espontáneamente, con lo que siempre hay que aplicar colchicina.

Sin embargo, los métodos basados en el uso de polen de maíz parecen ser menos dependientes del genotipo de la planta que el método basado en el polen de *H. bulbosum*. Menos incluso que otras formas de inducción de ginogénesis, o que los métodos basados en la androgénesis. Además de maíz, también se ha ensayado con polen de otras especies cercanas al maíz como el sorgo (*Sorghum sp.)* y *Pennisetum sp*, y también funcionan como polinizadores.

20.4. Resumen

En este tema hemos visto alternativas para obtener individuos haploides y doble haploides por vías distintas a la androgénesis. En general, la androgénesis es mucho más eficiente que cualquier otro método. Sin embargo, hay especies que no responden a ella, por lo que es necesario buscar vías alternativas. Una de ellas es la ginogénesis, es decir, la obtención de haploides con una carga genética proveniente exclusivamente de un donante femenino. Cada especie de las inducibles a ginogénesis tiene sus propios requerimientos para producir embriones. En algunas de ellas es necesario promover la ginogénesis mediante polinizaciones, lógicamente con polen incapacitado para fecundar. Lo más común es utilizar polen irradiado o polen triploide, y fecundar in vitro el estigma o la placenta del pistilo a inducir.

La segunda vía alternativa es la hibridación interespecífica. En algunas especies, la hibridación con polen mentor de otra especie no desemboca en la formación de un híbrido interespecífico o en el aborto del embrión híbrido, sino que promueve la formación de un embrión haploide a partir de ciertas células haploides del saco embrionario. Esta técnica tiene muchas limitaciones, siendo la principal la poca disponibilidad de polen mentor útil para inducir la embriogénesis haploide. De hecho, solo funciona con relativa eficiencia en cebada, cuando es polinizada con polen de *Hordeum bulbosum*. En otras especies, el polen de maíz también es capaz de inducir este proceso, pero con

menor eficiencia. En definitiva, se trata de un método alternativo, útil en casos concretos.

Como corolario a estos dos temas dedicados a la obtención de haploides, podríamos decir que siempre que se pueda, la androgénesis es la mejor opción. Si no es posible la androgénesis, habría que probar con la ginogénesis o la hibridación interespecífica.

20.5. Información adicional.

- Bohanec B. 2009. Doubled Haploids via Gynogenesis. En Advances in Haploid Production in Higher Plants, Touraev A.F., BP Jain, SM, ed. Springer, 35-46.
- Bouvier L., Zhang Y.X., Lespinasse Y. 1993. Two methods of haploidization in pear, *Pyrus communis* L.: greenhouse seedling selection and in situ parthenogenesis induced by irradiated pollen. Theoretical and Applied Genetics, 87: 229-232.
- Chalak L., Legave J.M. 1997. Effects of pollination by irradiated pollen in Hayward kiwifruit and spontaneous doubling of induced parthenogenetic trihaploids. Scientia Horticulturae, 68: 83-93.
- Devaux P. 2003. The *Hordeum bulbosum* (L.) method. En Doubled haploid production in crop plants. A manual., Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I., eds. Dordretch, the Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 15-19.
- Germanà M.A. 1997. Haploidy in *Citrus*. In: Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E. eds. In Vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol. 5, 195-217. Kluwer Academic Publishers.
- Germanà M.A., Chiancone B. 2001. Gynogenetic haploids of Citrus after in vitro pollination with triploid pollen grains. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 66: 59-66.
- Grosser J.W., Gmitter F.G. Jr, Chandler J.L. 1988. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severina disticha*. Theoretical and Applied Genetics, 75: 397-401.
- Hayes P., Corey A., DeNoma J. 2003. Doubled haploid production in barley using the *Hordeum bulbosum* (L.) technique. En Doubled haploid production in crop plants. A manual. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I., eds Dordretch, the Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 5-14.
- Hofer M., Lespinasse Y. 1996. Haploidy in apple. In Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E. eds. In Vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol. 3: 261-276. Kluwer Academic Publishers.

- Illies Z.M. 1974. Induction of haploid parthenogenesis in Populus tremula by male gametes incativated with toluidine blue. En Haploids in higher Plants: advances and Potential, Kasha K.J., ed. Guelph, Canada, University of Guelph, 136.
- Janick J., Hughes H.G. 1974. Production of strawberry tetrahaploids from intergeneric crosses. En Haploids in higher Plants: advances and Potential, Kasha K.J., ed. Guelph, Canada, University of Guelph, 137.
- Kasha K.J., Kao K.N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature, 225: 874-876.
- Kobayashi S., Ohgawara T., Saito W., Nakamura Y., Omura M. 1997. Production of triploid somatic hybrids in *Citrus*. Journal of the Japanese Society of Horticultural Sciences, 66 (34): 453-458.
- Oiyama I.I. Kobayashi S. 1993. Haploid obtained from diploid x triploid crosses of *Citrus*. Journal of the Japanese Society of Horticultural Sciences, 62(1): 89-93.
- Ollitrault P., Allent V., Luro F. 1996. Production of haploid plants and embryogenic calli of clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after in situ parthenogenesis induced by irradiated pollen. Proceedings of the International Society of Citriculture, 2: 913-917.
- Pandey K.K., Przywara L., Sanders P.M. 1990. Induced parthenogenesis in Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. Euphytica, 51: 19
- Raquin C. 1985. Induction of haploid plants by in vitro culture of *Petunia* ovaries pollinated with irradiated pollen. Zeitschrift fur Pflanzenzuchtung. 94: 166-169.
- Sari N., Abak K., Pitrat M., Rode J.C., Dumas de Vaulx R. 1994. Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. HortScience 29: 1189-1190.
- Wedzony M., Forster B.P., Zur I., Golemiec E., Szechynska-Hebda M., Dubas E., Gotebiowska G. 2009. Progress in doubled haploid technology in higher plants. En Advances in Haploid Production in Higher Plants, Touraev A.F., BP Jain, SM, ed. Springer, 1-33.
- Wernsman E.A., Matzinger D.F., Rufty R.C. 1989. Androgenetic vs. gynogenetic doubled haploids of tobacco. Crop Science, 29: 1151-1155.
- Zenkteler M., Nitzsche W. 1984. Wide hybridization experiments in cereals. Theoretical and Applied Genetics, 68: 311-315.
- Zhang Y.X., Lespinasse Y. 1991. Pollination with gamma irradiation pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. Euphytica 54: 101-109.

TEMA 21. Superación de barreras reproductivas

A lo largo de este libro hemos visto que para reproducirse por vía sexual, las plantas en general pueden optar por autofecundarse preferentemente (autogamia) o por cruzarse con otros individuos (alogamia). Como vimos en el tema 9, la autogamia es un mecanismo que desarrollan las plantas como ventaja adaptativa para colonizar rápidamente nuevos nichos ecológicos. Para favorecer la autogamia, las plantas autógamas desarrollan una serie de mecanismos (que vimos también en el tema 9) que permiten la fecundación con su propio polen, y dificultan la fecundación con polen ajeno. En el caso de la alogamia, la fecundación se da entre distintos individuos, y lo que se trata de impedir es que el propio polen lo haga. Para ello, estas plantas desarrollan mecanismos de autoincompatibilidad (vistos en el tema 9).

Por otra parte, los cruces entre individuos alógamos por lo general suelen darse dentro de la misma especie. No es frecuente en la naturaleza observar cruces entre especies diferentes. Pese a que estos cruces son una fuente de generación de nuevas combinaciones genéticas y por tanto de nuevas especies, son también una forma de extinguir las especies ya existentes, puesto que las características propias de las dos especies que se cruzaran quedarían diluidas en la descendencia. Por este motivo, las plantas desarrollan también mecanismos que impidan este tipo de cruces entre especies.

En definitiva, tenemos varios mecanismos reproductivos que tratan de favorecer aspectos distintos, y que conllevan la presencia de barreras distintas en cada uno de los casos (Figura 21.1). Desde un punto de vista aplicado, interesa

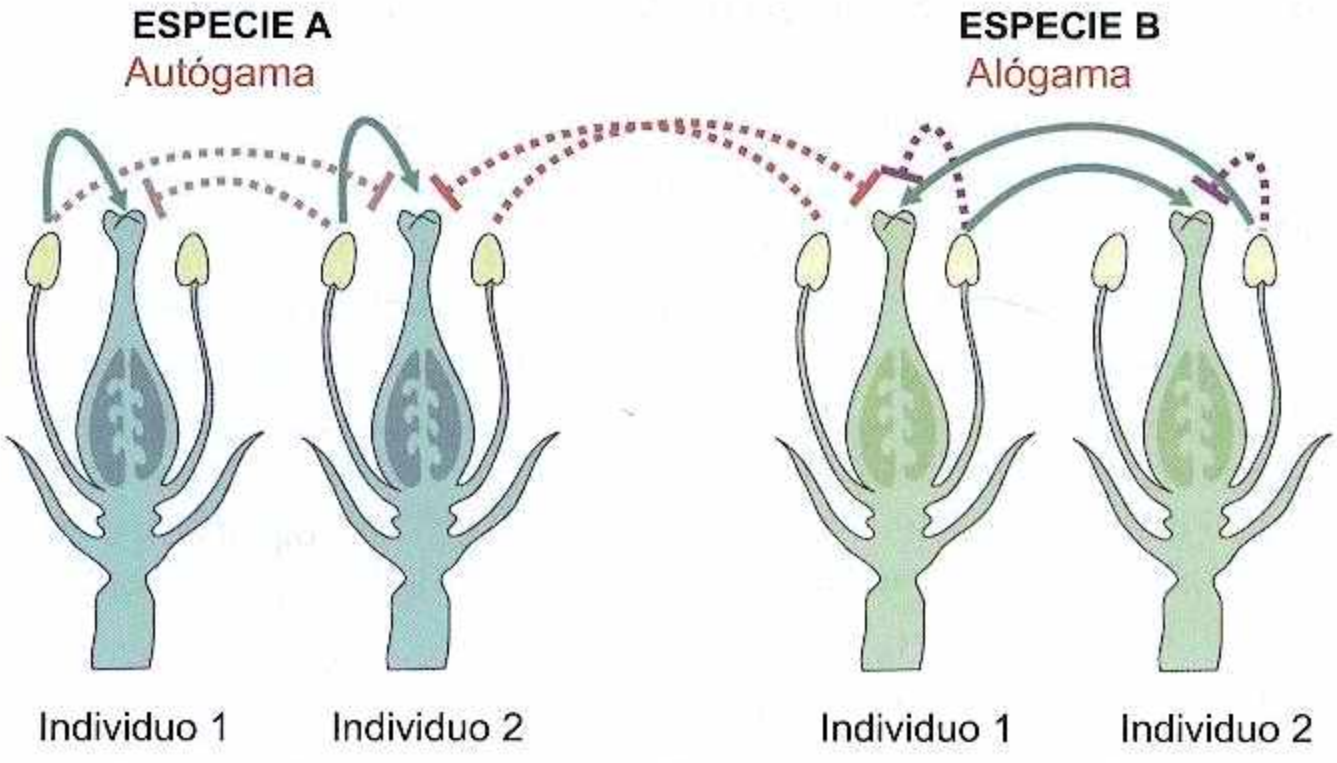


Figura 21.1: Combinaciones reproductivas posibles (líneas verdes) entre individuos de la misma y de distinta especie. Las líneas discontinuas representan las barreras reproductivas que impiden los cruces interespecíficos (líneas rojas), intraespecíficos en el caso de la autogamia (líneas marrones) o la autofecundación en el caso de la alogamia (líneas púrpura).
Modificado de imagen de Mariana Ruiz, de dominio público, en Wikimedia Commons.

conocer estas barreras y de qué manera pueden ser superadas para poder diseñar a voluntad cruces artificiales, útiles en mejora genética, pero que serían imposibles en condiciones naturales, sin la intervención humana. Por ejemplo, cruces entre especies incompatibles (interespecíficos), o fecundaciones dentro del mismo individuo (autofecundaciones). Esto es lo que veremos en este tema. Además, comenzaremos el tema con un somero repaso al concepto de especie, de especiación y de los tipos de especiación que se dan en la naturaleza. Este aspecto teórico es importante para conocer el por qué de la aparición de las barreras a la reproducción interespecífica, que son las más importantes y a las que más extensión dedicaremos en este tema.

21.1. Concepto de especie y especiación

Pese a que se trata de un término muy común y utilizado, definir qué se entiende por *especie* no es fácil. De hecho, no hay un claro consenso entre la comunidad científica al respecto de este concepto, habiendo varias definiciones aceptables. De todas ellas, la más generalizada entiende una especie como una población natural, que comparte una serie de rasgos distintivos, que es capaz de reproducirse entre si de forma efectiva o potencial, y que evoluciona de forma separada a las demás. Se deduce de esta definición que si una especie evoluciona independientemente de las demás es porque no hay intercambio genético entre ellas. Es decir, existen barreras al flujo genético consecuencia del desarrollo de mecanismos de aislamiento reproductivo (imposibilidad de dar descendencia fértil).

Estrechamente relacionado con el concepto de especie está el concepto de *especiación*. La especiación es la formación (aparición) de nuevas especies. Puede considerarse como el proceso evolutivo por el que algunas poblaciones de una especie se diferencian, estableciendo mecanismos de aislamiento reproductivo similares a los que presentaba la especie original de la cual la nueva deriva. El proceso de la especiación es de suma importancia para explicar la diversidad de especies actual. El proceso contrario a la especiación es la extinción, que en definitiva, es el destino último de todas las especies De hecho, ya lo ha sido para el 99% de las especies que alguna vez existieron en el planeta Tierra.

A lo largo de 3.800 millones de años, la especiación ha originado millones de especies de todos los reinos que han poblado y pueblan la Tierra casi desde el momento en que se formaron los primeros mares. Ernst Mayr, afirmaba que las especies se pueden originar en la naturaleza de tres maneras diferentes, denominadas *modelos de especiación*: la especiación gradual o *cladogénesis*, la especiación instantánea y la hibridación.

21.1.1. Especiación gradual o cladogénesis

La cladogénesis es el mecanismo más importante de especiación de entre los que se conocen. Consiste en que a partir de una especie inicial se originan dos mediante un proceso lento y progresivo de divergencia entre las distintas

poblaciones que componían la especie inicial (Figura 21.2). La divergencia puede ocurrir a lo largo de un período largo de tiempo, o en unas pocas generaciones. Se pueden distinguir tres tipos cladogénicos básicos de modelos de especiación adaptativos (graduales): la especiación alopátrica, la parapátrica y la simpátrica. No es objetivo de este tema profundizar en los mecanismos que implican cada uno de estos modelos de especiación, pero el hecho es que entre poblaciones que ocupan distintas áreas geográficas comienzan a aparecer barreras reproductivas que acaban generando una nueva especie.

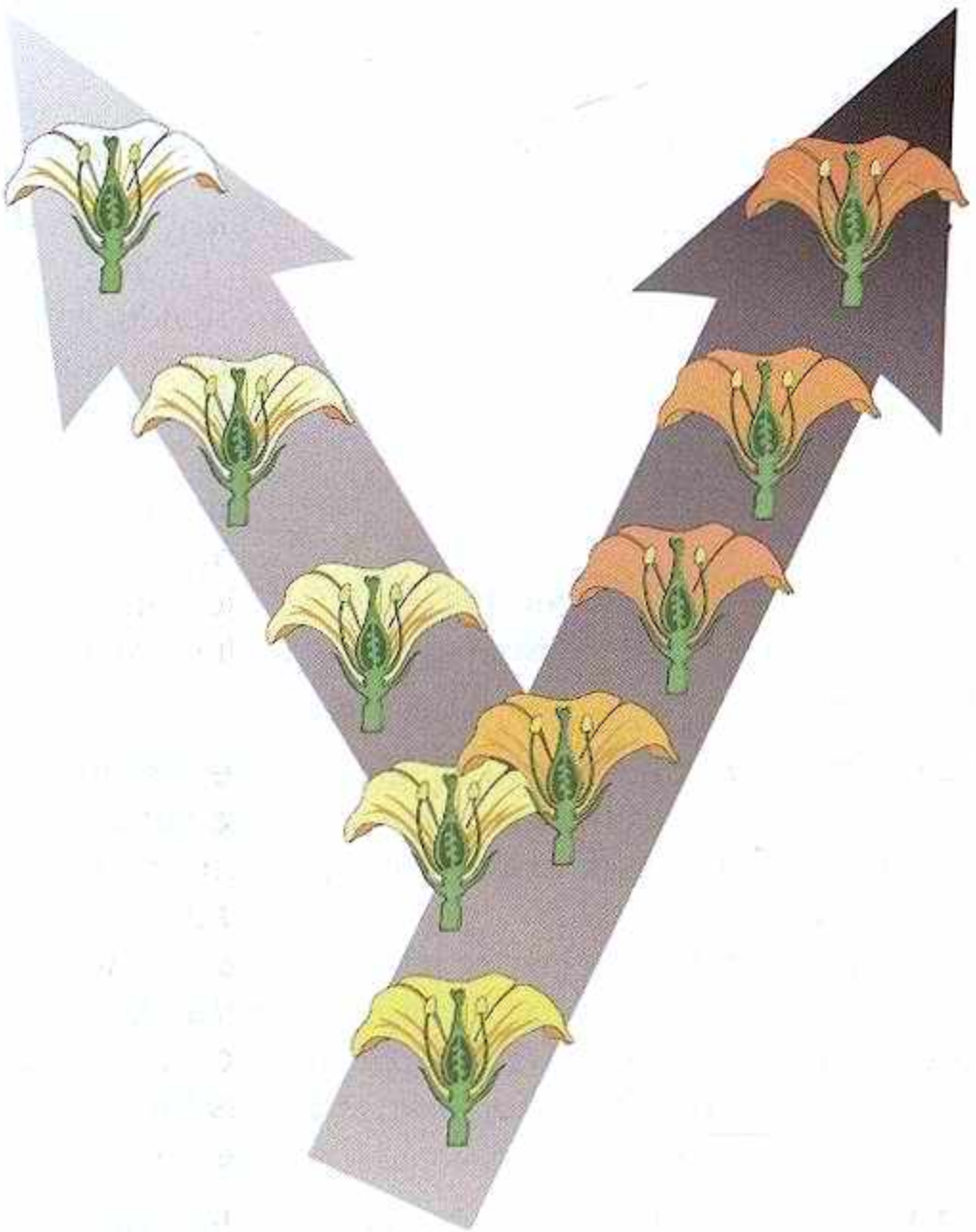


Figura 21.2: Especiación gradual (cladogénesis). A partir de un ancestro común, surgen distintas poblaciones que van divergiendo a lo largo de muchas generaciones hasta acabar como dos especies distintas.
Modificado de imagen de Mariana Ruiz, de dominio público, en Wikimedia Commons.

21.1.2. Especiación instantánea

Este modelo de especiación se da en individuos concretos, no en poblaciones, y engloba mecanismos de especiación en los que el aislamiento reproductivo aparece bruscamente, en una o pocas generaciones (Figura 21.3). Puede haber varias causas que desencadenen este proceso. Por ejemplo, la deriva genética

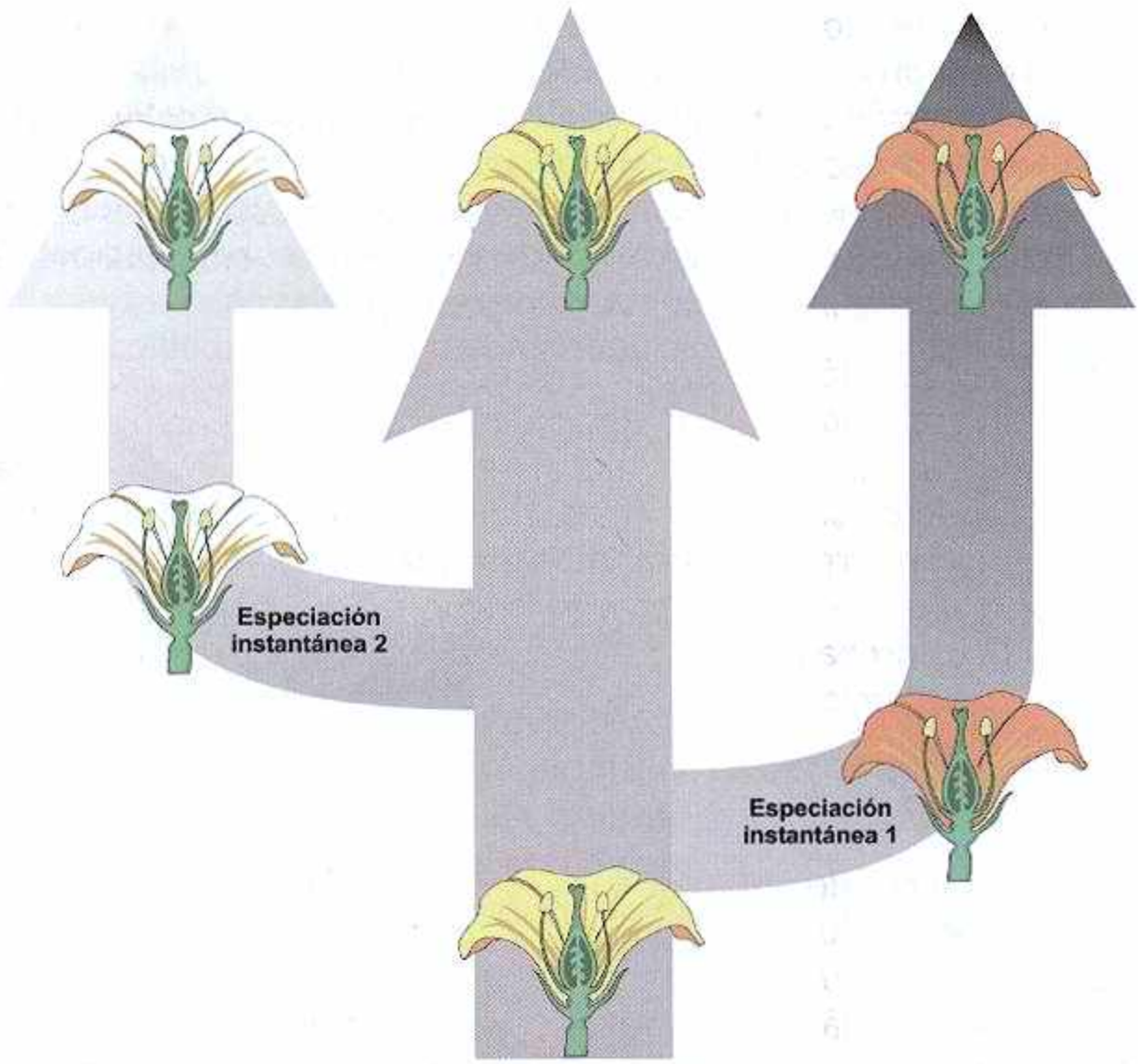


Figura 21.3: Especiación instantánea. A partir de una especie original que permanece invariable, aparecen dos eventos puntuales de especiación instantánea en dos individuos que quedan aislados reproductivamente. A partir de esos dos eventos se generarán dos nuevas especies, además de la original.
Modificado de imagen de Mariana Ruiz, de dominio público, en Wikimedia Commons.

y la consanguinidad. Estos fenómenos ocurren cuando una población sufre un cuello de botella que provoca una reducción drástica del tamaño poblacional, o cuando súbitamente disminuye el área de distribución de la población central y se establecen pequeños aislados poblacionales periféricos. En cualquier caso, la base genética se estrecha y cualquier cambio genético en un individuo no quedaría tan fácilmente diluido en la descendencia como en el caso de que la base fuera amplia.

Otra causa son los cambios súbitos del número monoploide. Esto es lo que sucede en la *especiación por autopoliploidía* y la *especiación por aloploidía*. En la especiación por autopoliploidía, los cromosomas homólogos de la especie original no se separan, debido a un error durante la meiosis, con lo que se duplica el numero de cromosomas. El número monoploide de la especie pasa de ser n a ser 2n, por lo que el número de cromosomas de la especie resultante será un múltiplo par del número monoploide de la especie original (4n, 6n, 8n). Típicamente, los individuos de la especie resultante tienen gran tamaño. Es lo que se conoce como *efecto gigas*.

En la especiación por alopoliploidía intervienen dos o más especies próximas, que se cruzan para producir un híbrido (en principio estéril), que sufre un proceso de poliploidización al no separarse los cromosomas homólogos. Un típico ejemplo lo podemos encontrar en el género *Triticum*. *Triticum durum* (trigo duro) es un alotetraploide formado a partir de otras dos especies ancestrales de *Triticum*. El trigo panadero (*Triticum aestivum*) es un aloexaploide procedente de un cruce entre *Triticum durum* y una tercera especie.

Otra causa de especiación instantánea puede ser un cambio repentino de la estructura de los cromosomas. Si un individuo experimenta cambios estructurales (inversiones, traslocaciones, duplicaciones, deleciones, etc.) o mutaciones puntuales en alguno de sus cromosomas, puede aparecer esterilidad de los híbridos si se cruza con otro individuo. Por tanto, solo le quedaría la opción de la autofecundación o del cruce con otro individuo de sus mismas características cromosómicas (muy probablemente su descendencia), y a partir de ese momento comenzaría el aislamiento reproductivo.

21.1.3. Hibridación

Cuando los mecanismos de aislamiento reproductivo de una especie son todavía imperfectos puede producirse una especie nueva por el cruce de la primera con otra distinta. Los cruces entre las dos especies deben producir individuos viables y fértiles, que más pronto o más tarde desarrollarán sus propios mecanismos de aislamiento reproductivo que los harán incompatibles con las demás, incluso con las especies originarias. Estas especies originarias suelen ir perdiendo paulatinamente parte de sus poblaciones, mientras que otras partes quedan inalteradas. Esto contribuirá a crear una brecha genética que aumentará el aislamiento reproductivo con la nueva especie.

En plantas no es infrecuente la aparición de una nueva especie por poliploidía a partir de dos especies troncales. Si por azar una o las dos especies producen gametos no reducidos (sin meiosis), y estos consiguen dar lugar a un híbrido interespecífico, este tendrá una ploidía superior a la de las especies troncales, lo cual a su vez impedirá su cruzamiento con ellas. Puede suceder también algo semejante a través de fecundación entre un gameto de una especie tetraploide y un gameto no reducido de una especie diploide.

La hibridación puede ser un proceso natural, pero desde que el hombre comenzó a practicar la agricultura, y sobre todo desde que se mejoran genéticamente las plantas, la explotación por el ser humano de la hibridación con fines comerciales ha dado lugar a la rápida introducción de muchas especies nuevas que de otro modo jamás hubieran sido posibles. Para ello, los mejoradores han tenido que desarrollar técnicas que permitan eludir las barreras al aislamiento reproductivo que la naturaleza impone. Y antes aún, primero ha sido necesario conocer bien qué tipos de barreras a la hibridación interespecífica existen y cómo funcionan.

21.2. Barreras a la hibridación interespecífica

Las barreras reproductivas a la hibridación interespecífica impiden la formación de híbridos entre especies distintas, y por consiguiente la aparición de nuevas especies. Estas barreras se basan en diferencias profundas en los mecanismos reproductores de las distintas especies. Si las barreras son completas (se dan a todos los niveles de la reproducción), son generalmente insalvables de forma natural, sin intervención humana. Además de ser un medio de permitir la especiación (desde el momento en que aparecen en una población), son el mecanismo para impedir la hibridación interespecífica. El conocimiento de las diferentes barreras reproductivas interespecíficas y los niveles a los que actúan permite a los mejoradores manipularlas y conseguir híbridos interespecíficos, inviables de forma natural.

Las barreras reproductivas interespecíficas se dividen en dos grandes categorías dependiendo de en qué momento de la reproducción actúen. Si tienen lugar antes de la fecundación y la formación del zigoto, se denominan *barreras prezigóticas*. Si se presentan tras la formación del zigoto, se denominan *barreras postzigóticas*.

21.2.1. Barreras prezigóticas

Las barreras prezigóticas son todas aquellas situaciones que implican que dos especies no puedan aparearse. Previenen o reducen por tanto la probabilidad de formar zigotos híbridos. Las barreras prezigóticas tienen lugar bien antes de la fecundación, o bien en el momento en que ésta se produce.

Las principales barreras prezigóticas son el aislamiento ecológico o de hábitat, el aislamiento temporal, el aislamiento por especificidad de los polinizadores y el aislamiento gamético.

21.2.1.1. Aislamiento ecológico o de hábitat

También se le conoce como aislamiento espacial, pues se presenta cuando distintas poblaciones, pese a estar dentro un mismo ecosistema, prefieren vivir en distintos microhábitats, con diferente iluminación, temperatura, humedad relativa u otras variantes ecológicas. En pocas palabras, no pueden cruzarse porque están físicamente separadas.

21.2.1.2. Aislamiento temporal

En este caso, el aislamiento sucede porque el momento propicio para cruzarse en ambas especies no coincide en el tiempo. Se da cuando ambas especies tienen diferentes picos de actividad (diurna una y nocturna la otra) o picos de reproducción en diferentes estaciones del año (por ejemplo, una florece en invierno y la otra en otoño.

21.2.1.3. Aislamiento por especificidad de polinizadores

Este aislamiento consiste en que ambas especies presentan distinta especificidad al vector de polinización. Se da cuando las dos especies no comparten el mismo vector de polinización. Sin llegar a esos extremos, también se puede producir si hay un acoplamiento estructural imperfecto entre las flores de una especie y los polinizadores que provienen de la flor de la otra especie, portando su polen. El acoplamiento imperfecto impediría depositar en el estigma una cantidad suficiente de polen como para asegurar su germinación en niveles normales. De este modo, solo se formarían híbridos en muy pocas ocasiones.

21.2.1.4. Aislamiento gamético

En este último caso, no existiendo ninguna de las barreras anteriores, habría transferencia de polen al estigma, pero la célula huevo no es fertilizada por haber barreras de incompatibilidad polen-estigma. Estas barreras pueden ser de naturaleza física, genética o fisiológica, y tienen su origen en mecanismos de *incompatibilidad unilateral* (se permite el cruce en un sentido pero no en el contrario) o de *incongruencia*. La incongruencia o *inhibición pasiva* consiste en el bloqueo de la germinación o del crecimiento del tubo polínico pero no por la presencia de un mecanismo activo de inhibición, sino simplemente porque no hay adaptación mutua entre polen y pistilo receptor. La incongruencia se debe sencillamente a la ausencia de información genética complementaria en una parte sobre un carácter relevante para la compatibilidad presente en la otra parte. Puede darse a varios niveles:

- en la superficie del estigma, antes de que entre el tubo polínico. Tendría un efecto semejante al de la autoincompatibilidad vista en el tema 9, impidiendo la germinación del polen.
- en los tejidos del estigma y/o el estilo. En este nivel se actuaría sobre el crecimiento del tubo polínico, impidiendo su llegada hasta el óvulo. Puede deberse entre otras causas a una lenta velocidad de crecimiento, a una excesiva longitud del estilo o a que el tubo polínico se degrade en el estilo, pero en cualquier caso, el ovario abortaría antes de que el tubo polínico alcanzase la base del estilo.
- dentro del ovario y el saco embrionario. En este caso se dificultaría o impediría la fecundación. Por ejemplo, por falta de señalización por parte de las sinérgidas para atraer al tubo polínico.

21.2.2. Barreras postzigóticas

Las barreras postzigóticas tienen lugar una vez se ha formado el zigoto, y comprenden todas aquellas situaciones que afectan al normal desarrollo del zigoto o del individuo híbrido entre dos especies, reduciendo su supervivencia, su eficacia biológica o su capacidad reproductiva. Se sabe mucho menos de ellas que de las prezigóticas, pero sí se sabe que prevalecen más que las prezigóticas, y

que muchos de los cruces que presentan barreras prezigóticas, suelen presentar también postzigóticas por si se superan las primeras.

Las barreras postzigóticas pueden presentarse a distintos niveles, pero lo más frecuente es que se manifiesten en forma de inviabilidad de los embriones híbridos, acabando en el aborto de los óvulos fecundados en distintas etapas del desarrollo del embrión, lo que además implica la no formación de semilla. A su vez, la inviabilidad de los embriones puede deberse a tres causas principales:

- *Problemas en el desarrollo del embrión*. Estos problemas pueden darse por alteraciones en el desarrollo (embriones ectópicos, de pequeño tamaño), por presencia de genes letales, por desequilibrio génico en el embrión o por eliminación de cromosomas de uno de los parentales durante la embriogénesis, como vimos en el tema 20. Si la eliminación es total obtendremos individuos haploides, como ya sabemos, y si es parcial obtendremos híbridos asimétricos, en los que los genomas de los parentales están desigualmente representados.
- *Problemas en el desarrollo del endospermo*. Estos problemas suelen consistir en un desarrollo anormal en general, o bien un desarrollo normal hasta un punto, y luego degenera y muere. Algunas veces se observa que el embrión falla y el endospermo progresa adecuadamente (semillas de apariencia normal pero sin embrión). Pero cuando falla el endospermo, seguidamente falla el embrión.
- *Aparición de interacciones negativas entre el saco embrionario y el tejido ovular circundante*. Esto puede ser otra causa de aborto, por ejemplo, cuando en algunas ocasiones empiezan a proliferar descontroladamente células del tejido nucelar o de los integumentos.

Otras causas menos comunes pueden ser la esterilidad genética de los híbridos, la ausencia de floración de los individuos híbridos, la esterilidad cromosómica o segregacional de los híbridos (fallos en la recombinación), o incluso el deterioro de la segunda (o posterior) generación híbrida o de los retrocruces.

21.3. Barreras a la hibridación intraespecífica

Además de la incompatibilidad interespecífica, puede también existir incompatibilidad reproductiva intraespecífica. Por ejemplo entre flores de una misma planta. Es lo que se denomina autoincompatibilidad. Vimos en el tema 9 que la autoincompatibilidad es la incapacidad de una planta hermafrodita con gametos funcionales para autofecundarse tras haberse autopolinizado. Vimos también que la autoincompatibilidad es un importante mecanismo para favorecer la polinización cruzada (alogamia) y asegurar la producción de nuevas combinaciones genéticas en la población, la variabilidad de la especie, y en consecuencia la posibilidad de sobrevivir a los cambios de medio ambiente. Hasta tal punto es relevante la autoincompatibilidad que se estima que en torno al 50% de

las plantas con flores conocidas son autoincompatibles. No es por tanto extraño encontrarnos con que muchas especies de gran interés agronómico son autoincompatibles, es decir, presentan barreras genéticas y fisiológicas que impiden o la germinación del propio polen o el desarrollo de su tubo polínico. Se consideran pues barreras prezigóticas. En el tema 9 vimos una serie de mecanismos que la planta utiliza para asegurar la autoincompatibilidad (diclinia, separación espacial, maduración en tiempos distintos, heterostilia, mecanismos genéticos de autoincompatibilidad homomórfica como el determinado por el locus S de autoincompatibilidad, etc.).

Además de su papel en la naturaleza, estos mecanismos de autoincompatibilidad o la incongruencia también pueden ser una útil herramienta para los mejoradores, pues son un eficiente sistema de control de la polinización en la producción comercial de semillas híbridas. Sin embargo, en muchas otras ocasiones la autoincompatibilidad o la incongruencia suponen un serio problema. Por ejemplo, cuando se desea autofecundar de forma recurrente para aumentar el grado de homozigosis de una población. Esta técnica es esencial para la obtención de líneas puras mediante métodos clásicos de mejora. Por tanto, al igual que sucede con las barreras a la hibridación interespecífica, es muy deseable contar con estrategias de superación de la autoincompatibilidad. Las veremos en lo que resta de este tema.

21.4. Superación de barreras reproductivas

Todas las barreras reproductivas que hemos visto son un factor limitante de gran importancia a la hora de crear variedades híbridas. Superarlas es un reto de la mejora genética. Por ello, se han diseñado distintas estrategias para tratar de superarlas. Según el tipo de barrera de que se trate, la estrategia de superación es distinta. A continuación expondremos las técnicas más importantes de entre las utilizadas para la superación de barreras reproductivas.

21.4.1. Superación de barreras físicas y temporales

El problema más importante al cruzar dos especies distintas o dos variedades de una misma especie es que estas presenten barreras físicas y/o temporales. Es decir, que florezcan en zonas o momentos distintos. La forma de superar esta barrera es bien sencilla: almacenar polen de una de ellas en condiciones adecuadas, manteniendo sus propiedades germinativas, y utilizarlo para polinizar la otra en el momento y/o lugar en que esté preparada para ello. En el tema 18 vimos que la conservación de polen es posible en bancos de polen con los medios necesarios para mantener su calidad germinativa. Estos bancos tienen diversas utilidades, siendo precisamente esta una de las principales. Para más información sobre las distintas técnicas de conservación de polen, consultar el tema 18.

21.4.2. Superación de otras barreras prezigóticas

Aunque la separación espacial o temporal es la principal forma de aislamiento que tienen las especies vegetales, existen ocasiones en que estas barreras no están presentes, pero operan otras. No es tampoco infrecuente que estas otras operen además de las espaciales o temporales. En cualquier caso, antes de comenzar con un programa de cruces es recomendable analizar una serie de factores para asegurar el éxito en la superación de las barreras.

En primer lugar, hay que probar distintos genotipos de una misma especie o variedad para ver cual es la que presenta menores barreras. No hay que olvidar que las barreras pre y postzigóticas a la cruzabilidad son un carácter controlado genéticamente, por lo que el genotipo juega un papel decisivo.

Además, conviene asegurarse de que el polen es viable. No sería nada agradable comprobar que nuestros cruces no funcionan pero no por culpa de las barreras a la hibridación, sino porque partimos de un polen inviable. Para determinar la viabilidad y el vigor del polen existen diferentes técnicas, que vimos en el tema 18. Por la misma razón, también interesaría estar seguros de que el estigma es receptivo en el momento de la polinización.

Una vez tenemos claros estos factores, ya estamos en condiciones de abordar la superación de las barreras prezigóticas utilizando un amplio abanico de técnicas. Muchas de ellas están basadas en el cultivo in vitro. De hecho, la aplicación de las técnicas de convencionales de cultivo in vitro a células o tejidos involucrados en la reproducción sexual ha sido una valiosa herramienta para la producción de híbridos interespecíficos e intergenéricos, o para la superación de barreras reproductivas derivadas de la autoincompatibilidad. Ejemplos de estas técnicas son la polinización in vitro sobre estigmas, placentas u óvulos, como veremos a continuación. Otras técnicas consisten en cruces o tratamientos in situ, en la planta, técnicamente menos complicadas en principio. Como regla general, si no se tiene clara la naturaleza de la incompatibilidad, es preferible comenzar con las técnicas más sencillas, y solo si no funcionan pasar a alternativas más complejas técnicamente.

21.4.2.1. Aplicación de reguladores de crecimiento y otros agentes químicos

En ocasiones, el aborto del embrión se da porque los tubos polínicos crecen demasiado lentamente y la flor no percibe a tiempo que ha sido polinizada. Así, se disparan en ella los procesos de senescencia y abscisión (ver tema 5, sección 5.7, Senescencia y abscisión), que acaban con la flor desprendiéndose de la planta polinizada. Para tratar de evitar esto se utilizan fitohormonas (auxinas, citoquiininas y giberelinas), que se aplican a la flor para:

- ralentizar la abscisión del estilo/flor, con lo que se da más tiempo para que crezcan los tubos polínicos más lentos.
- ayudar al crecimiento del embrión hasta una etapa en la que se pueda rescatar (ver sección 21.4.3.1, Rescate de embriones).

Para introducir las fitohormonas, lo primero que hay que hacer es quitar un sépalo o pétalo a la flor receptiva, en el momento de la polinización o recién polinizada. A través de la herida provocada en el pedicelo/ovario, se inoculan las auxinas, citoquininas o giberelinas, según lo que previamente se haya determinado como más efectivo para este propósito.

Una segunda opción para prevenir la abscisión prematura es el uso de inmunosupresores como el *ácido e-aminocaproico*, el *ácido salicílico* o la *acriflavina*. Se cree que las barreras prezigóticas podrían funcionar de modo análogo a las reacciones inmunoquímicas que tienen lugar en animales. Por tanto, y siempre según esta hipótesis, si tratamos el estilo con un inmunosupresor unos días antes y/o tras la polinización, podemos evitar la respuesta senescente de la flor, permitiendo la formación del embrión híbrido, que habría que rescatar tan pronto fuera posible.

Se ha documentado el éxito de esta técnica en cruces de cereales como *Triticum* x *Hordeum*, *Hordeum* x *Secale* y *Zea* x *Sorghum*. Sin embargo, y pese a que en la práctica ha funcionado, no hay evidencias claras de que existan verdaderas reacciones inmunoquímicas en los cruces interespecíficos

21.4.2.2. Uso de polen mentor

Vimos en el tema 20 que en ciertos cruces interespecíficos, la polinización con polen mentor, incapaz de fecundar por haber sido inactivado, era capaz de generar una respuesta ginogénica. Esta respuesta se basa en que el polen, inactivado pero compatible libera una serie sustancias en el estigma receptor que favorecen el desarrollo con éxito de los eventos posteriores a la polinización. Justamente este principio es el que opera también en este caso, aunque el objetivo final sea bien distinto: no inducir una respuesta ginogénica, sino zigótica. Por tanto, esta técnica, dirigida a promover la fecundación, consiste en (Figura 21.4):

- "inactivar" primero polen compatible con el estigma del individuo receptor. La inactivación puede darse como vimos mediante radiación o también con metanol, o con repetidas rondas de congelaciones y descongelaciones.
- Una vez "inactivado", mezclar este polen con el polen incompatible, el que realmente queremos que fecunde.
- polinizar con la mezcla.

De este modo, los procesos promovidos por el polen compatible beneficiarán la germinación, desarrollo de tubo y fecundación del polen inicialmente incompatible. Por ejemplo, se sabe que el polen irradiado queda estéril (el polen suele resistir altas dosis de radiación), pero puede germinar, y al hacerlo proporciona al polen incompatible sustancias de reconocimiento y de crecimiento, activa el estilo y ovario y promueve la retención del fruto. Esta técnica ha sido utilizada con éxito en hibridaciones interespecíficas dentro de los géneros *Salix*, *Populus*, *Nicotiana*, *Cucumis* y *Brassica*.

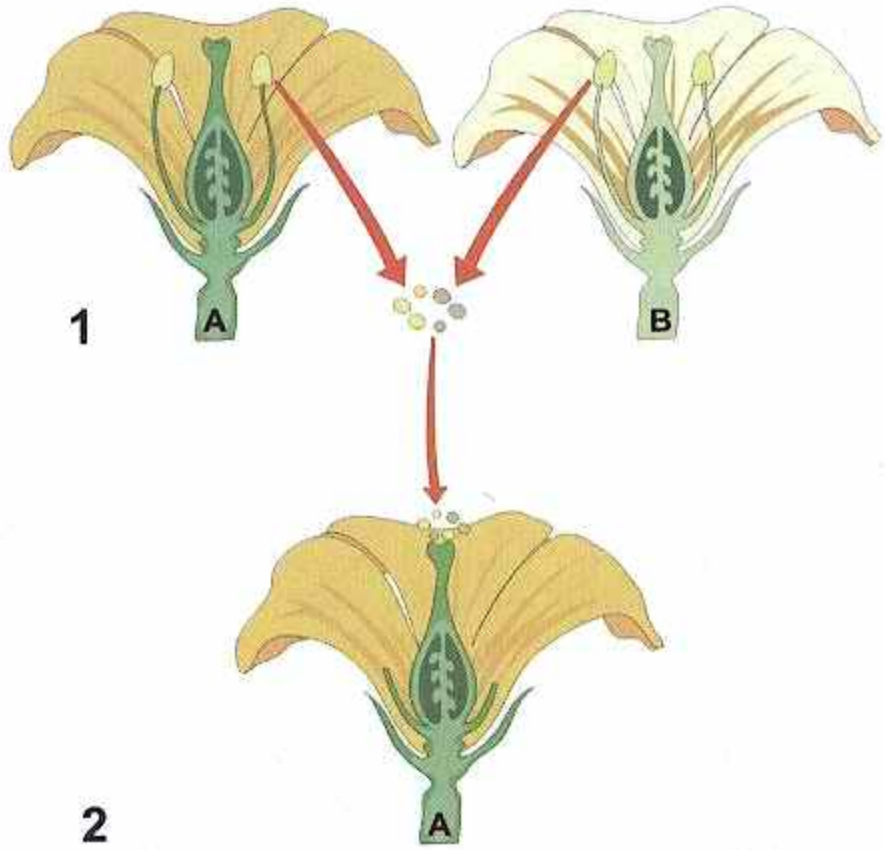


Figura 21.4: Uso de polen mentor. Para fecundar la especie A con polen de la B, se toma polen de B, se inactiva y se mezcla con el de A. Seguidamente, se aplica la mezcla sobre el estigma de la flor de A, previamente emasculada.
Modificado de imagen de Mariana Ruiz, de dominio público, en Wikimedia Commons.

21.4.2.3. Polinización de la yema

Esta es una técnica sumamente útil y sencilla para eliminar no solo las barreras de incompatibilidad interespecífica, sino también las barreras de autoincompatibilidad. Consiste tan solo en polinizar la flor inmadura (yema) antes de que se abra. Se ha utilizado con éxito en cruces del género *Nicotiana*, como *N. tabacum* x *N. rustica*, *N. tabacum* x *N. repanda* y *N. tabacum* x *N. trigonophilla*, en los que utilizando métodos convencionales de polinización se observó inhibición del crecimiento de los tubos polínicos en el estigma y/o el estilo. Polinizando la yema se vio que los tubos polínicos continuaban creciendo hasta alcanzar el estilo. Probablemente, polinizando la yema se consigue que el polen desarrolle el tubo polínico antes de que el estigma y/o el estilo estén lo suficientemente maduros para presentar barreras funcionales que inhiban el crecimiento del tubo polínico. Dada la simplicidad de la técnica, sería interesante probarla en otros tipos de cruce, quizá combinándola con el uso de polen mentor o con la adición de reguladores del crecimiento.

21.4.2.4. Polinización de estilos incompletos

Esta técnica está especialmente indicada cuando los problemas para la hibridación se dan a nivel de reconocimiento polen-estigma, sea en la incompatibilidad interespecífica o en la autoincompatibilidad. Consiste precisamente en eliminar esa parte del pistilo y polinizar in situ sobre el corte (Figura 21.5). Se corta el estigma y la primera parte del estilo, donde se producen muchos de los bloqueos del tubo polínico. De este modo se eliminan fuentes de incompatibilidad.

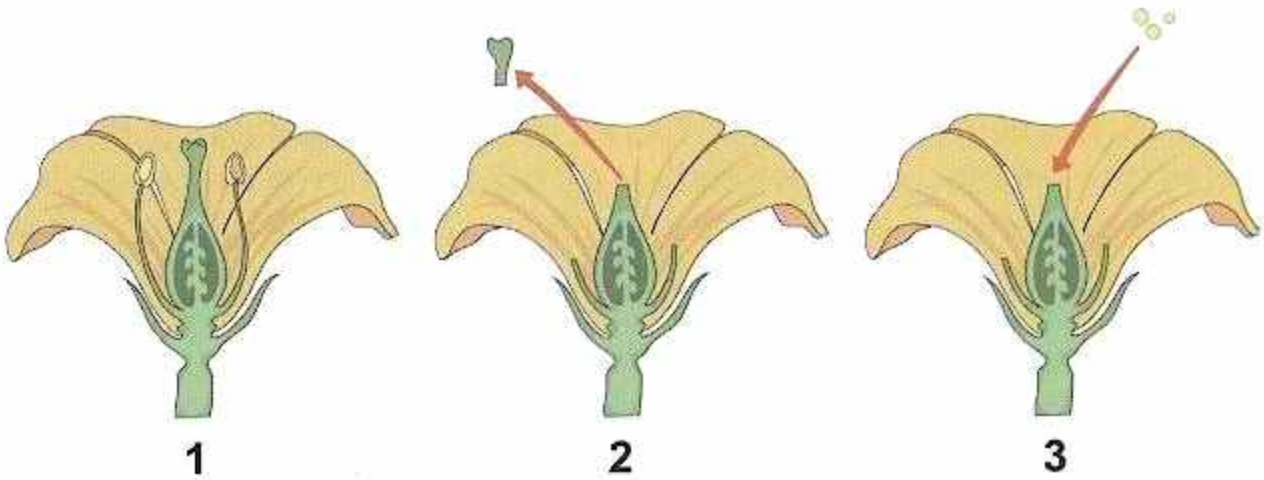


Figura 21.5: Polinización de estilos incompletos. Antes de polinizar la flor deseada (1), es necesario emascularla y eliminarle el estigma y parte del estilo (2). Entonces se podrá aplicar el polen de la otra especie (3).
Modificado de imagen de Mariana Ruiz, de dominio público, en Wikimedia Commons.

Pero además, al eliminar parte del estilo se reduce la distancia que ha de recorrer el tubo polínico. Esto es especialmente útil en cruces donde ambas especies tienen longitudes estilares muy distintas, y los tubos polínicos están adaptados a dichas distancias. Se ha utilizado con éxito, por ejemplo, en cruces de maíz con otras *Poaceae*.

21.4.2.5. Injerto estilar

Cuando la técnica anterior está claramente indicada pero no funciona porque el polen necesita ser reconocido por un estigma, se puede optar por una alternativa denominada injerto estilar (Figura 21.6). Consiste en primer lugar en polinizar un estigma compatible, que puede ser del mismo individuo donante de polen. Una vez germina el polen y comienza a emitir el tubo polínico, se corta el estigma y parte del estilo compatible, y se injerta in situ sobre el estilo incompatible, al que se le ha eliminado previamente el estigma y parte del estilo.

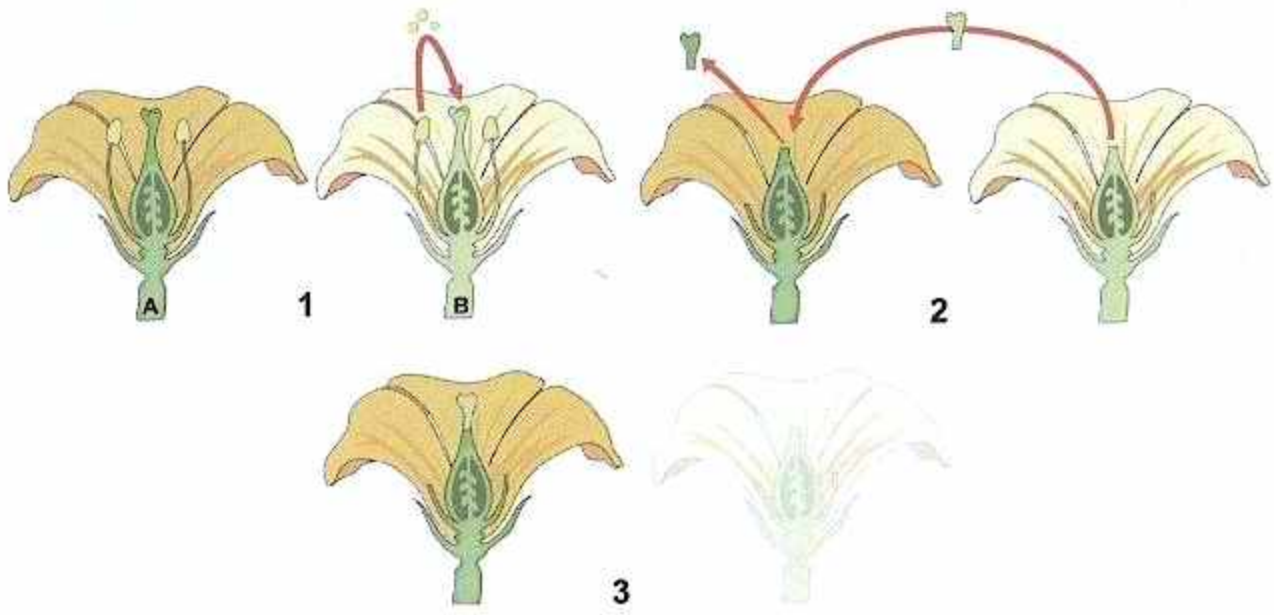


Figura 21.6: Injerto estilar. La flor A se emascula y la B se poliniza con polen compatible (1). Cuando el polen ha germinado en B, se corta el estigma y parte del estilo de A y se sustituye (injerto) por el de B (2). Por último (3), solo queda esperar que finalice el proceso de la polinización y se de la fecundación.
Modificado de imagen de Mariana Ruiz, de dominio público, en Wikimedia Commons.

Esta técnica ha sido satisfactoriamente utilizada en *Lilium*, sujetando el injerto con un fragmento de paja relleno con exudado del estigma compatible para favorecer el tránsito del tubo polínico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta es una técnica muy delicada y difícil de poner a punto in vivo, pues cada especie presentará dificultades técnicas particulares. Es especialmente compleja en especies con estilos delicados, largos y finos.

21.4.2.6. Cruces puente

La técnica de los cruces puente se usa cuando se desea obtener un híbrido entre dos especies (A y B) sexualmente incompatibles por tener diferentes niveles de ploidía. Si tratáramos de obtener el híbrido directamente, aparecerían problemas de apareamiento en la meiosis que impedirán la viabilidad del híbrido. Por tanto, lo que se hace en esta técnica es diseñar un programa de hibridaciones sucesivas entre especies intermediarias (puente), sexualmente compatibles entre sí, hasta llegar a conseguir el híbrido deseado entre las especies incompatibles. Es decir, se trata de una forma indirecta de llegar al híbrido deseado. Específicamente, lo que se haría (Figura 21.7) sería:

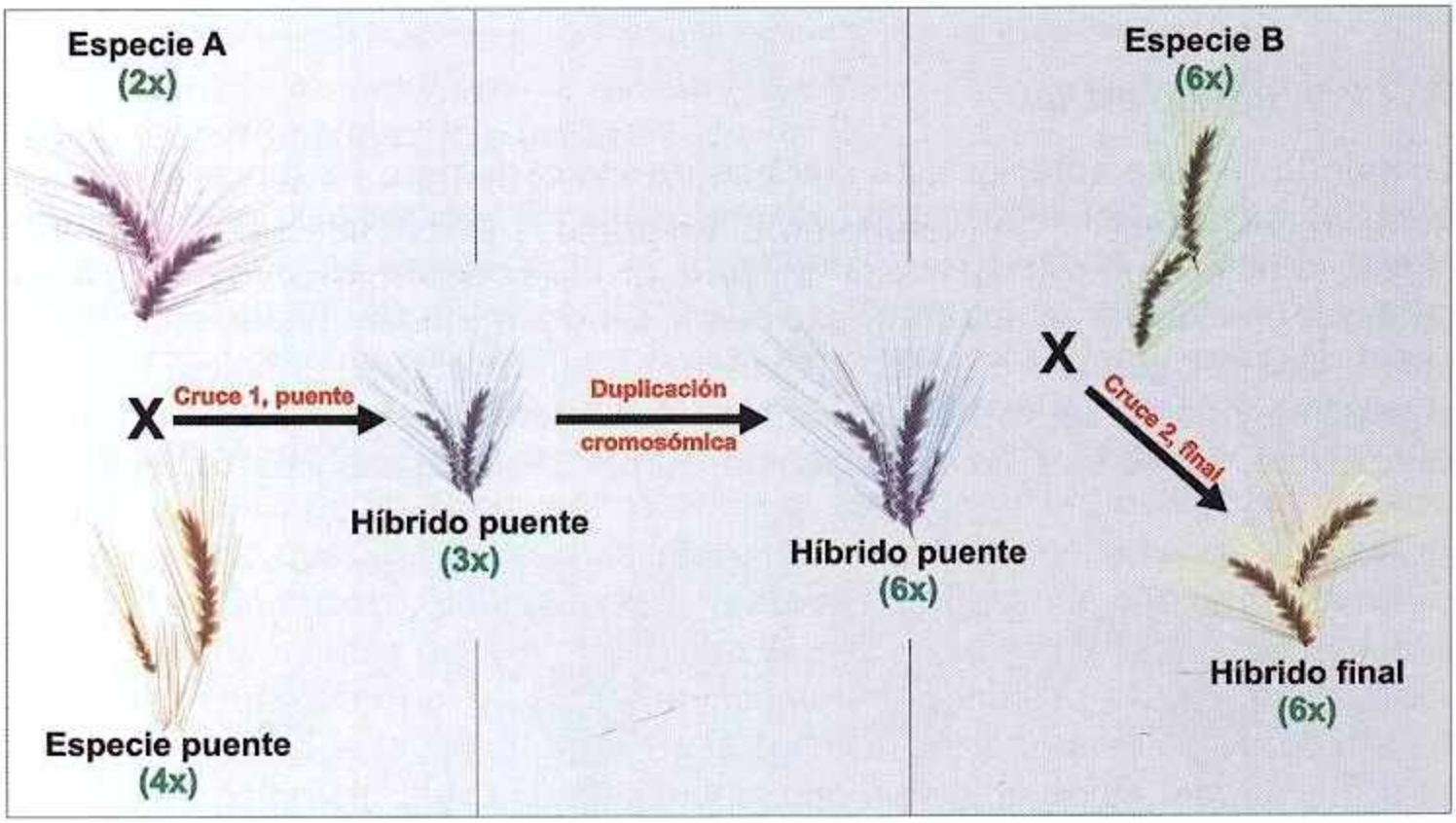


Figura 21.7: Cruces puente. Ver texto para más detalles.
Imagen de Seguí Simarro.

- Cruzar una especie cultivada (A) con otra silvestre relacionada y compatible, denominada *especie puente*.
- Del cruce se obtiene un híbrido aloploide, cuyo genoma se duplica mediante aplicación de colchicina.
- Se cruza el híbrido puente con la otra especie cultivada (B).

Esta es una técnica basada exclusivamente en métodos de mejora genética clásica (cruces y selección), que ha dado muy buenos resultados en *Brassica*, tabaco, patata, lechuga, caña de azúcar y trigo. En esta última, por ejemplo, si quisiéramos cruzar *Triticum aestivum* (6x) con *Aegilops umbellulata* (2x) poque tiene algún gen de interés, un diseño de cruce puente sería:

- Cruzar *Aegilops umbellulata* (2x) con *Triticum dicoccoides* (4x), una especie puente de *Triticum* compatible con *A. umbellulata*. El híbrido aloploide (3x) que se forma es viable y fértil. Seleccionamos aquellos que presenten los genes de interés.
- Obtener un alohexaploide del híbrido puente, duplicando su genoma 3x a 6x.
- Cruzar el híbrido puente (6x) x *Triticum aestivum* (6x), lo que nos dará nuestro híbrido deseado, viable y fértil.

21.4.2.7. Polinización estigmática in vitro

Como vimos en el tema 20 (sección 20.2.1.1), para la obtención de haploides ginogénicos mediada por polen mentor, es posible llevar a cabo este proceso in vitro. Pero además, esta técnica se puede emplear para evitar barreras de incompatibilidad localizadas en el estigma y/o estilo. Para ello se ha de emascular la flor como paso previo, y después se aisla el pistilo de la flor y se cultiva in vitro. Seguidamente, se poliniza in vitro el estigma. Pese a ser un método in vitro, técnicamente este método no tiene grandes dificultades. Depende principalmente de la dificultad que la flor presente para ser emasculada. Está especialmente indicada en casos de caída prematura de la flor.

21.4.2.8. Polinización intraovárica

Este método consiste en inyectar in situ granos de polen directamente dentro del ovario. Para ello, habrá previamente que aislar el polen y suspenderlo en un medio líquido adecuado para favorecer su germinación sin la presencia del estigma. Una variante de esta técnica es la polinización intraovárica in vitro, en la que todo el proceso es idéntico, pero se realiza sobre ovarios cultivados in vitro. Los primeros ensayos de este tipo de técnica fueron desarrollados con éxito en 1960. Kanta y colaboradores consiguieron aislar un ovario inmaduro, cultivarlo in vitro, perforarlo e introducirle polen sin germinar en la cavidad ovárica. Esta técnica se ha confirmado como útil para la obtención de híbridos interespecíficos en cruces entre *Argemone mexicana* y *A. ochroluca*. Sin embargo, no ha sido ensayada en muchos otros cruces.

21.4.2.9. Polinización ovular in vitro

En el caso de cruces en los que la barrera de incompatibilidad se encuentra a nivel del ovario, ninguna de las técnicas anteriores sería útil. Se hace en este

caso necesario rescatar los óvulos y fecundarlos in vitro. Es la técnica que se conoce como polinización ovular in vitro. El objetivo es eliminar cualquier interacción polen-pistilo y poner en contacto directo el polen con los óvulos. Por tanto, sería útil para superar cualquiera de las barreras vistas hasta ahora en este tema, incluyendo la autoincompatibilidad. De hecho, se sabe que el polen de especies autoincompatibles es capaz de germinar directamente sobre los óvulos y completar la reproducción sexual. En teoría, éste debería ser el método más efectivo para eliminar barreras prezigóticas, y combinándolo con el rescate de los embriones resultantes, también de las postzigóticas. Sin embargo, estamos ante una técnica compleja, con un porcentaje de éxito no demasiado elevado, debido a los muchos factores a tener en cuenta para asegurar el éxito de la operación.

En primer lugar, hay que considerar todas las precauciones vistas en las técnicas hasta ahora mencionadas, y todas aquellas inherentes al cultivo in vitro. Además, el aislamiento tanto de los óvulos como del polen debe hacerse en el estadio de desarrollo correcto para tener alguna garantía de éxito. Por ello, es necesario hacer un estudio morfológico previo que nos indique en qué momento del desarrollo de la flor están el polen y el óvulo listos. También hay que tener en cuenta que la composición del medio de cultivo no sólo debe ser adecuada para el desarrollo del óvulo sino también para la germinación del polen, la fecundación y el desarrollo del embrión. Para la polinización in vitro, el polen se deposita sobre los óvulos suspendido sobre una gota de medio adecuado para favorecer su germinación. Si el polen no germina bien sobre el óvulo, se induce primero su germinación in vitro (ver tema 18, sección 18.2.6) y después se aplica al óvulo. En condiciones normales, el polen germina en el óvulo en pocas horas, y a los pocos días tras la polinización tiene lugar la fecundación de los óvulos.

Esta técnica fue ensayada por primera vez en 1962 por Kanta y colaboradores, aislando directamente óvulos inmaduros de adormidera (*Papaver somniferum*) para después polinizarlos in vitro y cultivarlos hasta la obtención de embriones maduros. Estos ensayos demostraron que al menos en papaveráceas el tubo polínico era capaz de alcanzar el saco embrionario para fecundar la célula huevo, con la consiguiente formación de semilla normal en el mismo medio de cultivo. Desde entonces ha sido aplicada satisfactoriamente a otras muchas especies (hasta 14 familias de angiospermas), por ejemplo *Dianthus caryophyllus, Nicotiana tabacum, N. rustica, Argemone mexicana, Eschechlozia californica, Petunia violacea, Antirrhinum majus* o *Dicranostigma franchetianum*, además de algunas otras de los géneros *Melandrium, Silene* y distintas brasicáceas y campanuláceas. Tras 40 años de mejoras, actualmente el cultivo in vitro y polinización de óvulos aislados es cada vez más común en mejora genética vegetal no sólo porque permite cruces casi imposibles de obtener en la naturaleza, sino porque permite además seleccionar para la fecundación aquellos granos de polen que hayan sido capaces de germinar bajo condiciones de estrés térmico, salino, etc.), acelerando así la obtención de plantas resistentes. Así se hizo en maíz y *Brassica rapa*, donde se han obtenido plantas tolerantes a altas y bajas

temperaturas, respectivamente, utilizando esta estrategia. Además, lo mejor de esta técnica son las enormes posibilidades de futuro que ofrece, tanto en la mejora como en investigación básica sobre fecundación.

En el lado de las limitaciones, hemos visto que no se trata de una técnica fácil ni sencilla. Por ello, aunque esta técnica en principio supera a la vez muchas de las barreras prezigóticas, es más conveniente identificar la barrera a superar y aplicar la técnica más adecuada, sencilla, barata y eficaz en cada caso. Solo cuando las otras alternativas más sencillas fracasan deberíamos plantearnos esta.

21.4.2.10. Polinización placentaria in vitro

En los casos en que el método anterior no funciona porque el óvulo no permanece viable en cultivo, podemos tratar de evitar esto aislando los óvulos junto con un trozo de placenta. Este explante mixto se siembra en una placa de cultivo in vitro y se inocula el polen directamente en él. Para una polinización eficiente, el ovario se ha de trocear en varias partes, que se siembran de forma que los óvulos queden expuestos. Debido a esto, en la polinización placentaria in vitro los porcentajes de supervivencia suelen ser buenos, ya que los óvulos no resultan dañados durante la manipulación necesaria para su aislamiento. Como vimos en la sección 20.2.1.2 del tema 20 (para el caso de la ginogénesis), es muy importante tratar de evitar daños al óvulo. El cultivo junto con la placenta incrementa en general las posibilidades de éxito en cuanto a la formación y desarrollo del embrión. Al igual que la técnica anterior, la polinización placentaria in vitro se puede emplear para evitar barreras de incompatibilidad a nivel del estigma, el estilo, el ovario o la caída de la flor.

21.4.2.11. Fecundación in vitro

Esta técnica consiste en el aislamiento y fusión directa in vitro de los gametos masculinos y femeninos (espermátidas y células huevo), para que desarrollen un zigoto y un embrión híbrido de igual modo que lo harían in vivo. Las técnicas de polinización in vitro vistas hasta ahora (polinización estigmática, ovular o placentaria) tenían en común el hecho de que aunque los explantes eran mantenidos en cultivo in vitro, en todos los casos la célula huevo era fecundada por espermátidas liberadas por el tubo polínico imitando lo que sucede in vivo, de modo muy parecido a la vía natural. Sin embargo, la fecundación in vitro difiere de estos métodos en que la cariogamia (fusión de gametos, aislados en este caso) se logra por métodos muy diferentes al natural. Por ejemplo, mediante electrofusión, alta concentración de calcio o elevado pH.

Este método surgió como alternativa a los métodos existentes para crear nuevas especies, a fin de evitar barreras prezigóticas en los híbridos interespecíficos que no era posible superar con los demás métodos conocidos. De hecho, este método directo de fecundación implica eliminar absolutamente todas las barreras anteriores a ella, pues es justo la fecundación (inducida in vitro) el

punto de partida del método. El primer éxito en la fusión in vitro de gametos aislados data de 1989, y se consiguió en maíz (*Zea mays*). Fueron necesarios tres años más para conseguir los primeros regenerantes zigóticos, híbridos y fértiles, a partir de zigotos cultivados individualmente. Actualmente, al menos en maíz ya es posible reproducir in vitro el ciclo completo de la fecundación y embriogénesis in vitro. Por esta razón se considera el maíz como la especie modelo para el estudio de este tipo de procesos. Diez años después, en 1998 se puso a punto el cultivo de endospermo de maíz in vitro a partir de la fusión de espermátidas y núcleos secundarios aislados. Quedaba demostrado que es posible generar in vitro el embrión zigótico y el endospermo a partir de las células sexuales (gametos y núcleos polares) que los originan in vivo.

El hecho de abordar directamente la fusión de los gametos implica que hay que tener un gran cuidado en la manipulación y un gran conocimiento del sistema con el que estamos trabajando. Así, es necesario previamente conocer exhaustivamente la morfología floral de la especie para poder localizar el saco embrionario y las células que se desean aislar. En segundo lugar hay que aislar los gametos masculinos de los granos de polen. Esto suele hacerse sometiendo al grano a choques osmóticos y/o de pH. En tercer lugar se aislaría el saco embrionario y la célula huevo mediante micromanipulación del tejido ovular, previamente tratado enzimáticamente (con celulasas) para debilitar la pared celular. Este paso es crítico y muy limitante, ya que son muy pocos los gametos femeninos que se obtienen, pues el proceso de manipulación es muy delicado, y es imprescindible no dañarlos. Un tratamiento previo del ovario no polinizado con 2,4-D puede facilitar el proceso, pues induce la expansión del ovario dando ovarios más grandes y óvulos más blandos (al menos en maíz). Esto facilita el aislamiento de los gametos femeninos. Para la fecundación propiamente dicha (la fusión de los núcleos de ambos gametos) se utilizan dos métodos: microinyección de células o núcleos espermáticos aislados en células huevo individuales extraídas de los sacos embrionarios, o electrofusión de espermátidas y células huevo. En este último caso, ambos gametos son tratados como si fueran protoplastos, que se ponen en contacto en una cámara de electrofusión y se fusionan mediante pulsos eléctricos. En maíz, la fusión de los gametos suele ser rápida (aproximadamente 10 segundos), y a los 20 minutos deja de visualizarse el núcleo masculino. Los productos de fusión son cultivados en un medio con células nodrizas hasta que algunos de ellos desarrollen embriones. 20 horas después es posible observar mediante contraste de fases la presencia de dos núcleos ya zigóticos, semejantes a los que se observan in vivo.

Como en otros casos, no hay que olvidar que estamos ante una técnica que está todavía en una fase de desarrollo muy experimental, en cuanto que se ha probado con éxito para fecundaciones intraespecíficas, como el caso del maíz o del trigo, y solo en algún caso aislado funciona con fecundaciones interespecíficas, aunque en general los zigotos abortan. También en este caso, lo mejor de la técnica es el enorme potencial en mejora cuando se extienda esta tecnología.

21.4.3. Superación de barreras postzigóticas

En ocasiones, la fecundación transcurre normalmente, pero el embrión no alcanza la madurez debido a problemas de incompatibilidad con el endospermo que le nutre y protege, o de desarrollo del propio embrión que impiden una nutrición normal. Estas son principalmente las causas de lo que se conoce como barreras postzigóticas. Para superarlas, se utilizan principalmente dos técnicas, el cultivo in vitro de embriones rescatados de la semilla, y el cultivo in vitro de óvulos fecundados. De entre ellas, la primera es la más importante y extendida, con diferencia. Los cultivos de embriones y óvulos fecundados se han utilizado como estrategias para:

- la superación de barreras postzigóticas relativas a la inviabilidad del embrión.
- la superación de la latencia y de problemas relacionados en semillas, donde en algunas de ellas la presencia de inhibidores del desarrollo del embrión, bien en el endospermo o en el episperme, pueden retardar excesivamente la germinación del embrión. En otros casos (en leñosas sobre todo) algunas especies producen semillas de difícil germinación (como en *Taxus mairei*), en muy poca cantidad (como en *Pseudotsuga macrolepis*), o de viabilidad muy baja (como en yuca -*Manihot esculenta*- y otras especies del género *Manihot*) y el rescate de embriones es una interesante alternativa.
- la superación de problemas de abscisión precoz del fruto.
- estudios básicos de biología del desarrollo, ya que esta técnica permite analizar la embriogénesis in vitro, sin la interferencia del tejido materno.

21.4.3.1. Rescate de embriones

De entre todas las aplicaciones que acabamos de mencionar, el rescate de embriones ha desempeñado un papel particularmente importante en la producción de híbridos interespecíficos e intergenéricos. El rescate de embriones consiste en aislar el embrión del óvulo antes de que aborte y continuar su desarrollo in vitro (Figura 21.8). De entre las técnicas de superación de barreras postzigóticas, esta está especialmente indicada cuando la barrera se encuentra en la relación del embrión con el endospermo formado, bien por ser incompatibles, o porque el endospermo no se desarrolla normalmente (como sucede en cruces de cultivares diploides y tetraploides de *Citrus*), o cuando el endospermo se degrada tras la fecundación (como en *Oenothera biennis* x *O. muricata*, o en *O. biennis* x *O. lamarckiana*).

Se trata de una técnica relativamente fácil de aplicar en embriones maduros, con tasas de éxito elevadas. En cambio, las dificultades son mayores cuanto más inmaduro es el embrión a rescatar, ya que es mucho más delicado y sus requerimientos nutritivos son más complejos al principio que al final del desarrollo del

Figura 21.8: Rescate de embriones. Con las pinzas de la izquierda, el operario sujeta una semilla híbrida interespecífica de trigo con *Thinopyrum intermedium*. Con la lanceta de la derecha ha extraído el embrión prematuro para rescatarlo en medio de cultivo in vitro.
Imagen de Lee R. DeHaan bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported

embrión. De hecho, desde el punto vista nutricional se distinguen dos fases en el desarrollo embrionario: una primera fase *heterotrófica* en la que el embrión depende del endospermo y demás tejidos maternos circundantes, y una segunda fase *autotrófica*, en la cual el embrión es capaz de sintetizar las sustancias requeridas para su crecimiento a partir de sales minerales y azúcares. La transición de unos mayores a unos menores requerimientos nutricionales varía con las especies, pero en cualquier caso este cambio hace que sea imprescindible la transferencia de los embriones in vitro, de un medio de cultivo a otro para garantizar un crecimiento adecuado.

Otro factor importante es la presión osmótica. Se sabe que una alta presión osmótica previene la germinación precoz de los embriones inmaduros, evitando así la aparición de malformaciones estructurales. Conforme van creciendo, los embriones han de ser transferidos a medios con concentraciones progresivamente menores de sacarosa. La sacarosa del medio de cultivo no sólo funciona como fuente de carbono rápidamente asimilable, sino que además regula la osmolaridad necesaria para cada etapa del desarrollo. Al ser metabolizable, el embrión la va consumiendo y gradualmente su efecto en la presión osmótica disminuye.

En cuanto al papel de las fitohormonas, no parece que haya una excesiva dependencia, como sucede con otros procesos que transcurren in vitro. Más allá del papel del ácido indolacético, y del etileno y el ácido abscísico en la maduración y la latencia (ver tema 11), el desarrollo embrionario in vivo no se caracteriza por una extraordinaria dependencia de los reguladores del crecimiento. Algo semejante suele suceder en los medios de rescate de embriones zigóticos,

al igual que sucedía en los medios de cultivo de embriones androgénicos (ver tema 19). Hay que tener en cuenta que en estos dos tipos de embriogénesis in vitro los embriones no pasan por fase de latencia alguna, y germinan tan pronto como están maduros para ello.

Al ser más independientes nutricionalmente, el rescate de embriones desarrollados se puede plantear como el aislamiento directo del embrión y su cultivo hasta que germine in vitro. Esta es una opción si el aborto que se quiere prevenir sucede en etapas tardías de la embriogénesis, o si los óvulos (futuras semillas) no acaban de madurar y germinar in vitro espontáneamente. Si el aborto sucede en estadios más tempranos, también se puede optar por transplantar el embrión a endospermos en desarrollo de especies compatibles, y cultivarlos in vitro. En cambio, si el aborto se da muy pronto (etapa globular o anteriores), es muy difícil sino imposible diseccionarlos y mantenerlos in vitro debido a su reducido tamaño, su fragilidad y sus complejos requerimientos nutricionales, como hemos visto. Para estos casos, se suele optar por la técnica del cultivo in vitro de óvulos fecundados.

21.4.3.2. Cultivo in vitro de óvulos fecundados

Esta técnica consiste en rescatar los óvulos del ovario y cultivarlos in vitro para que completen su desarrollo y principalmente el del embrión que llevan dentro. El cultivo de óvulos fecundados es una técnica útil para evitar barreras de incompatibilidad postzigótica como problemas de abscisión prematura del fruto y sobre todo para la obtención de híbridos que presentan aborto del embrión en estadios tempranos del desarrollo.

El cultivo de óvulos es un procedimiento complejo aconsejable sólo en los casos en los que sea estrictamente necesario, ya que el porcentaje de éxito es muy bajo y la manipulación del material es difícil. Esto se debe a que el óvulo es una estructura muy pequeña y delicada que requiere microcirugía para su aislamiento, resultando relativamente fácil dañarla. Además, al estar muy hidratados, es muy fácil que se sequen si no se toman las precauciones debidas. Así, la manipulación ha de ser rápida y bajo iluminación fría. Cualquier fuente de luz incandescente cerca del óvulo acaba con él en pocos minutos. Además, como ya vimos para la polinización ovular in vitro, debe hacerse un estudio previo de la duración de los distintos estadios del desarrollo de los órganos a aislar para saber cuando se encuentran en el estadio adecuado para su cultivo. El óvulo presenta una gran cantidad de requerimientos nutricionales, que varían con el estadio del desarrollo del mismo y que es necesario poner a punto para cada especie a tratar. Todo ello complica aún más el método y hace que se busquen, en la medida de lo posible, vías alternativas al cultivo de óvulos aislados.

Pese a las diversas dificultades de la técnica, en algunas hibridaciones interespecíficas en patata, algodón y *Hevea brasiliensis* esta técnica se ha demostrado más efectiva que el rescate de embriones aislados. Además, el cultivo de óvulos permite alternativas como el cultivo secuencial, en el que se cultivan durante

varios días los ovarios completos 4-8 días tras la polinización, y posteriormente se extraen y cultivan los óvulos en desarrollo.

21.4.4. Obtención y fusión de protoplastos

Existe por último un método biotecnológico de eludir todo tipo de barreras asociadas a la reproducción sexual, y que consiste precisamente en no utilizar ningún tipo celular relacionado con la reproducción, sino células somáticas. Más concretamente protoplastos. Los protoplastos son células vegetales desprovistas artificialmente de pared celular (Figura 21.9). Para la hibridación interespecífica e incluso intergenérica, se aislan protoplastos de los individuos a hibridar, y se induce artificialmente su fusión. Se forma por tanto un híbrido de origen somático que se induce a proliferar en forma de callo, y sobre el callo se induce la regeneración organogénica de una planta completa.

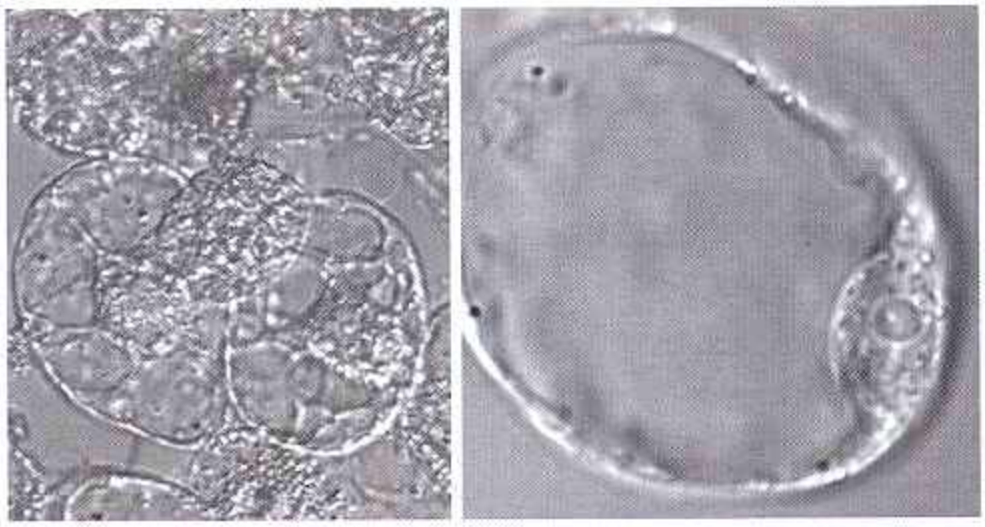


Figura 21.9: Protoplastos obtenidos de plantas de tabaco (izquierda) y *Arabidopsis thaliana* (derecha). Imágenes bajo licencia Creative Commons Attribution 2.5 Generic publicadas en Meng et al. 2009 (izquierda) y en Lorković y Barta, 2008 (derecha) respectivamente (ver sección 21.6, Información adicional).

Hace 100 años que se obtuvieron protoplastos por primera vez, mediante métodos mecánicos a partir de tejido plasmolizado, De hecho, la primera fusión de protoplastos se logró en 1909. Sin embargo, esta tecnología permaneció inexplorada hasta que en 1960 se utilizó una celulasa fúngica que abrió una nueva era para el cultivo de protoplastos. La disponibilidad comercial de enzimas degradantes de la pared celular permitió un amplio uso y desarrollo de la tecnología de cultivo de protoplastos en los años 70. La primera demostración de la totipotencia de los protoplastos fue la de I. Takebe, C. Labib y G. Melchers (1971), que obtuvieron plantas de tabaco a partir de protoplastos de mesofilo. A esto le siguió la regeneración de los primeros híbridos interespecíficos (*N. glauca* x *N. langsdorffii*), lo cual proporcionó a la mejora vegetal una valiosa herramienta para abordar la hibridación interespecífica de forma radicalmente distinta.

El gran potencial de los protoplastos radica en su posibilidad de fusión mediante agentes químicos (polietilenglicol, *PEG*) o físicos (electrofusión). Así, se pueden obtener plantas híbridas de origen somático con combinaciones nucleocitoplásmicas únicas. Por ejemplo, en 1985 se consiguió transferir cloroplastos de protoplastos de *Brassica campestris* (con genes de resistencia a la atrazina) a protoplastos de *Brassica napus* que a su vez tenían el citoplasma de *Raphanus sativus* (con androesterilidad citoplásmica). De este modo, las plantas seleccionadas contenían núcleos de *B. napus*, cloroplastos de *B. campestris* y mitocondrias de *R. sativus*. Combinaban los caracteres deseados dentro de un fenotipo de *B. napus*, y pudieron ser utilizadas para la producción de semilla híbrida. La gran limitación de esta técnica a día de hoy es la regeneración de plantas a partir de las células híbridas. Por desgracia, sólo unos pocos ejemplos como el citado se conocen en la actualidad.

21.5. Resumen

A lo largo de este tema hemos visto qué se entiende por especie desde un punto de vista reproductivo, y cómo el aislamiento de los sistemas reproductivos es la clave para la aparición de nuevas especies. Estas pueden aparecer mediante tres mecanismos principales, la cladogénesis, la especiación instantánea y la hibridación. Esta última es de especial importancia aplicada a la mejora genética, pero sucede con muy baja frecuencia en la naturaleza. Esto es debido a la presencia de una serie de barreras a la especiación que actúan a distintos niveles para impedir que se formen nuevos híbridos interespecíficos. Los principales niveles son el prezigótico y el postzigótico, es decir antes de que se forme el zigoto (fecundación) y después de que se forme. Dentro de cada uno de estos nieveles existen diversos mecanismos de prevención. Por ejemplo, el aislamiento espacial, o el temporal, o la especificidad de polinizadores, o el aislamiento gamético son barreras prezigóticas. Barreras postzigóticas son el aborto del embrión en distintas etapas de su desarrollo.

Además de estas barreras a la hibridación, existen también barreras a la autofecundación, con una función y unos mecanismos completamente distintos. Pero tanto en uno como en otro caso, en mejora genética es muy interesante dar con la forma de poder superarlas, y así poder obtener los cruces o autofecundaciones que se deseen en función de los intereses de cada programa de mejora. Para ello existe un amplio abanico de técnicas que permiten eliminar las barreras, algunas de ellas aplicables directamente a la flor en la planta. Por ejemplo, la aplicación de reguladores de crecimiento, el uso de polen mentor, la polinización de estilos incompletos, el injerto estilar, los cruces puente o la polinización a nivel de las yemas. Otras están basadas en el cultivo in vitro de células, tejidos u órganos florales, como la polinización estigmática, intraovárica, ovular o placentaria, todas ellas in vitro. Se puede también inducir la fecundación in vitro a partir de gametos individuales aislados, y también rescatar los embriones o los óvulos fecundados y llevar el resto del proceso embriogénico in vitro, en condiciones controladas. Incluso es posible la formación de nuevos

híbridos interespecíficos o intergenéricos mediante la manipulación de células somáticas desprovistas de pared (protoplastos) y su fusión artificial.

Cada técnica tiene un grado de complejidad distinto, y es útil para sortear una o varias barreras distintas. Por ello, a la hora de optar por una u otra técnica, es muy recomendable conocer bien el problema que queremos solucionar, sus bases biológicas, y la técnica a utilizar.

21.6. Información adicional.

- Barnabas B., Ponya Z. 1999. Test-tube plants as tools for crop improvement. Hungarian Agriculture Research. 2: 5-9.
- Bhojwani S.S., Razdan M.K. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition. Elsevier.
- Castano C.I., De Proft M.P. 1996. Seed set in *Cichorium intybus* L. by pollination of flowers developed in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 46: 211-218.
- Dumas C., Morgensen H.L. 1993. Gametes and fertilization: Maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. Plant Cell, 5: 1337-1348.
- Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. Disponible on-line en: http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/biotec.htm
- Faure J.E., Digonnet C., Dumas C. 1994. An in vitro system for adhesion and fusion of maize gametes. Science, 263: 1598-1600.
- Faure J.E., Aldon D., Rougier M., Dumas C. 1996. Emerging data on pollen tube growth and fertilization in flowering plants, 1990-1995. Protoplasma, 193 (1-4): 132-143.
- Gadish I., Zamir D. 1987. Differential zygotic abortion in an interspecific *Lycopersicon* cross. Genome, 29 (1): 156-159.
- Guevara C., Ospina J., Mafla G., Verdier V. 1998. Zygotic embryo culture of *Manihot esculenta* Crantz: a practical approach for the safe internacional movement of cassava seed stocks. Plant Genetic Resources Newsletter, 115:33-38.
- Hormaza J.L., Herrero M. 1996. Dynamics of pollen tube growth under different competition regimes. Sexual Plant Reproduction, 9 (3): 153-160.
- Howell S. 1998. Molecular Genetics of Plant Development. Cambridge University Press.
- Kanta K., Rangaswamy W.S., Maheshwari P. 1962. Test tube fertilization in a flowering plant. Nature, 194:1214-1217.

- Kovacs M., Barnabas B., Kranz E. 1995. Electrofused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures. Plant Cell Reports, 15: 178-180.
- Kranz E., Dresselhaus T. 1996. In vitro fertilization with isolated higher plant gametes. Trends in plant science reviews, 1(3): 82-89.
- Kranz E., Kumlehn J. 1999. Angiosperm fertilization, embryo and endosperm development in vitro. Plant Science, 142(2): 183-197.
- Kranz E., Kumlehn J., Dresselhaus T. 1999. Fertilization and zygotic embryo development in vitro. En: Cresti M., Cai G., Moscatelli A. Eds. Fertilization in Higher Plants, Springer, Heidelberg, 337-349.
- Litz R.E. 1991. «Cultivo de embriones y óvulos». En Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Eds. Roca y Mroginsky. 295-312.
- Lorković Z.J., Barta A. 2008. Role of Cajal bodies and nucleolus in the maturation of the U1 snRNP in Arabidopsis. PLoS ONE 3: e3989.Mujib A. 2004. In vitro application in crop improvement. Science Publishers. Enfield, New Hampshire, USA.
- Meng P.H., Raynaud C., Tcherkez G., Blanchet S., Massoud K., Domenichini S., Henry Y., Soubigou-Taconnat L., Lelarge-Trouverie C., Saindrenan P., Renou J.P., Bergounioux C. 2009. Crosstalks between myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in Arabidopsis. PLoS ONE, 4: e7364.
- Mol R., Matthys-Rochon E., Dumas C. 1995. Embryogenesis and plant regeneration from maize zygotes by in vitro culture of fertilized embryo sacs. Plant Cell Reports, 14: 743-747.
- Ponya Z., Timar I., Szabo, L. Kristof Z. 1999. Morphological characterisation of wheat (*T. aestivum* L.) egg cell protoplast isolated from immature and overaged caryopses. Sexual Plant Reproduction, 11: 357-359.
- Rougier M., Antoine A.F., Aldon D., Dumas C. 1996. New lights in early steps of in vitro fertilization in plants. Sexual Plant Reproduction, 9(6): 324-329.
- Takebe L., Labib C., Melchers G. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissensehaften, 58: 318-320.
- Tilton V.R., Russell S.H. 1983. In vitro pollination and fertilization of soybean *Glycine max* (L.) Merr. (*Leguminosae*). In: Pollen: biology and implication for plant breeding. Proceedings of the symposium, Villa Feltrinelli.: 281-286.
- van Tuyl J.M., de Jeu M.J., Sawhney V.K. 1997. Methods for overcoming interspecific crossing barriers. In: Shivanna K.R. ed. Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement, 273-292.

- Wang J., Xia H.J., Zhou C., Yang H.Y. 1997. Establishment of an experimental system for artificial germination and in vitro pollination with de-exined pollen in *Nicotiana tabacum*. Acta Botanica Sinica 39: 405-410.
- Zenkteler M. 1999. In vitro pollination of excised ovaries. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 41: 31-38.
- Zamir D., Gadish I. 1987. Pollen selection for low-temperature adaptation in tomato. Theoretical and Applied Genetics, 74 (5): 545-548.

TEMA 22. Biotecnología de la semilla y el fruto

En el contexto de la biotecnología de la reproducción sexual cabe mencionar el papel fundamental de las semillas y los frutos en la alimentación humana y animal y en la industria actual. Sin embargo, desde un punto de vista estrictamente reproductivo, hay que tener en cuenta que tanto unas como otros son meras estructuras accesorias de la reproducción. No son más que vehículos para proteger y asegurar la dispersión y germinación de los embriones, que es lo que verdaderamente importa a efectos reproductivos. Más allá de su utilización como alimento, las aplicaciones biotecnológicas de semillas y frutos tienen mucho que ver con su composición, con las sustancias que almacenan, y poco con sus funciones biológicas. Pero no por ello dejan de tener un papel muy relevante. La explotación comercial de las semillas tiene un gran peso en la economía actual. Se utilizan semillas tanto para consumo en fresco (guisantes), secas (legumbres), tostadas (frutos secos) o procesadas para obtener carbohidratos (fundamentalmente en forma de harinas), aceites, combustibles, tejidos o plásticos. Se utilizan frutos principalmente para su consumo en fresco, como frutas u hortalizas, o para su procesado industrial en forma de salsas, bebidas (vino, sidra, zumos), encurtidos, conservas, etc. En este tema veremos algunos ejemplos de estas aplicaciones.

Sin embargo, la aplicación biotecnológica "estrella" es, como en el resto de campos de la biotecnología, la transformación genética. A día de hoy se han realizado innumerables experimentos para obtener frutos y semillas mejorados mediante transgénesis. A continuación veremos algunos de los ejemplos más relevantes, pero sin entrar en excesivos detalles. La única relación que estos ejemplos tienen con la biología reproductiva es que la transformación repercute en el fruto y la semilla. Pero ni la técnica en sí de la transformación genética tiene relación con la biología reproductiva, ni se utiliza ni manipula ningún proceso reproductivo. En estos casos, el objetivo es mejorar un producto que va a ser destinado a su consumo en fresco o a su procesado industrial. Esto queda muy lejos del ámbito de la reproducción sexual, y lógicamente existen muchas otras obras (algunas de ellas citadas en la sección 22.8, Información adicional) donde se cubren estos aspectos con mucho más detalle y extensión.

22.1. Obtención de frutos y semillas con cualidades organolépticas o nutracéuticas mejoradas

Al igual que sucede con las semillas, los frutos frescos son esenciales para la alimentación humana. Aunque en menor medida que las semillas, tienen también un papel industrial relevante como procesados. Sin duda, la principal manipulación biotecnológica de los frutos y las semillas se da en el ámbito de la transformación genética. Son innumerables los grupos de investigación que hoy en día se dedican a la producción de plantas transformadas genéticamente que poseen cualidades nuevas o mejoradas, siempre con el objetivo de que las plantas se adapten mejor a los intereses de los agricultores, distribuidores o

consumidores. En este sentido, los eventos de transformación mas utilizados han sido aquellos que confieren a la planta nuevas fuentes de resistencia frente a enfermedades o plagas frecuentes en los cultivos (Figura 22.1). Una segunda línea de trabajo ha consistido en el desarrollo de plantas resistentes a condiciones extremas, como la sequía, la salinidad o la acidez del suelo. Pese a ser aplicaciones biotecnológicas de suma relevancia, no tienen ninguna relación con la reproducción vegetal. Por ello no nos extenderemos más sobre ellos.

Figura 22.1: Ciruelas transgénicas resistentes a la enfermedad de la *sharka*, causada por el *plum pox virus*.
Imagen de Scott Bauer, del USDA Agricultural Research Service, Bugwood.org, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0.

Una vez se vio que la creación de plantas más resistentes era posible, podríamos decir que los esfuerzos de la comunidad científica se encauzaron en otra dirección, hacia la obtención de otro tipo de plantas transgénicas que tuvieran características nutricionales y organolépticas mejoradas. Que no solo fueran beneficiosas para el agricultor, sino también para el consumidor. En otras palabras, el objetivo fue obtener frutos y semillas (que en la mayoría de los casos son la parte consumible de la planta) con mejores propiedades. Aunque la transformación genética en sí no tiene relación con la reproducción, en este caso sí está relacionado con ella el objetivo final de la transformación: la obtención de mejores frutos y/o semillas. A lo largo de esta sección veremos algunos ejemplos relevantes de cómo se han desarrollado algunas de estas líneas de investigación encaminadas a generar mejores frutos.

En algunos casos, el mayor y mejor conocimiento del metabolismo de las plantas permite mejorar los productos sin necesidad de añadir ninguna característica nueva, tan solo mejorando las que ya hay, sus propias características. El tomate es un buen ejemplo en el que se ha conseguido mejorar su textura y consistencia retardando su maduración. Es el caso de los tomates *Flavr Savr*, que revolucionaron el concepto que se tenía de la mejora vegetal en la década de 1990.

22.1.1. Los tomates Flavr Savr

Uno de los principales problemas que tiene la comercialización del tomate en fresco es su poca vida postcosecha. Una vez alcanzan el punto óptimo de maduración, en pocos días se pasan de maduración, se reblandecen demasiado y se pudren. Para un consumo local, donde la distancia que recorre el tomate no es excesiva, la maduración del tomate no supone un gran problema. Pero el transporte a zonas muy alejadas del lugar de origen sí da lugar a muchos problemas. En ocasiones, los tomates llegan más allá de su maduración óptima. Otras veces, hay que cosecharlos muy verdes para que no lleguen pasados, pero esto les hace perder calidad. Además, su consistencia blanda hace que transportes y almacenamientos prolongados acaben dañando un número importante de ellos, que hay que descartar. En un intento de solucionar todos estos problemas, en 1992 la compañía biotecnológica Calgene lanzó los tomates *Flavr Savr*.

Estos tomates portan una modificación genética que hace que se ralentice el proceso de ablandamiento natural que acompaña a la maduración. La compañía aducía que esto, además de mejorar su resistencia al transporte, permitía que el tomate pasara más días en la mata, lo cual redundaba en más sabor, sin comprometer la consistencia lo suficientemente firme como para ser comercializado. El ablandamiento de los tomates maduros se debe, como en muchos otros frutos, a la degradación de las pectinas de las paredes celulares por un enzima, la *poligalacturonasa* (PG). Por tanto, una solución para evitar o retrasar el ablandamiento y permitir un fruto más firme durante más tiempo sería reducir los niveles endógenos de poligalacturonasa. En los tomates Flavr Savr, los científicos de Calgene utilizaron la técnica del ARN antisentido para lograr sus propósitos. Aislaron el gen de la PG de tomate, invirtieron el orden de su secuencia, y diseñaron un gen antisentido con ella. De este modo, al tiempo que las células transcriben los genes de la PG, también hacen lo propio con los genes "anti-PG". Los transcritos de ARN así generados se aparearán entre ellos, pues se complementan perfectamente, y quedará anulado (silenciado) el transcrito de la PG, lo cual impedirá la síntesis de nueva PG. Se comprobó que los tomates así obtenidos tardaban más en reblandecerse y perder la consistencia, y se alargaba el periodo de conservación y almacenamiento del fruto en buen estado.

22.1.2. Otras líneas de investigación en tomate

El tomate ha sido una de las especies más estudiadas y utilizadas en experimentos de transformación genética. Con un objetivo similar al de los tomates Flavr Savr se han desarrollado otros tipos de tomates, aunque partiendo de la manipulación de otros aspectos de la fisiología de la maduración del tomate. Por ejemplo, hace unos años se obtuvieron unos tomates de maduración retardada (Figura 22.2) de forma muy similar a la que vimos con las flores de corte en el tema 16, sección 16.2.3, es decir, suprimiendo la expresión de la enzima ACC sintasa, enzima involucrada en la ruta de biosíntesis del etileno.

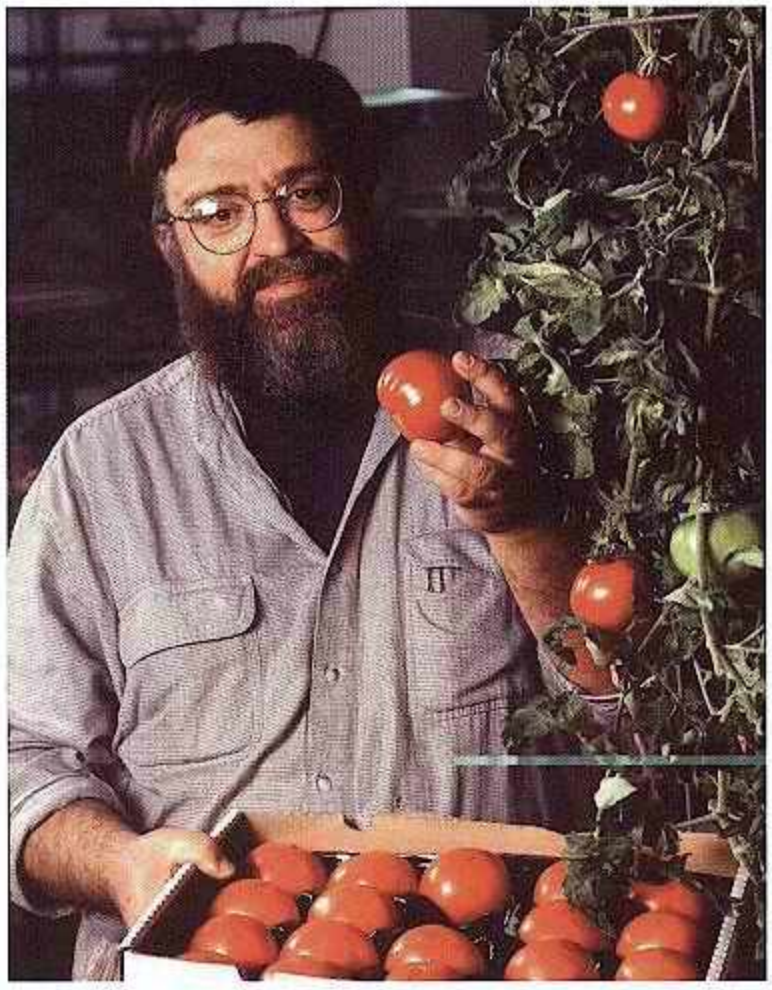


Figura 22.2: Tomates modificados para inhibir la síntesis de etileno. En la imagen aparece el Dr. Athanasios Theologis con su creación, los tomates de maduración retardada.
Imagen de Jack Dykinga, de dominio público en Wikimedia Commons.

Además de las ya vistas, otras líneas de investigación en tomate tratan de mejorar sus cualidades organolépticas y/o nutritivas, su sabor u otras propiedades mediante la inserción de genes de otras especies que promueven la síntesis de nuevas moléculas, por supuesto beneficiosas. Un ejemplo es la mejora de los tomates que se destinan para el procesado industrial, para obtener salsas de tomate, sopas, pastas, o ketchup. En estos tomates la modificación genética busca aumentar el contenido en sólidos, solubles e insolubles, en licopeno (el pigmento responsable del color rojo del tomate), el grosor de sus paredes, la viscosidad de la pulpa, el sabor, el color o el contenido en vitaminas. Como ejemplo en tomates para consumo en fresco, podemos mencionar la mejora del sabor, y también de su dulzura (contenido en azúcares), el color y las propiedades nutracéuticas. Un ejemplo concreto de esto es el de los *tomates morados* (Figura 22.3) obtenidos en el John Innes Centre del Reino Unido. Gracias a la introducción de un gen para la síntesis de antocianinas procedente de otra planta rica en ellas, los tomates lucen un sorprendente color morado oscuro. Pero además, y esto es lo importante, eran ricos en antocianinas, moléculas con múltiples propiedades beneficiosas para la salud humana, de entre las que destaca su efecto anticancerígeno.

Figura 22.3: *Tomates morados*, que expresan un gen que permite la síntesis de antocianinas. La acumulación de antocianinas es lo que les proporciona su color característico, además de otra serie de propiedades saludables. Los tomates rojos de las imágenes son tomates convencionales, sin modificación genética.
Imágenes de Sue Bunnewell and Andrew Davis, cortesía de Cathie Martin, del John Innes Centre, Reino Unido.

22.1.3. El arroz dorado

Más allá del tomate, quizás el paradigma de las plantas modificadas para obtener frutos o semillas con mejores propiedades nutritivas sea el *arroz dorado*. El arroz dorado ha sido pionero en su campo. Por sus muchas e importantes implicaciones sociales, económicas y políticas, ha sido el ejemplo más popular y el más estudiado desde muchas perspectivas. El arroz dorado (*Golden rice*) es una variedad de arroz diseñada por el científico suizo Ingo Potrykus y el alemán Peter Beyer para que sintetice y acumule en el grano comestible beta-caroteno y otra serie de precursores de la vitamina A, necesarios para que el organismo del ser humano produzca dicha vitamina. El beta-caroteno es el responsable del color naranja de las zanahorias y también de que este arroz tenga el color anaranjado-dorado que le da nombre (Figura 22.4).

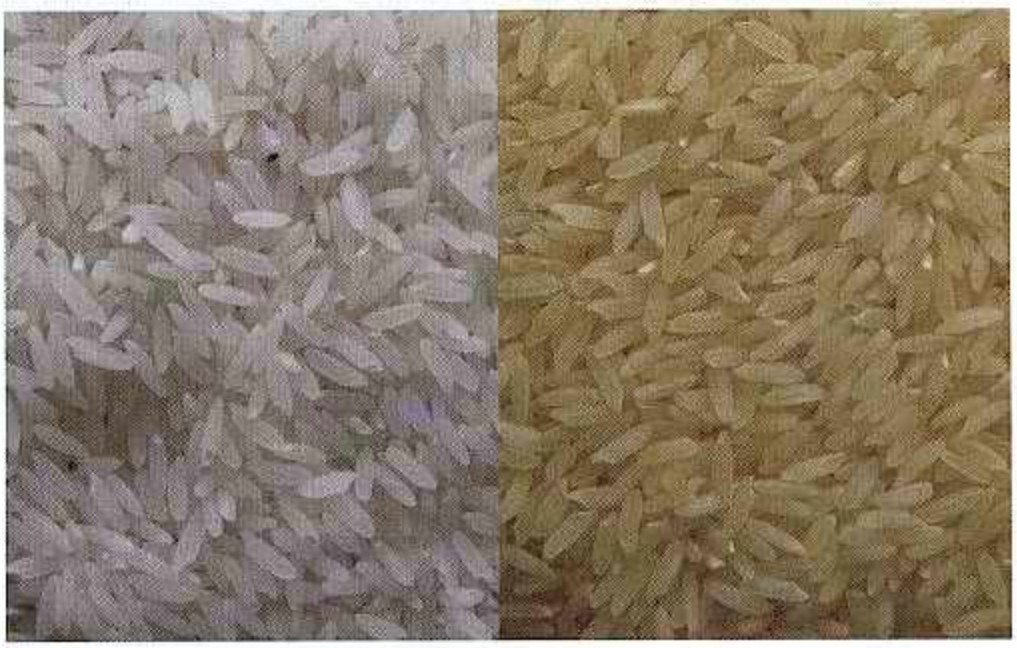


Figura 22.4: Arroz dorado (izquierda) y arroz convencional (derecha).
Imágenes cortesía de *The Golden Rice Project* (http://www.goldenrice.org), reproducidas con autorización.

La idea motora de este proyecto era ayudar a determinados países a solucionar algunos de sus problemas endémicos: el déficit de vitamina A y los problemas de salud que ello acarrea. Algunos países, sobre todo del sudeste asiático, basan su alimentación desde hace milenios en el arroz y sus derivados. Una alimentación muy basada en el arroz conlleva déficits en determinadas sustancias esenciales para una buena salud. La falta de vitamina A en la población infantil es un hecho en el sudeste de Asia y ciertas áreas de África y Latinoamérica, y tiene graves consecuencias. Entre ellas, la ceguera. Para tratar de solucionar estos déficits, lo más lógico, efectivo y saludable es concienciar a la población para que adopte una dieta con mucha verdura fresca y huevos. Pero la realidad es que muchos de estos países son pobres y el acceso a la verdura fresca es difícil, sobre todo por parte de los sectores precisamente más afectados por estas carencias. Además tienen unos hábitos alimenticios basados en el arroz que son complicados de cambiar en toda la población. En este contexto, los Dres. Potrykus y Beyer tuvieron la idea de producir arroz modificado con un gen para la síntesis de vitamina A. De este modo se podría ayudar a paliar el déficit vitamínico sin alterar las costumbres alimenticias de la población. Cuatro años más tarde, en 2005, apareció una nueva variedad que aumentaba 23 veces la acumulación de beta-caroteno frente a su predecesora.

Sus creadores, no sin esfuerzo, consiguieron que la patente del arroz dorado estuviera a disposición de los agricultores más pobres de forma gratuita, sin pagar ningún tipo de regalía a las empresas involucradas, para tratar de paliar la malnutrición, su principal objetivo. En la actualidad y pese a sus ventajas, este prometedor proyecto denominado The Golden Rice Humanitarian Project sigue sin salir de su confinamiento en los laboratorios debido a la reticencia de los gobiernos a legalizar su uso. El caso del arroz dorado no es un caso aislado. Más bien al contrario, es la norma. Apenas se permiten alimentos modificados genéticamente, y los pocos legalizados suelen serlo bajo la condición de que no se destinen a consumo humano. Existe un elevado grado de rechazo por parte de la opinión pública, al que la clase política no es ajena en absoluto. Y esta es una de las razones fundamentales que ha hecho que estas líneas de investigación destinadas a un consumo final humano, aunque muy prometedoras en un principio, estén siendo progresivamente abandonadas.

22.1.4. Otros ejemplos

En otras especies podríamos citar ejemplos en la patata. Aunque la parte consumible (el tubérculo) no sea ni un fruto ni una semilla, sí es una estructura directamente implicada en la reproducción (asexual en este caso). En patata, la transformación genética se está utilizando para desarrollar tubérculos con más almidón y menos agua para evitar daños cuando son cosechadas mecánicamente. Una patata con menor contenido en agua puede absorber menos aceite cuando se fríe, por lo que sería útil para la producción industrial de patatas fritas más saludables. En maíz dulce, algunas empresas han tratado de transferir un gen para evitar la conversión de azúcares en almidón. El objetivo sería

producir un maíz que permaneciera dulce durante más tiempo tras la recolección. También en maíz se trabaja en aumentar el contenido en ácido oleico y en incrementar la producción de tipos específicos de almidón. No obstante, estos objetivos no son los habituales en maíz, donde la gran mayoría de los eventos de transformación aplicados se circunscriben a la conferencia de resistencias frente a plagas, como la del taladro mediante la incorporación de genes Bt (Figura 22.5). En soja se ha conseguido aumentar el contenido en metionina, aminoácido esencial, mejorando así su calidad nutritiva. El gen transferido procede de una planta silvestre (*Bertollatia excelsia*) que abunda en el Amazonas y que posee un alto contenido en éste y otros aminoácidos. En melón, se han desarrollado variedades de melón más dulce para el mercado de invierno. En fresas, hace unos años se trabajaba en la introducción de un gen de una especie de platija del ártico que produce un anticongelante que proteje a este pez de la congelación en las aguas heladas en las que habita. En las fresas, la idea sería que este gen les confiriera resistencia frente a las heladas, y que prolongara su vida útil en los refrigeradores domésticos, antes de que comience a reblandecerse y acabara pudriéndose.

Figura 22.5: Maíz Bt y maíz convencional. Las 8 mazorcas de la imagen estuvieron expuestas al taladro *Helicoverpa zea*. Las cuatro mazorcas de maíz Bt (a los lados) no muestran daño alguno. Las cuatro mazorcas de maíz convencional (arriba y abajo) están muy dañadas.
Imagen de Alton N. Sparks, Jr., University of Georgia, Bugwood.org,
bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 US.

22.1.5. Panorama de la modificación genética de semillas y frutos

Como acabamos de ver, a día de hoy muchas de las aproximaciones biotecnológicas para la obtención de mejores frutos pasan por la transgénesis, técnica que ha propiciado numerosísimos avances. Sin embargo, y dado el rechazo social existente en gran parte del mundo, casi todos estos avances están todavía en fase experimental, sin salir de los laboratorios. De momento, el cultivo de plantas transgénicas para utilizar sus frutos o semillas como alimento no ha sido autorizado más que en unos pocos casos concretos, de entre los que destacan el maíz o la soja. Y en muchos de estos casos se autorizan para alimentación animal, en ningún caso humana. No obstante, algunos países como la India y China, con evidentes problemas de superpoblación, ya consideran seriamente esta posibilidad, aunque con frutos de especies herbáceas. Hay que tener en cuenta una salvedad a este respecto, y es que muchos de los frutos más consumidos provienen de árboles frutales, que requieren de muchos años hasta estar en condiciones de producir frutos. Este motivo hace que a la hora de diseñar un programa de obtención de variedades frutales transgénicas, haya que esperar mucho hasta que el árbol transgénico produzca frutos.

En definitiva, los problemas de aceptación por parte de la opinión pública y por tanto de prohibición legal, hacen que en la práctica la obtención de frutos y semillas mejoradas se lleve a cabo en su gran mayoría (salvo pocas excepciones como las que acabamos de ver) mediante programas de mejora genética clásica, basadas en la hibridación y la selección, junto con aplicaciones biotecnológicas basadas en el cultivo in vitro, pero no en la transformación genética.

22.2. Obtención de frutos sin semillas

Los frutos sin semilla son demandados por los consumidores en general porque consideran que es menos molesto poder comer el fruto sin interrupciones que tener que ir separando las pepitas (duras y de difícil digestión en muchos casos) de la pulpa. Una opción es el deshuesado mecánico, pero en muchas ocasiones se altera el fruto de tal manera que quedan poco apetecibles para el consumo. Mejor si de origen se producen los frutos sin semillas. Existen muchos ejemplos en la actualidad de variedades comercializadas de frutos sin semilla. Todos conocemos las uvas (Figura 22.6), las sandías (Figura 22.8), los plátanos, las naranjas o las mandarinas sin pepitas. Hasta tal punto es importante conseguir frutos sin semillas de ciertas especies, que en cítricos la aparición de una partida con semillas puede arruinar a los agricultores. En la cuenca mediterránea, los citricultores temen lo que en la Comunidad Valenciana se denomina *la pinyolà*, que no es más que la aparición de una partida de naranjas polinizadas y por tanto con pepitas (*pinyols* en valenciano). Saben que esa partida no va a poder ser comercializada, o si lo es, será a precios ridículos, pues a los consumidores no les gustan las naranjas con pepitas. Estas son las razones por la que se trata de obtener frutos de algunas especies sin semillas. Para ello se utilizan principalmente tres aproximaciones biotecnológicas: la partenocarpia, la estenospermocarpia, y la obtención de triploides.

Figura 22.6: Uvas 'Flame' sin semillas, desarrolladas por el Agricultural Research Service del USDA de los EE.UU.
Imagen de Patrick Tregenza, de dominio público.

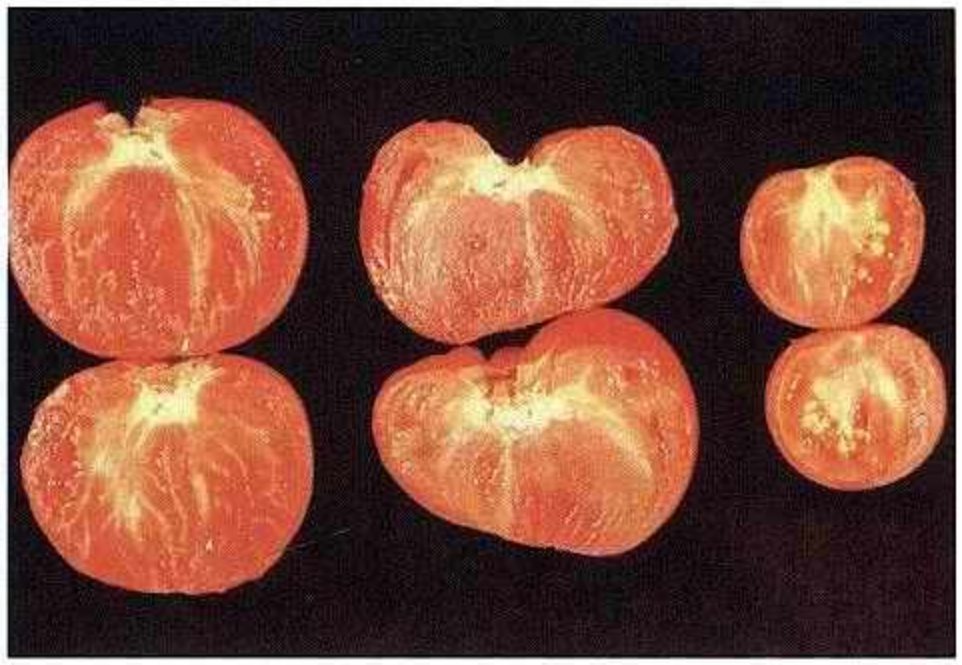


Figura 22.7: Tomate partenocárpico sin semillas, desarrollado por el Dr. Yi Li manipulando los genes que regulan los niveles endógenos de hormonas.
Imagen de la NASA de los EE.UU., sin copyright.

22.2.1. Partenocarpia

Las plantas tienen una facultad adicional relacionada con la reproducción sexual de la que se puede sacar mucho provecho. Se trata de la *partenocarpia*. Como vimos en el tema 13, la partenocarpia es la formación de frutos sin semilla. O lo que es lo mismo, frutos formados sin polinización ni fecundación previa, y por tanto sin formación de semilla ni de embrión dentro de ella. En realidad su relación con la reproducción sexual es nula, pues es obvio que sin embrión y sin semilla, no va a haber reproducción sexual. Sin embargo, la partenocarpia es un buen método de obtener frutos sin semilla.

La partenocarpia sucede en algunas especies de forma natural, y en otras es inducida por algún factor ambiental. Por ejemplo, los plátanos comestibles son frutos desarrollados de modo partenocárpico de forma natural. Otras especies, como los pimientos, desarrollan partenocarpia cuando son sometidos a bajas temperaturas. La partenocarpia también se puede inducir en algunos casos con la aplicación de hormonas como giberelinas o auxinas. Esta característica esta bajo control genético, lo cual quiere decir que si se conoce el gen o genes implicados se puede manipular la presencia o no de semillas en el fruto. De hecho, hay laboratorios que están trabajando en la identificación de los genes implicados (Figura 22.7), como primer paso para transferirlos a otras especies no partenocárpicas en principio, pero que sería deseable que lo fueran.

22.2.2. Estenospermocarpia

Se pueden también obtener frutos sin semillas o con pocas semillas mediante la *estenospermocarpia*. Es el caso de muchas de las uvas y de las sandías sin

pepitas (Figura 22.8) que en los últimos años se comercializan. En la estenospermocarpia sí hay polinización y fecundación. Sin embargo, el embrión formado aborta. En la uva de mesa sin pepitas, aborta en unos estadios muy tempranos de desarrollo, dando lugar a una semilla diminuta, apenas perceptible en el grano de uva. En el caso de la sandía, el aborto se da en unos estadios algo más avanzados, que sí generan semilla, pero blanda y pequeña, que no resulta molesta al comer la pulpa o al tragarlas.

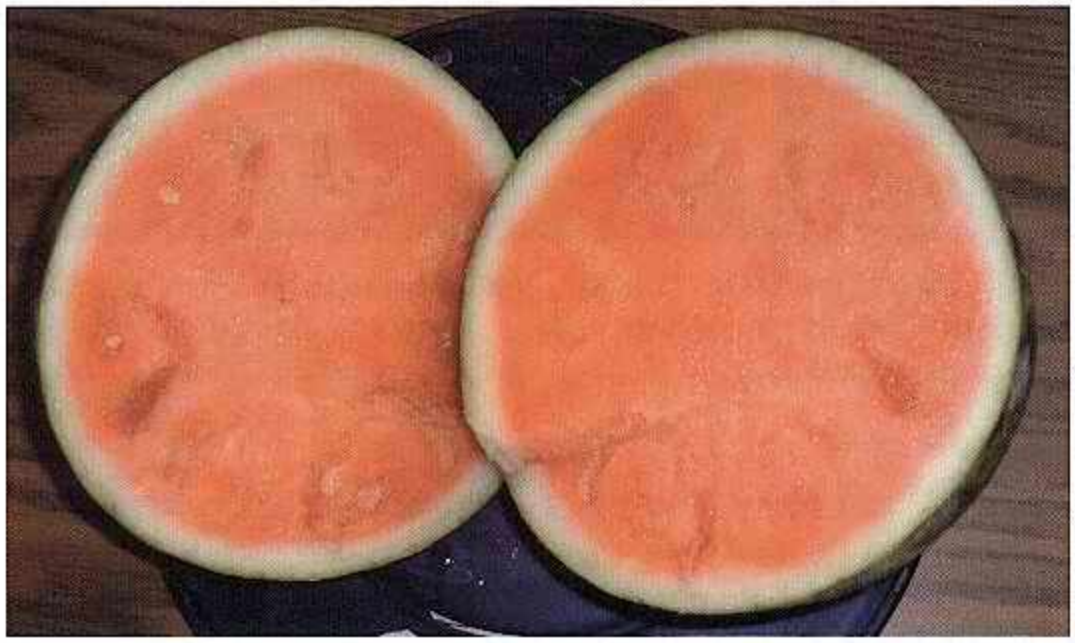


Figura 22.8: Sandía estenospermocárpica (*Citrullus lanatus*). Obsérvese la escasa presencia y el reducido tamaño de las semillas abortadas. Imagen de Scott Ehardt, de dominio público.

22.2.3. Obtención de individuos triploides

Además de los haploides y los doble haploides, otro tipo de individuos que en ocasiones es interesante obtener son los triploides. Un triploide es un individuo cuyo genoma contiene tres copias del genoma haploide de la especie. Esta particularidad hace que en el momento de comenzar el desarrollo gametofítico, durante la meiosis estos individuos no solo formen bivalentes, sino también monovalentes y trivalentes. Durante la segregación de los cromosomas hacia polos opuestos (ver sección 6.4 del tema 6), es posible que de los tres cromosomas homólogos dos migren hacia un polo y uno al opuesto (si se forma un monovalente y un bivalente), o los tres hacia el mismo y ninguno al opuesto (si se forma solo un trivalente). Y estas posibilidades se darán independientemente para cada uno de los tríos de homólogos. En cualquier caso, tendrá lugar una segregación cromosómica desigual en los gametos. En definitiva, la probabilidad de que se originen aneuploidías (ausencia de algún cromosoma) en los gametos es muy alta, y esto conduce irremediablemente a la inviabilidad de los gametos por presentar desequilibrios en su número de cromosomas. Es decir, a la esterilidad de los individuos triploides. Y este es su principal atractivo desde un punto de vista aplicado.

Los triploides tienen interés en ciertas especies de frutales, porque al ser estériles no forman semilla en sus frutos. Por ejemplo, los cítricos. Otro ejemplo muy conocido de frutos sin semillas por ser triploides son los plátanos. Los plátanos que se comercializan actualmente en gran parte del mundo son triploides, con 11 cromosomas en cada serie de homólogos, para un total de 3x = 33 cromosomas. La probabilidad de que durante la meiosis se formaran univalentes y bivalentes, y los primeros migraran a un polo y los segundos al otro, es de $(½)^{10}$= 1/1024. Por esta razón los plátanos en la práctica son estériles y por tanto sin semilla. Otro ejemplo de explotación comercial de la triploidía para la producción de frutos sin semillas son las sandías.

Existen diversas estrategias para generar un individuo de genoma triploide. Por un lado, podemos obtenerlos por métodos de mejora clásicos, es decir cruzar un individuo diploide (2x) con uno tetraploide (4x). El primero generará gametos haploides (x) y el segundo, gametos dihaploides (2x). Al fundirse en la fecundación, se generará un individuo triploide (x+2x=3x), cuyo polen será incapaz de fecundar. Por otro lado, es posible utilizar aproximaciones biotecnológicas in vitro como las siguientes:

- *Fusión de protoplastos*. Como vimos en la sección 21.4.4 del tema 21, los protoplastos son células somáticas desprovistas artificialmente de pared celular, lo cual permite que sus membranas plasmáticas puedan ser inducidas a fusionarse, creando una célula somática híbrida. En este caso, si conseguimos un protoplasto haploide y uno diploide, su fusión nos dará un triploide.
- *Cultivos de endospermo*. Como vimos en el tema 11, el endospermo se crea en la doble fecundación como resultado de la fusión de una espermátida (haploide) con el núcleo secundario (diploide). Es, por tanto triploide. Si conseguimos regenerar un individuo directamente del endospermo, este será triploide también. De hecho, es posible cultivar in vitro explantes de endospermo, que generan callos triploides sobre los cuales se puede inducir embriogénesis somática para regenerar el nuevo individuo triploide.
- *Cultivo de anteras*. Aunque no se sabe porqué, en algunas especies de *Citrus*, el cultivo in vitro de anteras, en lugar de inducir la formación de individuos haploides o doble haploides, favorece la aparición de triploides. Obviamente este no era el resultado en principio esperable del cultivo de anteras, pero una vez constatado el fenómeno, es útil como vía alternativa rápida de producción de triploides.

22.3. Obtención de harinas

Durante miles de años el ser humano viene utilizando la harina obtenida de moler granos de trigo, centeno, avena o maíz entre otros cereales para elaborar pan, bollos, galletas, pasteles, tortas, tortillas, etc. Existe una gran industria establecida alrededor del procesado de los cereales que empuja el avance en

este sector. Por ejemplo, se diseñan métodos alternativos de procesado para las harinas y las masas panarias, y se mejoran variedades de trigo mediante mejora genética para incrementar la calidad de la harina y para obtener harinas con nuevas propiedades (textura, consistencia, capacidad de retención de agua, etc.).

En el contexto de la calidad de la harina, el gluten (ver el tema 12, sección 12.2.4, sobre composición de las reservas de la semilla) tiene un papel muy relevante. Las propiedades visco-elásticas del gluten determinan la calidad de la harina de trigo para la industria panadera. En función de estas propiedades, la masa tiene mayor o menor capacidad para retener los productos de la fermentación de las levaduras, manteniéndose más o menos esponjosa. Por este motivo, la proteína es el parámetro más usado por los países productores y exportadores de trigo para evaluar su calidad. En 1995 se instauró en España un programa de incentivos a la producción de trigo de calidad, por el que se bonificaba todo aquel trigo que superase el 11% de contenido proteico. Este es claramente un objetivo de la mejora de los cereales harineros, y en este caso concreto del trigo. Por otro lado, el incremento actual en la demanda de bizcochos y galletas ha provocado la necesidad de incrementar la producción de otra serie de harinas. Estas harinas no necesitan de las propiedades panaderas antes mencionadas, pues no se espera de ellas que "crezcan" con la fermentación. Dichas harinas provienen de los *trigos blandos*, con bajo contenido en proteínas.

22.4. Obtención de aceites y biocombustibles

Las semillas de especies oleaginosas como la oliva, colza, soja, maíz o girasol, entre otras, se utilizan para extraer de ellas los lípidos que acumulan en grandes cantidades. Estas semillas son sometidas a procesos de extracción para obtener aceites para consumo humano y uso industrial. Tal es el peso que tiene la industria de la obtención de aceite a nivel global, que las grandes compañías de producción de semilla transgénica se han fijado en estos cultivos para producir semilla mejorada con transgenes. De hecho, de los cuatro principales cultivos transgénicos a nivel mundial en 2008, el principal cultivo era la soja, con el 57% de la superficie mundial de transgénicos. El segundo lugar era para el maíz con un 25%, y el cuarto para la colza con un 5%. En la práctica totalidad de los casos, los transgenes que se utilizan son genes que confieren resistencia a plagas, como el que codifica para la toxina Bt, presente originalmente en *Bacillus thuringiensis*.

Los lípidos de las semillas vegetales son importantes componentes de la dieta de humanos y animales. Además, son de particular interés para la industria de pinturas, lubricantes y cosméticos, que constantemente demandan aceites con una composición específica de ácidos grasos. Por estas razones se ha desarrollado un gran interés en la modificación de la composición de los aceites vegetales mediante mejora genética convencional y transformación genética. Un ejemplo de estas modificaciones es la obtención de aceite de girasol *alto oleico*.

Figura 22.9: Cultivo de soja para biodiesel. En la imagen del Agricultural Research Center del USDA en Beltsville (Maryland, EEUU), se observa un autobús que funciona con biodiesel recorriendo una plantación de soja lista para ser recogida y destinada a la producción de ese mismo biodiesel.
Imagen de Keith Weller, USDA Agricultural Research Service, Bugwood.org, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 US.

Recientemente se ha incorporado una nueva alternativa en el uso industrial de los aceites vegetales, que es la producción de combustibles de origen vegetal, denominados en general *biocombustibles*. Por ejemplo, el *biodiesel* (Figura 22.9) consiste en una mezcla compuesta por un 20% de aceite vegetal (girasol, soja, colza, etc.) químicamente tratado y un 80% de gasóleo proveniente de combustibles fósiles, el convencional. El biodiesel es junto con el *bioetanol* el biocombustible que más se produce, aunque no es el único. También se fabrica *biopropanol* y *biometanol*.

La ventaja, al menos en teoría, que se atribuye a estos combustibles es que tienen un balance cero de emisiones de CO_2, pues se supone que las plantas que se utilizan para la producción de aceites han fijado previamente CO_2 atmosférico. Al quemar el aceite como combustible, se devuelve a la atmósfera el CO_2 que previamente se extrajo de ella. Sin embargo, los primeros ensayos demostraron que esto no era exactamente así, pues si se tiene en cuenta el combustible que utiliza la maquinaria necesaria para el mantenimiento y cosecha de las

plantaciones, y el procesado del material vegetal, el balance de emisiones era mucho mayor que cero. En los últimos años se viene trabajando en lo que se conoce como *biocombustibles de segunda generación*, que tratan de hacer un uso más eficiente del material vegetal, y que además se centran en la utilización de residuos vegetales (cortezas de árboles, paja, etc.) o de especies sin interés alimentario.

22.5. Obtención de bioplásticos

El potencial de los granos de cereales no se limita tan solo a la harina y el aceite. En los últimos años se ha comenzado a explotar la posibilidad de obtener materiales plásticos, por ejemplo a partir de maíz. De, hecho, ya se están utilizando bioplásticos derivados de maíz para fabricar embalajes y bolsas. Grandes cadenas de supermercados, capitaneadas por el gigante estadounidense Wal-Mart apostaron hace unos años por la utilización de bioplásticos procedentes de los granos de maíz. Además de Wal-Mart, Marks & Spencer los usa para los embalajes de muchos de sus alimentos preparados. En la industria alimentaria, McDonald's y Del Monte también los usan. Básicamente, del maíz elaboran un derivado del ácido láctico que se denomina polímero de ácido poliláctico (PLA).

Posteriormente, también ha sido posible sintetizar PLA a partir de otros materiales como el arroz, la remolacha azucarera, la caña de azúcar, el trigo y el boniato. En cuanto a sus propiedades, resulta muy parecido al tereftalato de polietileno (PET) convencional, que es el plástico que desde hace ya años forma parte de las botellas de agua y refresco que consumimos. Además es biodegradable. Y paradójicamente, ese es su problema. Muchas compañías además de las que hemos mencionado antes, se lanzaron inicialmente a promover su uso, basándose en estas propiedades biodegradables. Se generaron grandes expectativas en cuanto a que el PLA fuera el sustituto del PET derivado del petróleo. Sin embargo, pronto se dieron cuenta de que en la práctica, la biodegradabilidad no era tal, pues se necesitaban unas instalaciones y unas condiciones de temperatura complejas para su reciclado o compostaje. En realidad, pocos países podían hacer frente a este tipo de instalaciones de forma masiva. En definitiva, los residuos de PLA comenzaron a acumularse en los vertederos, en los que tarda un tiempo en degradarse, y el interés general sobre las bondades del PLA se ha ido enfriando paulatinamente.

22.6. Obtención de materiales textiles

La industria textil, actual no se entendería sin la contribución del algodón (*Gossypium sp.*). Mirando a nuestro alrededor, rápidamente podemos hacernos una idea del impacto que tiene la tecnología textil basada en el algodón en nuestra sociedad. De la cubierta de sus semillas (Figura 22.10) se extraen las fibras con las que se elabora la tela de algodón. Se han descrito 35 especies de este género, aunque en la actualidad el 95% de la producción mundial es de tipo *G. hirsutum* y el 5% restante es *G. barbadense*.

Figura 22.10: Semilla de algodón sobre fruto maduro, abierto.
Imagen de Forest y Kim Starr, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported.

Además, si hay un cultivo susceptible de ser transformado genéticamente es el algodón, pues su finalidad última no es el consumo humano ni animal. De este modo, muchos de los problemas éticos de la opinión pública en cuanto al consumo de transgénicos quedan superados. De hecho, el algodón era en 2008 el tercer cultivo transgénico a nivel mundial en términos de superficie cultivada, con un 13%. En este caso, como en muchos otros, la modificación genética que incorporan consiste en la inserción del gen Bt de resistencia a plagas de insectos.

Un segundo caso relacionado con la industria textil resulta verdaderamente curioso. Se trata de la insospechada aportación del maíz al mundo de la moda y la alta costura. La empresa estadounidense NatureWorks LLC ha inventado un material textil llamado Ingeo que deriva del PLA visto anteriormente. Marcas prestigiosas en la alta costura como Armani y Versace han incorporado ya este material como parte de sus diseños. Oscar de la Renta, entre otros diseñadores, participó con sus diseños elaborados con Ingeo en un desfile de modelos durante el 4° Congreso Mundial de Biotecnología Industrial y Bioprocesos, celebrado en Toronto en 2006.

22.7. Resumen

La semilla y el fruto son estructuras accesorias en el contexto de la reproducción sexual. Sus principales finalidades son asegurar la protección, nutrición y la dispersión de los embriones que portan. Para asegurar la dispersión, muchas semillas y sobre todo frutos adoptan características que los hacen atractivos para los animales, y también para el ser humano. Principalmente nos referimos

a su función como alimento, por almacenar proteínas, lípidos, azúcares y carbohidratos en grandes cantidades. Precisamente por su relevante papel como alimento, los frutos y las semillas son objeto de manipulación biotecnológica. Las principales aplicaciones biotecnológicas sobre los frutos o semillas se centran en la transformación genética de las plantas productoras de frutos o semillas de interés comercial para que además de sus características originales, expresen otras nuevas, también de interés. En lo que se refiere exclusivamente al fruto o la semilla, las transformaciones tienen por objetivo obtener frutos con cualidades organolépticas o nutracéuticas mejoradas. Esto es, frutos o semillas que produzcan nuevas sustancias beneficiosas, o que produzcan sus sustancias originales pero en mayor o menor cantidad, según interese, o que tarden más en madurar o en descomponerse, para aumentar su vida útil. También se modifican los procesos de desarrollo para obtener frutos sin semillas (más apreciados por el consumidor) induciendo procesos como la partenocarpia, la estenospermocarpia o la fructificación de individuos triploides.

Más allá de las aplicaciones en las que se utilizan variantes del desarrollo reproductivo normal o se modifica su constitución genética, la biotecnología del fruto y la semilla se centra en el desarrollo de procesos para aprovechar la extracción y utilización de las sustancias que los frutos o las semillas almacenan. Nos referimos a la obtención de aceites, harinas o polímeros para la elaboración de combustibles, plásticos o tejidos.

22.8. Información adicional

- Barg R. 1996. Two approaches to genetically engineered parthenocarpy. Plant Physiology, 111(2 suppl.): 59.
- Bender D.A. 2005. Oxford Dictionary of Food and Nutrition. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Beyer P., Al-Babili S., Ye X.D., Lucca P., Schaub P., Welsch R., Potrykus I. 2002. Golden rice: Introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. Journal of Nutrition, 132 (3): 506S-510S.
- Butelli E., Titta L., Giorgio M., Mock H.P., Matros A., Peterek S., Schijlen E.G.W.M., Hall R.D., Bovy A.G., Luo J., Martin C. 2008. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors Nature Biotechnology, 26 (11): 1301-1308.
- Choi P.S., Soh W.Y., Kim Y.S., Yoo O.J., Liu J.R. 1994. Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 13: 344-348.
- Estornell L.H., Orzaez D., Lopez-Pena L., Pineda B., Anton M.T,, Moreno V., Granell A. 2009. A multisite gateway-based toolkit for targeted gene expression and hairpin RNA silencing in tomato fruits. Plant Biotechnology Journal, 7 (3): 298-309.

- Feofilova E.P., Sergeeva Y.E., Ivashechkin A.A. 2010. Biodiesel-fuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology. Applied Biochemistry and Microbiology, 46 (4): 369-378.
- Frigon J.C., Guiot S.R. 2010. Biomethane production from starch and lignocellulosic crops: a comparative review. Biofuels Bioproducts & Biorefining. 4 (4): 447-458.
- Hoa T.T.C., Al-Babili S., Schaub P., Potrykus I., Beyer P. 2003. Golden indica and Japonica rice lines amenable to deregulation. Plant Physiology, 133 (1): 161-169.
- Jaradat A.A. 2010. Genetic resources of energy crops: Biological systems to combat climate change. Australian Journal of Crop Science, 4 (5): 309-323.
- Kale G., Kijchavengkul T., Auras R. 2007. Compostability of bioplastic packaging materials: An overview. Macromolecular Bioscience, 7 (3): 255-277.
- Ledeunff E., Sauton A. 1994. Effect of parthenocarpy on ovule development in cucumber (*Cucumis sativus* L.) after pollination with normal and irradiated pollen. Sexual Plant Reproduction, 7 (4): 221-228.
- Litz R.E. 2005. Biotechnology of Fruit and Nut Crops. En Biotechnology in Agriculture Series, Persley G.J. (ed.). CABI Publishing, Cambridge, MA USA.
- Liu S.M., Sykes S.R., Clingeleffer P.R. 2008. Effect of culture medium, genotype, and year of cross on embryo development and recovery from in vitro cultured ovules in breeding stenospermocarpic seedless grape varieties. Australian Journal of Agricultural Research, 59 (2): 175-182.
- Martineau B., Summerfelt K.R., Adams D.F., Deverna J.W. 1995. Production of High Solids Tomatoes Through Molecular Modification of Levels of the Plant Growth Regulator Cytokinin. Bio-Technology 13: 250-253.
- Martineau, B. 2001. First Fruit: The Creation of the *Flavr Savr* Tomato and the Birth of Biotech Food. McGraw-Hill.
- Niggeweg R., Michael A.J., Martin C. 2004. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. Nature Biotechnology, 22 (6): 746-754.
- Notsuka K., Tsuru T., Shiraishi M. 2001. Seedless-seedless grape hybridization via in-ovulo embryo culture. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 70 (1): 7-15.
- Oeller P.W., Lu M.W., Taylor L.P., Pike D.A., Theologis A. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science, 254: 437-439.
- Potrykus, I. 2001. Golden rice and beyond. Plant Physiology, 125 (3): 1157-1161.

- Potrykus I. 2001. The 'Golden Rice' Tale. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37 (2): 93-100.
- Potrykus I. 2003. Nutritionally enhanced rice to combat malnutrition disorders of the poor. Nutrition Reviews, 61 (6): S101-S104.
- Rotino G.L., Perri E., Zottini M., Sommer H., Spena A. 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. Nature Biotechnology, 15:1398-1401.
- Snell K.D., Peoples O.P. 2009. PHA bioplastic: A value-added coproduct for biomass biorefineries. Biofuels Bioproducts & Biorefining, 3 (4): 456-467.
- Striem M.J., Spiegelroy P., Baron I. 1992. The degrees of development of the seed coat and the endosperm as separate subtraits of stenospermocarpic seedlessness in grapes. Vitis, 31 (3): 149-155.
- Valpuesta V. 2002. Fruit and vegetable biotechnology. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.
- Vink E.T.H., Rabago K.R., Glassner D.A. 2004. The sustainability of NatureWorks (TM) polylactide polymers and Ingeo(TM) polylactide fibers(a): an update of the future. Macromolecular Bioscience, 4 (6): 551-564.

ÍNDICE DE TÉRMINOS

A

abscisión 89, 91, 93
acodado 288
acropétalo 44
adnación 32
aeropalinología 329
agalla en corona 271
agamospermia 23
aleurona 222, 235
alogamia 397, 404
amento 46
anafase 97, 98, 100, 103
androceo 95, 109, 111, 128
androdioica 38, 41
androesterilidad 311, 315, 316
androesterilidad ambiental 319
androesterilidad citoplásmica 321
androesterilidad funcional 320
androesterilidad génica 317
androesterilidad génico-citoplásmica 321
androgénesis 203, 315, 353, 358, 359, 360, 373, 374, 376, 380
andromonoecia 40
andromonoica 38
anemocoria 228, 229
anemofilia 168
angiosperma 9, 10, 15, 134
antecio 46
anteridio 11, 14
antesis 44, 45
antípodas 146, 385
antocarpo 244, 252, 262
antocianinas 263, 307, 310
aparato filar 146, 196
aparato ovular 146
apomixis 22, 23, 24, 25
aporogamia 196
aposporia 24
aquenio 230, 240, 244, 251, 252, 258
arcéstida 240
arilo 240
arquegonio 11, 14, 147, 207
arquesporio 114
arroz dorado 427, 428
autofecundación 20, 25, 27, 32, 152, 153, 157, 160, 164, 317, 318, 355, 356, 357, 397, 401, 419
autogamia 19, 20, 25, 32, 125, 150, 151, 152, 153, 164, 397
autoincompatibilidad 19, 125, 127, 135, 137, 153, 155, 157, 160, 161, 162, 163, 164, 193, 397, 403, 404, 405, 406, 408, 412
autoincompatibilidad esporofítica 161, 162
autoincompatibilidad gametofítica 161, 162, 163
autoincompatibilidad heteromórfica 155
autoincompatibilidad homomórfica 160, 161, 405
auxinas 40, 41, 69, 92, 198, 203, 234, 260, 266, 273, 274, 293, 366, 394, 406, 407, 431
avellana 223, 256, 257, 267

B

báculos 127
balausta 139, 247
bancos de germoplasma 294, 298
bancos de polen 337, 338, 350, 405
banda preprofásica 97
barreras reproductivas 337, 397, 399, 402, 405, 406
basípeto 45
baya 32, 245, 247, 259, 261
bellota 256
betacianinas 33
betalinas 33
betaxantinas 33
biocombustibles 434, 435, 436
biodiesel 435
bioetanol 435
bioplásticos 436
bivalentes 101, 102, 432, 433
bráctea 43, 46, 48, 259
bráctea madre 43
brácteas poliníferas 49
bracteola 43
bulbo 288

C

cálaza 143
cáliz 31, 32, 35, 52, 82, 89, 131, 239, 247, 252, 261, 262
callo 273, 274, 277, 291, 297, 360, 369, 372, 378, 381, 418
callogénesis 358, 359, 367, 369, 371
cantarofilia 173
capítulo 35, 36, 41, 46, 48, 58, 101, 272, 328
capítulos cinarocéfalos 48
cápsula 244, 250, 251
cariocinesis 97, 98, 100, 103, 207
cariogamia 196, 380, 413
cariópside 244, 253
carpelo 9, 10, 15, 30, 31, 34, 52, 56, 82, 83, 85, 86, 87, 131, 132, 133, 134, 135, 139, 140, 142, 147, 174, 243, 244, 245, 246, 248, 250, 251, 252, 254, 255, 258, 261, 265, 266
casmogamia 151
castaña 256, 257
célula generativa 117, 119
célula huevo 15, 106, 107, 143, 144, 146, 147, 148, 196, 198, 207, 209, 329, 358, 359, 367, 380, 385, 390, 392, 394, 403, 412, 413, 414
células germinales 95, 353
células madre de la megaspora 96, 107
células madre de la microspora 95, 96, 107, 114
células somáticas 17, 18, 20, 95, 96, 97, 107, 202, 203, 204, 236, 271, 291, 294, 297, 353, 418, 420, 433
célula vegetativa 114, 117, 119, 125, 193, 196, 346, 347
cemento polínico 114, 168, 172, 173
cenocarpia 140
cenocito 147, 203
chalaza 143, 144, 146, 196
cianidinas 33
ciatio 51, 52
cíbrido 317
cimas biparas 50
cimas escorpioides o circinadas 50
cinorrodon 244, 258
citocinesis 97, 98, 100, 103, 204, 207, 375
citoquininas .. 91, 265, 273, 274, 293, 366, 407
cladogénesis 398, 399, 419
cleistogamia 20, 151, 164
cleistogamia constitucional 151
cleistogamia ecológica 151
climaterio 263, 264
clinanto 42
cohesión 32
colchicina 365, 375, 376, 381, 385, 388, 393, 394, 410
coleóptilo 205, 235
coleorriza 205
condrioma 321
corimbo 46, 48
corola 31, 32, 35, 52, 82, 89, 90, 131, 154, 175, 178, 179, 182, 185
corpus 56
criopreservación 294, 302, 340, 350
cromoplastos 33
cromosomas sexuales heteromórficos 40
cromosomas sexuales homomórficos 40
cuajado 62, 260
cubierta seminal 216, 218, 219, 223, 225, 226, 227, 228, 236
cultivo de anteras 361, 362, 363, 370, 371, 380, 433
cultivo de microsporas 361, 362, 363, 369, 371, 380
cultivos de endospermo 433
cúpula 43, 256

D

dehiscencia 119, 122, 123, 128, 153, 179, 248, 250, 265, 266, 315, 316, 320, 393
delfinidina 33, 307, 308
diacinesis 101
diada 103
dialicarpelar, coricárpico o apocárpico 132
dibotrio 49
dicasios 50
diclesis 252
diclinia 19, 153, 157, 160, 405
dicogamia 19, 152, 153
dihaploide 353, 391, 392, 433
dimorfismo estigmático altitudinal 158
dimorfismo sexual 17, 34
dioecia 157
dioica 38, 41
diplosporia 24
diploteno 101
distilia 155, 156
división reduccional 17, 96
doble fecundación 117, 147, 196, 197, 198, 224, 239, 260, 394, 433
doble haploide 354, 355, 356, 372, 373, 376, 379, 380, 381, 385, 388, 392

drupa *139, 242, 244, 247, 248, 256, 258, 259, 260*

E

eficiencia de polinización *167*
eje embrional *216, 217*
elaióforos *179*
embriogénesis *17, 22, 23, 34, 56, 148, 193, 198, 202, 203, 204, 207, 208, 210, 235, 236, 291, 293, 295, 297, 358, 359, 360, 361, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 375, 380, 381, 384, 394, 404, 414, 415, 417, 433*
embriogénesis somática *203, 291, 293, 295, 297, 433*
embrión *14, 15, 17, 24, 31, 34, 55, 138, 142, 148, 193, 196, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 207, 208, 209, 210, 213, 216, 217, 218, 219, 221, 224, 225, 226, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 253, 260, 291, 293, 297, 298, 353, 359, 360, 361, 365, 368, 369, 374, 380, 381, 385, 387, 388, 392, 393, 394, 404, 406, 407, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 419, 431, 432*
embrionía adventicia *24*
enantiostilia *157*
endocarpio *218, 242, 247, 256*
endocarpo *242, 245, 247, 248*
endorreduplicación *373, 374*
endospermo celular *204*
endospermo helobial *204*
endospermo nuclear *203, 204*
endospermo primario *147, 224*
endotecio *112, 121*
entomofilia *171, 173*
epiblasto *205, 207, 210*
epicarpio *242, 243*
epicarpo *242, 243, 245, 246, 247, 249*
epispermo *216, 218, 219, 223, 226, 228, 230, 232, 236, 247, 415*
epizoocoria *267*
escapo *42*
escutelo *205, 207, 210, 235*
esfingofilia *181*
espádice *46, 48, 176, 177, 259*
espata *43, 46, 176, 177*
especiación *398, 399, 400, 401, 402, 419*
especiación por aloploidía *400*
especiación por autopoliploidía *400*
especie puente *410, 411*
espermátida *15, 34, 106, 107, 109, 117, 119, 128, 148, 193, 195, 196, 198, 209, 341, 342, 350, 359, 360, 392, 413, 414, 433*
espermatofitas *27, 213*
espícula *46*
espiga *46, 50, 58, 59, 329*
espiga doble *50*
espiguilla *46, 58, 151*
esporodermis *125, 162, 163*
esporófito ... *10, 13, 15, 17, 95, 109, 144, 163*
esporogénesis *105, 106*
esporopolenina *127*
esquejado *288*
esquizocarpo *244, 254*
estacionalidad *61, 62*
estambres *15, 20, 30, 31, 32, 52, 56, 82, 83, 85, 87, 89, 107, 109, 110, 111, 112, 128, 134, 139, 150, 151, 154, 155, 156, 158, 160, 168, 170, 172, 174, 175, 261, 306, 307, 317*
estaquillado *288*
estenospermocarpia *430, 431, 432, 438*
esternotribia *173*
estigma .. *10, 20, 34, 119, 122, 125, 127, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 148, 149, 150, 153, 154, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 167, 170, 173, 190, 193, 194, 209, 261, 324, 341, 342, 349, 389, 390, 394, 403, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 413*
estilo *34, 110, 117, 132, 133, 135, 136, 137, 139, 148, 154, 155, 156, 158, 159, 161, 163, 194, 261, 317, 342, 349, 403, 406, 407, 408, 409, 411, 413*
estilo geniculado *136, 137*
estilo ginobásico *137*
estolon *22, 287*
estratos parietales *112*
estróbilo *46, 48, 133, 134, 240*
etileno *40, 41, 69, 91, 92, 235, 260, 264, 265, 266, 268, 310, 311, 312, 369, 416, 425, 426*
exina *114, 125, 127, 325*
exocarpio *243, 247*
exocarpo *242*
exotecio *112*
explante *272, 280, 281, 289, 293, 294, 295, 296, 297, 301, 413*

F

falenofilia *181*
falsos frutos *240*

fecundación.... 14, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 25, 27, 31, 34, 56, 89, 106, 117, 120, 131, 135, 138, 142, 143, 147, 148, 167, 184, 193, 196, 197, 198, 207, 209, 210, 213, 224, 232, 239, 242, 247, 260, 261, 262, 305, 329, 356, 358, 359, 360, 367, 380, 388, 390, 394, 397, 401, 402, 403, 407, 409, 412, 413, 414, 415, 419, 431, 432, 433
fecundación cruzada 19, 25
fecundación in vitro.....413, 419
filamento.....33, 109, 110, 112, 372
filotaxis verticilada..... 56
fitocromo..... 65, 66, 74, 75
fitohormona 234, 273, 310
fitorremediación..... 290, 292, 300, 303
flavonoles 33
floración..... 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 81, 88, 92, 93, 94, 151, 168, 176, 209, 305, 306, 307, 311, 315, 318, 329, 338, 342, 404
flores bisexuales 317
flores de aceite 179
flores diclinas 35, 41, 160
flores estaminadas..... 35, 40
flores hermafroditas 38, 39, 132, 155, 160, 329
flores heteromórficas 160
flores homomórficas.....160
flores homostilas.....160
flores imperfectas 35
flores monoclinas 34
flores neutras 176, 177
flores perfectas 38
flores pistiladas 40
flores sentadas o sésiles 42
flores unisexuales..... 35, 38, 157
floricultura 305, 307, 310, 311
florígeno 60
flujo polínico 324, 334
folículo 244, 251
fotoperiodo..... 61, 63, 64, 65, 66, 70, 73, 74, 75, 76, 78, 80, 364, 366
fragmoplasto 98, 375
fructificación 20, 56, 150, 329, 438
fruto 9, 21, 32, 51, 56, 62, 89, 91, 138, 139, 140, 142, 188, 196, 223, 224, 226, 229, 230, 232, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 250, 251, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 291, 301, 305, 324, 342, 407, 415, 417, 423, 425, 428, 430, 431, 437, 438
frutos apocárpicos.....243, 258
frutos cenocárpicos.....243
frutos climatéricos 263, 264
frutos coricárpicos.....243
frutos no climatéricos 263
funículo 143, 144, 218, 219, 220
fusión de protoplastos 301, 302, 418
fusión nuclear 23, 373, 374, 375

G

gálbulo 240
gametangio 11
gameto 15, 34, 95, 96, 106, 107, 109, 110, 131, 132, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 193, 207, 323, 337, 353, 392, 401
gametocidas 320
gametófito 11, 13, 14, 24, 105, 107, 117, 144, 145, 146, 147, 148, 162, 207, 224, 315, 357, 358, 360
gametogénesis..... 70, 106
geitonogamia 150
genes Bt 281, 282, 429
genes catastrales 87, 88, 92
genes de determinación sexual..... 39
genes de identidad del meristemo floral ... 78, 79, 81, 92
genes de identidad del meristemo vegetativo. 78
genes de identidad de órgano floral... 80, 81, 84, 87, 92
genes de tiempo de floración.....73, 78, 88
genes homeobox 81
genes homeóticos..... 81, 82, 85, 87, 207
genes MADS-box..... 82
germen 253
germinación 19, 55, 61, 63, 67, 119, 121, 132, 135, 136, 152, 160, 163, 193, 195, 198, 202, 203, 205, 209, 213, 216, 218, 219, 220, 221, 225, 226, 230, 232, 233, 235, 236, 237, 239, 262, 318, 342, 346, 347, 348, 349, 350, 361, 388, 392, 403, 405, 407, 411, 412, 415, 416, 423
germinación epigea.....233
germinación hipogea 233
giberelinas 41, 68, 69, 73, 74, 77, 78, 80, 235, 260, 273, 366, 406, 407, 431

gimnospermas 9, 10, 15, 24, 27, 30, 119, 120, 133, 134, 135, 137, 147, 148, 149, 167, 168, 196, 198, 207, 209, 210, 213, 217, 223, 224, 228, 236, 239, 240, 266, 267, 370
gineceo 31, 32, 33, 34, 35, 36, 46, 52, 82, 95, 131, 132, 133, 134, 135, 142, 153, 175, 388
gineceo dialicarpelar, coricárpico o apocárpico 132
gineceo gamocarpelar o cenocárpico 133
ginodioica 39, 40, 41
ginogénesis 353, 357, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 394, 395, 413
ginomonoica 38
gluma 43, 46, 58
glumela 43, 46
glumélula 46
glumilla superior 46
gónada 15

H

hercogamia 19, 152, 154, 155, 157
hercogamia de aproximación 154
hercogamia interfloral 157
hercogamia recíproca 155
hercogamia revertida 154
hesperidio 245, 246, 247
heterostilia 155, 158, 405
heterozigosis 40, 155, 318, 373
hibridación interespecífica 301, 385, 392, 394, 395, 401, 402, 405, 418
hidrocoria 230
hidrofilia 169
hilo 219
hipanto 248
hipocótilo 201
hipsófilos 29, 42, 48
homeogenes 81
homozigosis 40, 318, 322, 323, 356, 372, 379, 405
hormonas vegetales 68, 203, 277

I

incompatibilidad parcial 164
incompatibilidad unilateral 403
incongruencia 403, 405
inflorescencia 35, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 48, 50, 51, 53, 240, 243, 251, 258, 259, 262, 268
inflorescencias cimosas 45
inflorescencias compuestas 49
inflorescencias plurifloras 42
inflorescencias racimosas 44, 49
inflorescencias simples 45, 46, 49, 53
inflorescencias unifloras 44
infrutescencias 243
injerto 289, 409, 410, 419
intina 125, 127, 193
involucro 48, 256, 257

L

latencia 224, 225, 226, 227, 235, 236, 415, 416, 417
latencia embrionaria 225
latencia primaria 225
latencia secundaria 225
legumbre 223, 249
lema 46, 58
leptoteno 101
lóculo 115, 132, 138, 139, 140, 142, 246
locus S 161, 162, 405
lodículas 46, 59
lomento 249
longevidad de la semilla 226, 227

M

megagametogénesis 34, 131, 144, 145, 147, 148
megasporangio 15, 145, 147
megasporogénesis 131, 144, 145, 148
meiocito 101, 103, 104, 373
meiosis 10, 13, 15, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 33, 40, 96, 97, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 107, 109, 114, 115, 121, 144, 145, 147, 315, 320, 353, 354, 400, 401, 410, 432, 433
melisopalinología 327
melitofilia 177
mericarpo 254
meristemo floral 56, 58, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 87, 92
meristemo inflorescente 56, 58, 78
meristemo vegetativo 27, 45, 55, 56, 57, 60, 78, 92
mesocarpio 242, 243
mesocarpo 242, 243, 245, 247, 249
mesófilo 32, 33, 243
metafase 97, 100, 103, 104, 376, 377
microgameto 109
microgametofito 34

microgametogénesis..... 109, 117, 120, 121, 128, 364, 368
micrópilo..... 143, 144, 146, 147, 149, 167, 196, 218, 233
micropropagación.....295
microsporangios..... 15, 109, 110, 111
microsporas103, 107, 109, 112, 114, 115, 116, 128, 195, 203, 235, 236, 280, 315, 316, 353, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 375, 379, 380, 386
microsporocito 33
microsporogénesis 109, 115, 117, 120, 128, 145, 203, 353, 364
miofilia 174, 175
mitosis.....10, 11, 95, 96, 97, 99, 101, 103, 105, 106, 107, 109, 114, 116, 117, 119, 121, 144, 147, 195, 198, 207, 364, 368
modelo de coincidencia externa 75
modelos de especiación.....398, 399
monocasios..... 50
monoecia..... 36, 40, 157
monoica 38, 39
monopodial 44
multiplicación vegetativa 22

N

néctar..... 20, 30, 32, 110, 151, 154, 157, 168, 171, 172, 173, 175, 178, 179, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 324
nectarios 30, 110, 172, 175, 185
nexina 127
nomófilos.....29, 31, 32, 42, 233, 237
nototribia 173
nucela.. 24, 143, 145, 146, 147, 207, 218, 220
núcleo primario del endospermo.....196
núcleo secundario 147, 196, 203, 209, 392, 394, 433
núcleos polares..... 147, 196, 203, 209, 414
núcula 248, 252, 258
nuez..... 214, 252, 256, 257

O

ornitofilia 171, 185
osmóforos..... 33, 178
ovario..... 9, 31, 34, 132, 133, 134, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 148, 174, 219, 239, 242, 244, 245, 251, 252, 254, 256, 259, 260, 261, 262, 266, 267, 268, 387, 390, 403, 407, 411, 413, 414, 417
ovario ínfero.....139, 242, 261
ovario semiínfero.....139
ovario súpero.....139, 252
óvulo10, 23, 87, 105, 120, 134, 138, 140, 142, 143, 144, 145, 147, 148, 160, 193, 196, 198, 207, 213, 218, 219, 220, 239, 380, 390, 403, 412, 413, 415, 417

P

pálea.....46, 48, 58
palinología..... 124, 128, 315, 325, 326, 327, 328, 329, 334
panícula 50, 151
paquiteno 101
paracarpia 140
pared del fruto..... 229, 242, 243, 251, 255, 263, 265, 266, 267
parénquima..... 32, 33
partenocarpia ... 260, 262, 263, 430, 431, 438
pedicelo 30, 42, 46, 56, 91, 173, 407
pedúnculo..... 30, 42, 56, 91
pelargonidina..... 33, 307
pepónide 246
perianto 20, 31, 32, 35, 41, 133, 168, 252, 257
pericarpio..... 242, 243, 248, 251, 253, 254, 256, 257
perispermo.....221
pétalos..... 30, 31, 32, 33, 46, 52, 56, 82, 83, 85, 86, 89, 95, 131, 139, 151, 154, 172, 174, 179, 260, 261, 305, 306, 307, 308, 310, 311, 315
pistilo.. 9, 15, 34, 62, 82, 119, 131, 132, 133, 135, 140, 142, 147, 157, 160, 243, 258, 261, 306, 307, 342, 343, 349, 391, 394, 403, 408, 411, 412
placa celular..... 97, 98, 100, 375
placa metafásica..... 98, 102
placenta138, 140, 142, 143, 218, 390, 394, 413
placentación..... 140, 141, 142, 266
plantas de día corto.....60, 62, 65
plantas de día intermedio..... 62
plantas de día largo 61, 62, 65, 66
plantas neutrales 62
plastoma 321
pleiocasios 50
plúmula..... 202, 204, 205, 217, 224, 233
polen 10, 15, 19, 20, 23, 32, 33, 34, 105, 106, 107, 109, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 124, 125, 126, 127, 128, 132, 134, 135, 136, 148, 149, 150, 151, 152, 154,

155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 167, 168, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 178, 179, 180, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 193, 194, 195, 196, 209, 228, 235, 262, 280, 305, 306, 315, 316, 317, 319, 320, 321, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 353, 356, 358, 359, 360, 361, 364, 365, 366, 367, 368, 373, 380, 381, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 397, 403, 405, 406, 407, 408, 409, 411, 412, 413, 414, 419, 433
polen irradiado 390, 391, 392, 394, 407
polen mentor 388, 389, 394, 407, 408, 411, 419
poliaquenio 251, 258
polidrupa 258
poliembrionía homocigótica 208
polígamas 38
polinización 30, 34, 41, 52, 56, 89, 91, 109, 110, 114, 120, 122, 128, 131, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 155, 156, 158, 160, 164, 167, 168, 169, 170, 171, 173, 179, 180, 182, 185, 187, 188, 189, 190, 193, 235, 237, 239, 260, 262, 263, 317, 324, 329, 337, 338, 342, 349, 385, 388, 389, 390, 391, 393, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 411, 412, 413, 417, 418, 419, 431, 432, 444
polinización cruzada o xenogamia 150
polinización directa o autopolinización 150
pollen kit 114
pomo 244, 247, 248, 249
porogamia 196
presentación secundaria de polen 19, 152, 159
procambium 202
proembrión cenocítico 207
profase 97, 100, 101, 103, 372
profilo 30, 43, 46, 50
prometafase 97, 98, 100, 103
prótalo 13, 14, 15, 147, 208
protandria 153
protodermo 201, 208
protoginia 153
protoplasto 281, 293, 301, 302, 317, 414, 418, 419, 420, 433, 446
pseudanto 48
pseudoandroesterilidad 319
pseudobaya 247
pseudocompatibilidad 164
pseudocopulación 180
pseudodrupas 257
pseudofrutos 239, 240
psicofilia 181

Q

quiasmas 101, 102, 103
quiescencia 225
quiropterofilia 171, 186, 187

R

racimo 46, 48, 50
racimo doble 50
radícula 205, 207, 217, 218, 224, 226, 233
raquis 42, 44, 46, 56, 58
receptáculo 30, 33, 42, 45, 48, 134, 139, 172, 184, 239, 248, 251, 258, 261
recombinación 18, 20, 21, 101, 103, 109, 131, 150, 354, 355, 357, 371, 372, 404
reloj circadiano 66, 74, 75
replo 250
reproducción asexual ... 17, 20, 21, 22, 23, 25, 287, 288, 304
reproducción sexual 10, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 27, 34, 52, 95, 101, 137, 149, 164, 170, 213, 287, 298, 301, 305, 324, 359, 406, 412, 418, 423, 431, 437
restauradores de fertilidad 321
rizomas 287, 288
ruta autónoma 73, 76, 78, 80
ruta de las giberelinas 73, 78
ruta de promoción por fotoperiodo 73, 74
ruta de vernalización 76

S

saco embrionario 15, 24, 106, 107, 117, 120, 134, 137, 138, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 193, 196, 198, 200, 202, 203, 204, 205, 209, 341, 342, 385, 394, 403, 404, 412, 414
sacos polínicos 109, 110, 112, 122, 123, 128, 149, 167
sámara 244, 254, 255
semillas albuminadas o endospermadas ... 220
semillas artificiales 297, 298, 302
semillas exalbuminadas o exendospermadas ... 220, 221
semillas perispermadas 220, 221
senescencia 89, 90, 91, 92, 93, 261, 263, 264, 265, 266, 268, 310, 311, 312, 406

sépalos.....30, 31, 32, 33, 46, 52, 56, 82, 83, 85, 86, 95, 131, 139, 229, 261, 305, 306
separación espacial de sexos..... 19, 153
separación temporal de sexos 19, 153
septos..... 139, 140, 142, 245, 266
sexina.....127
sicono..... 51, 244, 260
silicua.....250
silícula.....250
simpodial..... 45
sinapsis 101
sincarpia.....140
síndrome de polinización.....168
sinérgidas 146, 196, 385, 403
singamia..... 17
sorosis 244, 259
suspensor... 200, 201, 205, 207, 208, 209, 368

T

tapete 112, 114, 115, 316
tapetum 112, 114, 121, 129, 162, 316, 362, 363
teca 110, 112, 122, 123, 124
tectum.....127
tegmen 218, 219
tegumentos..... 143, 196, 214, 218
tejido esporógeno 95, 114
telofase..... 97, 98, 100, 103, 372
tépalos..... 32
testa 218, 219, 223, 233, 234
tétradas.... 104, 115, 128, 147, 195, 316, 372
tinciones vitales 324, 347
tomates Flavr Savr 424, 425
tomates morados 426
totipotencia 21, 22, 276, 277, 283, 288, 289, 290, 297, 373, 418
trampas de polen 331
trifina.....114
trima.....256
trioica 39
tristilia 156
tubérculo.....23, 287, 288, 302, 428
tubo polínico 19, 109, 117, 119, 120, 121, 125, 127, 134, 143, 146, 147, 148, 152, 160, 161, 162, 163, 193, 194, 195, 196, 207, 209, 218, 262, 337, 342, 343, 346, 348, 349, 350, 403, 405, 408, 409, 410, 412, 413

U

umbela 46, 48, 49
umbela doble..... 49
unidades polínicas 128, 170, 173
utrículo.....240, 244, 255

V

variación somaclonal.....301, 302
vectores abióticos 167, 190
vectores bióticos..... 167, 171, 190, 239
vectores de polinización... 167, 173, 190, 193
vernalización 60, 67, 68, 69, 73, 74, 76, 77, 80
verticilos 10, 27, 30, 31, 32, 34, 35, 48, 52, 56, 82, 83, 86, 131, 132, 133, 139, 307
viabilidad del polen . 338, 341, 342, 344, 346, 347
vigor del polen 337, 348, 349, 350, 406
vilanos.....229

W

wide hybrydization 392

X

xenogamia 19, 150

Y

yema..... 21, 56, 110, 288, 365, 408

Z

zigoteno 101
zigoto.....10, 11, 13, 17, 25, 31, 106, 148, 196, 198, 202, 203, 207, 208, 209, 274, 276, 321, 359, 380, 402, 403, 413, 419
zona de abscisión 91, 92, 261
zoocoria 230, 267
zoofilia 171

BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LAS PLANTAS

José María Seguí Simarro

La biología reproductiva de las plantas engloba todos los procesos que permiten a un organismo vegetal tener descendencia, sea por vía sexual o asexual. El conocimiento de estos procesos es esencial para poder sacar provecho de ellos mediante aproximaciones biotecnológicas.

Esta obra, dividida en dos grandes bloques, dedica el primero de ellos a la exposición secuencial de todos estos procesos (inducción y desarrollo floral, gametogénesis, polinización, fecundación, embriogénesis, formación, maduración y dispersión de frutos y semillas, etc.).

El segundo bloque se centra en las distintas aplicaciones biotecnológicas derivadas de los procesos reproductivos, de interés práctico en muy distintos ámbitos de la sociedad.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

EDITORIAL