

BIOTECNOLOGIA VEGETAL

METODOS DE PROPAGACIÓN "IN VITRO" EN PLANTAS

Dr. Sergio González Suárez
Dpto. Biología Vegetal
Facultad de Biología

Tema 1: Biotecnología Vegetal: Conceptos generales.

1.1 Morfogénesis y diferenciación.

Morfogénesis: podemos definirla como el conjunto de los fenómenos relativos a la diferenciación celular y el desarrollo de los tejidos y órganos de la planta.

Diferenciación: comprende los cambios morfológicos y fisiológicos que conllevan a la especialización de las células y a la formación de los diferentes tejidos y órganos de la planta. En todas las plantas se presentan las células embrionarias indiferenciadas y es a partir de ellas que ocurre la diferenciación de los tejidos permanentes primarios de la planta. (Figura 1) esto ocurre de forma normal durante la formación de los órganos de las plantas.

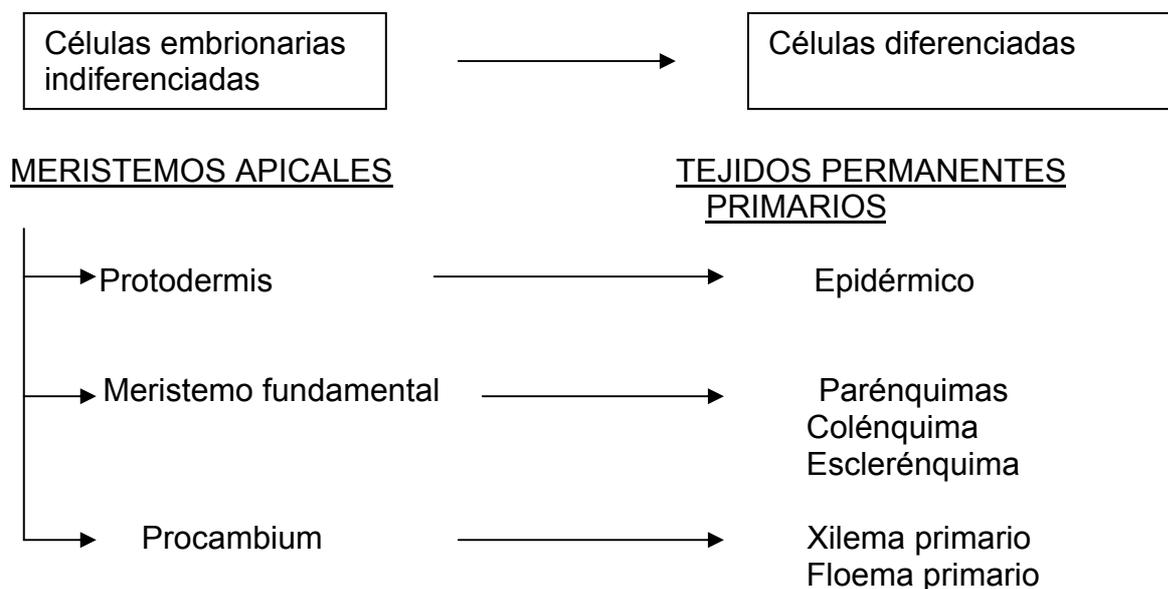


Figura 1. Diferenciación de tejidos permanentes primarios.

En las raíces y tallos de las plantas dicotiledóneas y en las plantas con semillas desnudas (geminospermas, por ejemplo los pinos) se presenta un crecimiento secundario en mayor o menor cantidad según la actividad del cambium y del felógeno. Esos son meristemos secundarios que se van a originar a partir de la

desdiferenciación (B) de las células de parénquima. Estos meristemos secundarios, al entrar en actividad producirán por rediferenciación (C) los tejidos permanentes secundarios y las plantas crecen en grosor.

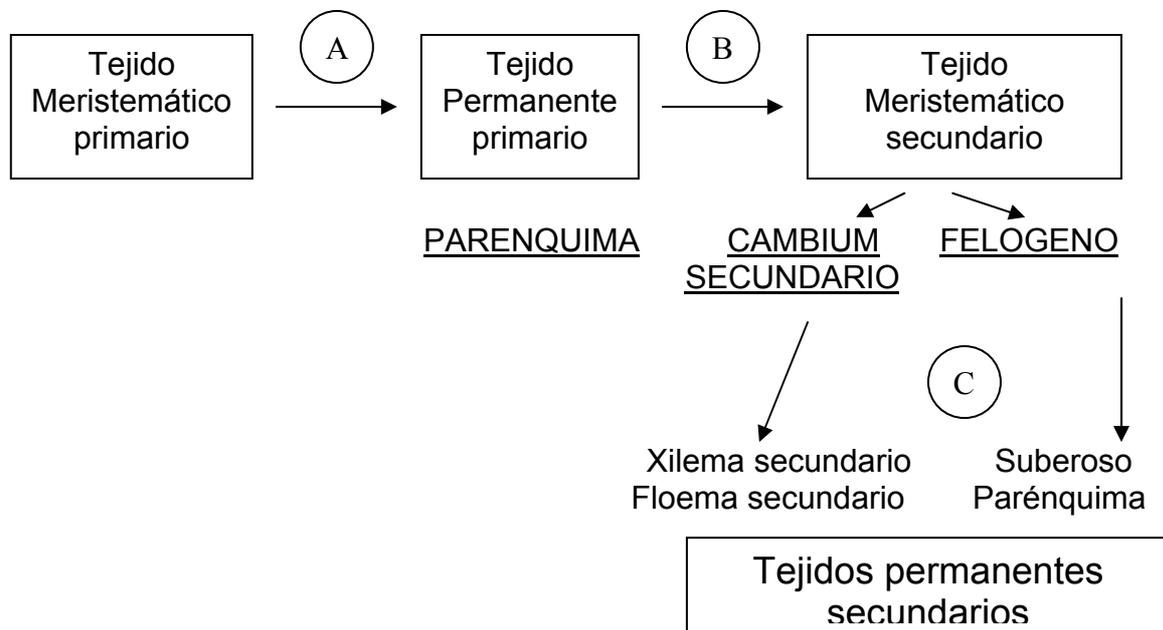


Figura 2. Formación de tejidos permanentes secundarios. A: diferenciación; B: desdiferenciación; C: rediferenciación.

Sin embargo en condiciones de laboratorio “in vitro”, mediante ese mecanismo se puede obtener el cultivo de tejido, de cualquier planta y de cualquier órgano de la planta, la única condición es que se parta de células vivas. O sea, se puede obtener el cultivo de meristemos y la diferenciación de brotes y raíces, siempre que se parta de un pedazo de la planta (explante) que tenga células vivas. Este es el fundamento fisiológico de la obtención de los cultivos de tejidos vegetales “in vitro”, tanto de plantas dicotiledóneas (tabaco, papa, tomate, etc.) como de plantas monocotiledóneas (arroz, maíz, caña de azúcar, etc.). esto se logró por primera vez a partir de la década de los años 30 del siglo pasado y es una metodología básica imprescindible que se aplica en la Biotecnología Vegetal actual para regenerar las plantas. (Figura 3).

DESDIFERENCIACIÓN

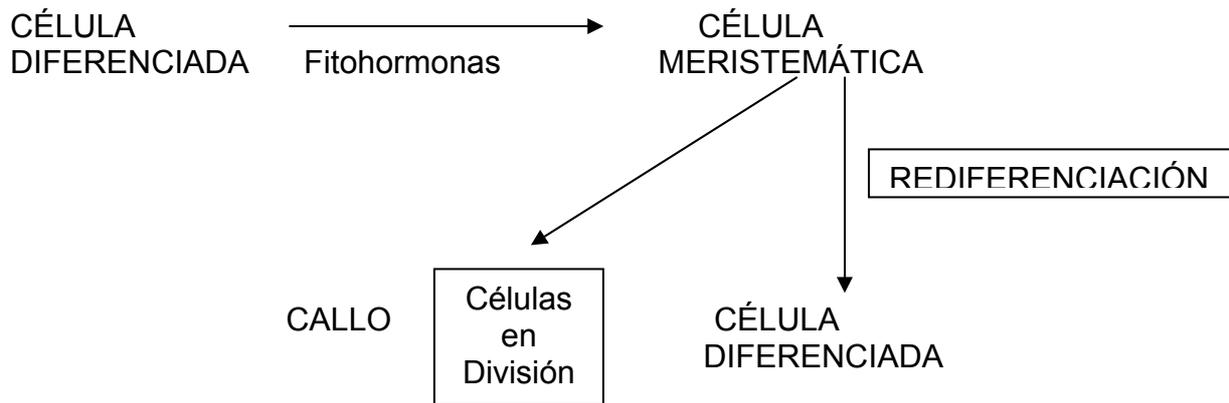


Figura 3. Obtención “in vitro” de tejidos de plantas.

Para lograr este mecanismo “in vitro” juegan un papel primordial las fitohormonas que se deben añadir a los medios de cultivo; según los requerimientos de los diferentes medios y los objetivos que se persigan. Las fitohormonas más utilizadas son las auxinas (AIA, ANA, 2,4-D) y las citocininas (KIN, BAP, Zeatina) generalmente en concentraciones que oscilan entre 0,1 – 10,0 mg/L.

1.2 Cultivo de tejidos “in vitro”

En cultivo de tejidos “in vitro” y la producción de callos ha facilitado, entre muchos aspectos, los siguientes:

- El aislamiento de células y protoplastos
- La producción de metabolitos secundarios de interés biológico (Tabla 1 y 2)
- El desarrollo de los trabajos de organogénesis o sea la producción de brotes y raíces.
- El desarrollo de la embriogénesis somática
- La conservación de germoplasma
- La introducción de nueva variabilidad genética

1.3 Organogénesis:

Un ejemplo importante que ha servido de pauta para muchas investigaciones son los trabajos desarrollados para obtener la organogénesis o sea la producción de brotes y raíces, utilizando el tabaco como modelo biológico y que alcanza su trabajo más completo con los resultados de Murashige y Skoog (1962). Ellos evaluaron diferentes combinaciones de auxinas, citoquininas y giberelinas y determinaron las relaciones necesarias entre las concentraciones de ellas, para poder lograr el mantenimiento de los callos sin diferenciar, la diferenciación de brotes o la

diferenciación de raíces, como se muestra en la Figura 4. Para ello, tomaron el tejido de la médula del tallo del tabaco, formado por un parénquima de relleno, poco diferenciado debido a que este tejido no presenta citoquininas naturales. Hoy en la actualidad este bioensayo de la médula de tabaco se utiliza para evaluar la presencia de citoquininas naturales en extractos naturales de plantas.

En el caso del tabaco se plantea que para obtener los callos la relación entre auxinas y citoquininas debe ser alrededor 10:1, mientras que para inducir la formación de brotes es de 4:1 y para inducir la formación de raíces 100:1.

El medio utilizado para estas investigaciones es normalmente conocido como medio MS y es ampliamente utilizado en la actualidad en los métodos de propagación “in vitro” de muchos materiales vegetales.

Tabla 1. Productos sintetizados utilizando cultivos celulares.

Industria	Producto	Planta	Empleo
Farmacéutica	<ul style="list-style-type: none"> • Ajmalicina • Berberina • Quinina • Codeína • Digoxina 	<ul style="list-style-type: none"> • <u><i>Catharanthus roseus</i></u> • <u><i>Coptis japónica</i></u> • <u><i>Cinchona ledgeriana</i></u> • <u><i>Papaver somniferum</i></u> • <u><i>Digitalis lanata</i></u> 	<ul style="list-style-type: none"> • Problemas circulatorios • Antimicrobiano • Antimalaria • Sedante • Cardiotónico
Alimentaria	<ul style="list-style-type: none"> • Quinina • Menta 	<ul style="list-style-type: none"> • <u><i>Cinchona ledgeriana</i></u> • <u><i>Mentha</i> sp.</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • Bebidas • Saborizante
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> • Piretrina 	<ul style="list-style-type: none"> • <u><i>Chrysanthemum</i> sp.</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • Insecticida
cosméticos	<ul style="list-style-type: none"> • Jasmine 	<ul style="list-style-type: none"> • <u><i>Jasminum</i> sp.</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • Perfumería

Tabla 5. Características del callo y contenido de alcaloides en especies de Solanaceas.

Especie	Características del callo	Contenido Alcaloides mg/g peso seco
<u><i>Datura clorantha</i></u>	<ul style="list-style-type: none"> • Friable, incoloro, con activo crecimiento. • Compacto, verde, poco crecimiento 	0.1 1.5
<u><i>Datura innoxia</i></u>	<ul style="list-style-type: none"> • Friable, incoloro, con activo crecimiento. • Compacto, verde, poco crecimiento 	< 0.1 1.5
<u><i>Datura stramonium</i></u>	<ul style="list-style-type: none"> • Verde pálido, activo crecimiento • Pardo-verdoso, poco crecimiento 	0.5 1.0
<u><i>Solanum dulcamara</i></u>	<ul style="list-style-type: none"> • Friable, incoloro, con activo crecimiento. • Compacto, verde , estructuralmente diferenciado, muy poco crecimiento 	< 10 30
<u><i>Solanum nigrum</i></u>	<ul style="list-style-type: none"> • Friable, incoloro, con activo crecimiento. • Compacto, verde, poco crecimiento 	< 10 13

Figura 4. Obtención de cultivo de tejidos de la médula de tabaco según Murashige y Skoog (1962)

1.4 Control hormonal de la morfogénesis:

Hay algunos principios que se evidencian al aplicar fitohormonas al cultivo de callos y que es necesario tener en cuenta al interpretar los resultados experimentales:

- Concentraciones de auxinas relativamente altas suprimen el crecimiento organizado y promueven la formación de células tipo meristemáticas.
- La relación auxina- citoquinina influye en el balance entre la formación de raíces y brotes. Esta puede variar para los distintos materiales vegetales.
- Las citoquininas inhiben la formación de raíces.
- La embriogénesis se estimula disminuyendo la concentración de auxinas.

Tabla 3. Conjugados de fitohormonas

Clase	Sustancia	Forma conjugada	Actividad
Auxinas	AIA	AIA – glucósido	I
		AIA – inositol	A
		AIA – glucano	?
		AIA – inositol – glucósido	?
		AIA – glicoproteínas	?
		AIA – ac. aspártico	A
		2,4 D - ac. Aspártico	A
		ANA – c. aspártico	A
Citoquininas	Zeatina	Zeatina – ribósido Zeatina - glucósido	A
Giberelinas	AG	AG - glucósido	I

A: Activa

I: Inactiva

?: Desconocida

Es importante tener en cuenta que:

- Las fitohormonas endógenas o exógenas pueden ser almacenadas, modificadas o inactivadas por la célula vegetal (Tabla 3)
- Mecanismos de control feedback controlan la síntesis de hormonas endógenas, al añadir las sustancias. Ej: exceso de ABA inhibe la síntesis de ABA.
- En los cultivos puede mantenerse un efecto remanente de un tratamiento a otro. Ej.: células de soya almacenan la auxina añadida formando conjugados con aminoácidos, que no salen fácilmente de la célula y al cultivarse en medio sin auxina, siguen manteniendo el mismo comportamiento (supresión de la embriogénesis)
- Las células (clusters) o tejidos cultivados pueden controlar su contenido hormonal interno. Ej.: células de soya cultivadas regulan la concentración interna de auxinas libres a un valor constante mediante la conjugación de la hormona en exceso.

Tema 2: Métodos de propagación “in vitro”.

2.1 Introducción:

El desarrollo alcanzado en la propagación “in vitro” de plantas ha sido sorprendente en las últimas décadas. Sin embargo hay resultados que han marcado pautas en este sentido, entre las que se destacan los trabajos de algunos investigadores (Figura 5 y Tabla 4)

2.1.1 Cultivo de tejidos

- Nobecourt (1937): obtuvo cultivo de callos a partir de la raíz de la zanahoria (*Daucus carota*) en un medio de cultivo con auxinas. A partir de estos resultados, diferentes grupos de investigación comenzaron a obtener cultivos de tejidos (callos) y células de numerosos materiales vegetales, sobre todo de plantas dicotiledóneas: tabaco, escorsonera, zanahoria, papa, boniato, plantas medicinales, cítricos, etc.
Con plantas monocotiledóneas la obtención y puesta a punto de los métodos de obtención de cultivo “in vitro” de tejidos fue más lenta, hasta que se lograron iguales resultados en arroz, caña de azúcar, maíz, cereales, orquídeas, etc.
Murashige y Skoog (1962) publicaron sus resultados sobre la morfogénesis “in vitro” de callos obtenidos a partir de la médula de tabaco. Su medio mineral propuesto es de una amplia utilización en la actualidad.

2.1.2 Cultivo de embrioides

- Steward (1958): obtuvo plantas de zanahoria normales, cuando transfirió agregados celulares de un medio líquido a un medio sólido. Esto demostró la formación de embrioides a partir de células somáticas. Estos embrioides también se han obtenido en muchas otras especies, entre ellas en *Atropa belladonna*, *Ranunculus sceleratus*, *Asparagus officinalis*, *Cichorium endivia*, *Petroselinum hartense*, etc.
- Pero se debe a Vasil y Hildebrandt (1965) la demostración más precisa de que a partir de una célula somática aislada se puede diferenciar una planta completa, utilizando callo obtenido del parénquima de la médula del tallo de tabaco.

2.1.3 Androgénesis

- De forma paralela se estudió la androgénesis que es la capacidad de desarrollo de una planta a partir de un grano de polen (microspora). Esto puede ocurrir por un mecanismo directo (microspora – embrioides) o indirecto (microspora – callo – embrioides). En todos los casos se obtiene plantas haploides, aunque en el caso indirecto también se puede obtener plantas diploides. (Nitsch y Nitsch (1965) obtuvieron buenos resultados con tabaco.)

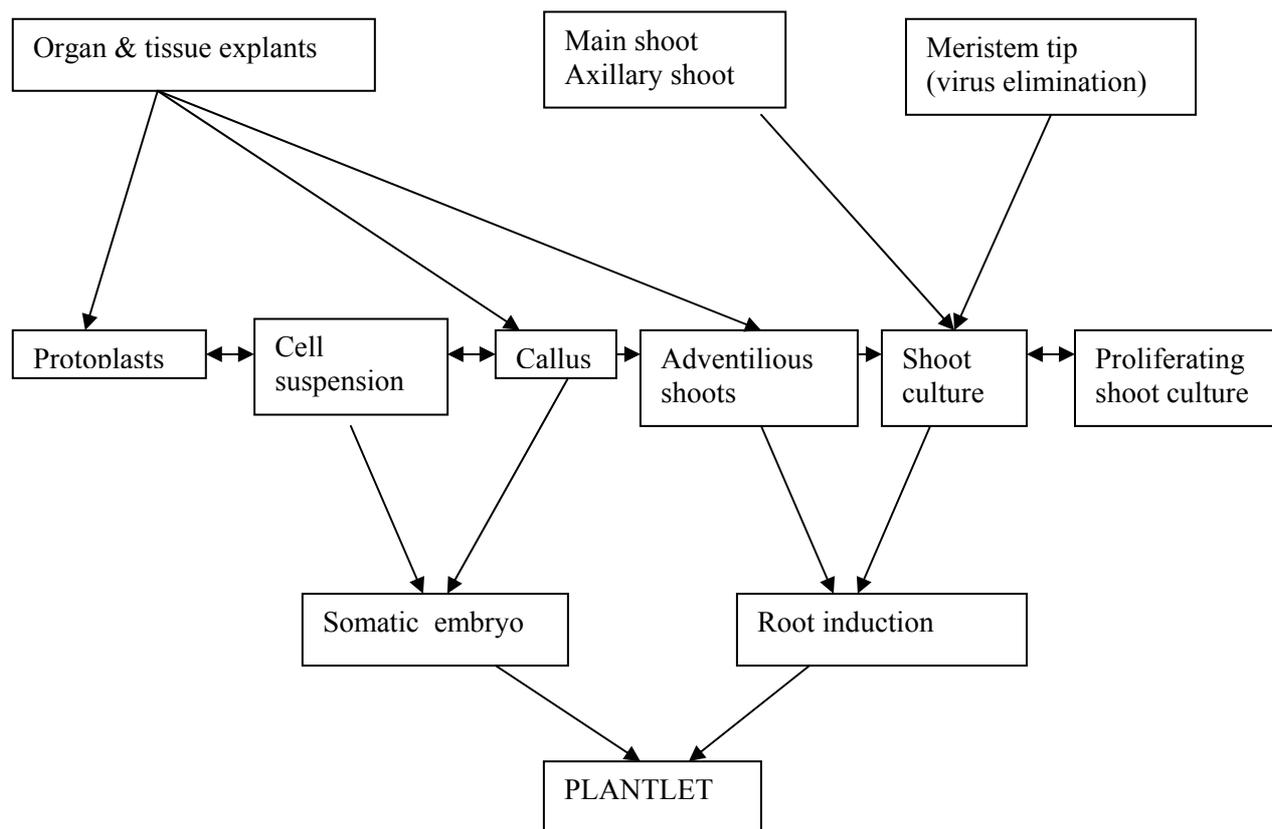


Figura 5. Schematic diagram illustrating the pathways of regeneration in plant tissue cultures.

Trabajar con plantas haploides es importante porque al inducir la duplicación del material genético, puede obtener la planta $2n$ pero homocigótica, lo que es de gran utilidad para los genetistas.

2.1.4. Protoplastos.

El aislamiento y cultivo de protoplastos se logró a principio de la década del 60, destacándose los trabajos de Cocking (1962 – 65).

Generalmente se obtienen a partir de las hojas, aunque han sido aislados de casi todas las partes de la planta: raíces, tallos, nódulos radicales, coleótilos, frutos, pétalos, endospermo, polen, cultivo de tallos o de células, etc. Para obtener cultivos celulares, las células se pueden desagregar por métodos mecánicos o por medio de pectinasas que degradan los pectatos de calcio y de magnesio que se encuentran en las sustancias cementantes que unen las células. Además se degradan las pectinas que se encuentran en las paredes celulares.

Para obtener los protoplastos es necesario degradar las paredes celulares, o sea se emplean celulasas para degradar la celulosa y hemicelulosa y pectinasas para degradar las pectinas. Es necesario tener en cuenta que para lograrlo, todas las soluciones tienen que prepararse de forma hipertónica. Esto es debido a que al eliminar la pared celular, que es la protección de la célula vegetal para la turgencia, los protoplastos deben mantenerse en un medio hipertónico, donde adoptan la forma esférica y de esa forma no corren el riesgo de romperse al mantenerse plasmolizados. En un medio isotónico o hipotónico, al tomar grandes cantidades de agua, el protoplasto al no tener la protección de la pared celular se rompía.

2.1.5 Hibridación somática:

En la actualidad la obtención de protoplastos se realiza como paso previo para lograr la fusión de dos o más protoplastos. Esta puede ser inducida por métodos químicos, con soluciones de NaNO_3 o polietilenglicol (PEG); o por métodos físicos: electroporación o electrofusión.

Cuando se fusionan dos células (protoplastos) con dotaciones cromosómicas diferentes se obtiene una hibridación somática. Este proceso ha permitido obtener híbridos somáticos en papa, berenjena, cítricos, tabaco, etc.

Uno de los problemas mayores de la hibridación somática reside en la necesidad de disponer de “marcadores” para establecer la verdadera identidad de un híbrido somático, o sea cómo detectar las células híbridas, no solo por su fenotipo (color, tamaño y forma) sino por medio de marcadores bioquímicos o genéticos por ejemplo: patrones de proteínas y enzimas, cariotipo, número de cromosomas, pigmentos, análisis de DNA, etc. También es importante evaluar otros aspectos como la resistencias a drogas, capacidad biosintética, resistencia a enfermedades, etc.

Los protoplastos permiten trabajos de ingeniería genética para la introducción de material genético en el núcleo o el citoplasma de la célula y que se transmita a la descendencia.

2.1.6. Transformaciones tumorales:

En las plantas se pueden producir tumores con crecimiento limitado o ilimitado.

- El tumor de crecimiento limitado se corresponde a una anomalía de crecimiento producida por hipertrofia o hiperplasia y que se debe en gran parte a la acción de un agente patógeno que puede ser un insecto, un nemátodo, una bacteria, etc.

Las agallas son anomalías en la formación de tejidos producto de picadas de insectos (avispa, mosquitos, etc.) que inducen el crecimiento en extensión y por división celular, dando lugar a crecimientos anormales. Se conocen muchos tipos de agallas de insectos que se pueden caracterizar por su forma, color, tamaño,

posición y constitución interna. No se trasmite hereditariamente a las células cultivadas.

El crecimiento desordenado, a veces isodiamétrico que se produce en la zona dañada, se explica por una alteración de los niveles endógenos de auxinas, lo que provoca la división celular en las mismas y una tendencia a aislar las zonas dañadas.

➤ El tumor de crecimiento ilimitado:

La agalla de corona es un tipo de cáncer vegetal o tumor de crecimiento ilimitado cuyo agente inductor es el *Agrobacterium tumefaciens*.

Originalmente, por formarse en el cuello de la raíz (límite raíz – tallo) se les llamó “Crown gall” o agalla de corona.

Se ha descrito que más de 90 familias de plantas dicotiledóneas y gemnospermas son susceptibles a la transformación por el *Agrobacterium*. En la actualidad, también se ha logrado la transformación en plantas monocotiledóneas por esta vía. Los primeros trabajos fueron en arroz y caña de azúcar.

En este último caso, fue en Cuba donde se logró la transformación de caña de azúcar empleando el *Agrobacterium tumefaciens* y se obtuvo plantas resistentes al herbicida Basta (Enriquez, 1999)

2.1.7. Transformación de plantas.

En la actualidad este es una de los métodos más empleados para la transformación de plantas.

La infección penetra por una herida, la bacteria produce un principio inductor de tumores (PIT) responsable de la transformación de la célula normal a tumoral.

Por la transformación de una célula normal se obtiene una célula tumoral cambiada estable que transfiere sus propiedades a las células hijas por cambios en el DNA nuclear (Ti plásmido). Estos cambios pueden ser:

- Producción de fitohormonas (auxinas y citoquininas)
- Producción de metabolitos secundarios no presentes en células normales (octopina y nopalina) por fallos en el sistema de la arginasa.

Otras especies de *Agrobacterium* también producen tumores *A. rhizogenes* (plásmido Ri, raíz pilosa) ; *A. rubi* (agallas en plantas aéreas)

Basado en este principio, en la actualidad este es uno de los métodos más empleados para la transformación de células vegetales, ya que permite introducir en la célula fragmentos de ADN para que se expresen en la misma.

La transformación de plantas se realiza con distintas finalidades, como incrementar rendimientos, mejor calidad de los frutos, incrementar la resistencia a las enfermedades, incrementar la resistencia al ataque de herbívoros por la producción de mayores cantidades de fitoalexinas, la resistencia a herbicidas, etc.

Los primeros trabajos de transformación en plantas se lograron como tomates.

Todo ello ha traído una nueva problemática en la Biotecnología Vegetal, que son los problemas éticos que se han creado y el rechazo al consumo de plantas o productos de plantas transgénicas.

A partir de los años 80 la transformación de plantas se ha logrado mediante la transferencia directa de DNA plasmídico mediante el *Agrobacterium* o vía directa por transferencia del DNA mediante electroporación, microinyección o el sistema de bombardeo de partículas. También se han desarrollado otros métodos como la tecnología del DNA recombinante; la inactivación génica a través del DNA anti-sense y la inserción de mRNA (Figura 7).

2.1.8 Perspectivas y aplicaciones de los métodos de propagación “in vitro”

Las perspectivas y utilización de los métodos de propagación “in vitro” son numerosos, veamos solo algunos ejemplos:

- Micropropagación acelerada de material vegetal seleccionado o transformado.
- Mantenimiento de bancos de germoplasmas.
- Evaluación de plantas resistentes o tolerantes a estrés abiótico como alta salinidad, estrés hídrico, bajas temperaturas, etc.
- Resistencia a herbicidas.
- Resistencia a herbívoros.
- Resistencia a enfermedades.
- Producción de metabolitos secundarios.
- Germinación “in vitro”.

Tema 3. Micropropagación.

Es la propagación acelerada de plantas mediante el cultivo de meristemas, para tratar de reproducir y multiplicar genotipos favorables. En los últimos años en Cuba se han desarrollado las biofábricas para la micropropagación de plátano, caña de azúcar y plantas ornamentales. Sin embargo, en la actualidad la micropropagación alcanza producciones enormes en diferentes países y cultivos. Veamos a continuación algunos ejemplos. (Tabla 5)

Tabla 5. Micropropagación comercial (América del Sur y Centro América).

PAIS	ESPECIES
Brasil	Fresa, manzana, plátano, piña, papa, vainilla, uva, caña de azúcar, trigo, kiwi, boniato, papaya
Chile	Kiwi, pepino
Costa Rica	Plátano, jengibre, ornamentales
Ecuador	Fresa, plátano, plantas medicinales
Uruguay	Fresa, manzana, espárrago
Venezuela	Fresa, melocotones, cítricos, ajo.

AMERICA LATINA Y EL CARIBE					
120 especies:		26 – industriales			
		14 – forestales			
		12 – cereales y frutas tropicales			
		10 – leguminosas, plantas medicinales, raíces y tubérculos			
		7 – vegetales			
Cultivos más frecuentes:					
Plátano	Papa	Maíz	Tomate	Toronja	Cacao
Boniato	Papaya	Yuca			

La micropropagación generalmente comprende cinco etapas:

ETAPA 0: Etapa preparativa del material vegetal: el objetivo es obtener un material inicial, de punto de partida con buenas condiciones higiénicas y fisiológicas.

ETAPA 1: Iniciación de cultivos. El objetivo es obtener un comienzo estable.

ETAPA 2: Multiplicación de brotes. La única función de esta etapa es incrementar y mantener las cepas o material: los centros meristemáticos se inducen y desarrollan en yemas y/o brotes.

ETAPA 3: Alargamiento de los brotes, inducción de raíces y desarrollo de raíces.

ETAPA 4: Transferencia a condiciones de invernadero o casa de condiciones controladas. Muchas especies requieren aclimatación con vistas a asegurar su sobrevivencia ex vitro.

ETAPA 0: ETAPA DE PREPARACIÓN.

Condiciones higiénicas:

Estandarizar las condiciones de crecimiento para producir, explantes sanos, lo cual necesita una esterilización menos agresiva. En consecuencia las plantas reaccionan de forma más estándar. Algunos consejos:

- Cultivar las plantas en invernaderos.
- Irrigar por goteo o cama de arena irrigada, no regar las plantas por encima.
- Mantener las plantas en una temperatura alta (25ª C y con una humedad relativa baja (70 %)
- Temoterapia para erradicar virus.

Nota: El tiempo en esta etapa es variable para cada especie y debe ser determinado; por ejemplo 3 meses para Cordyline, Dracarna spp., Ficus spp, Araceae.

Condiciones fisiológicas normales de las plantas

- Tratamiento con reguladores del crecimiento para mejorar las condiciones fisiológicas de las plantas que servirán para tomar los explantes.
- Aspersión, inyección en el tallo o aplicar durante el desarrollo de la flor.
- Fotoperíodo constante para controlar la floración.
- Rejuvenecer la planta por la poda, injertos, etc.

Medio de iniciación:

Sales – MS

- Medio de plantas maderables.
- Lepoivre

VIT – Tiamina – HCl, 0.4 mg/L

Inositol – 100 mg/L.

Sacarosa – 2 %.

Agente gelificador – Agar 0.6 %

- Gelrite 0.12 %
- Medio líquido con papel
- Agitación o rotación 1 rpm

pH - 5,8

Fitohormonas – citoquininas (0 – 10 mg/L)

2 IP, BAP, Kin, Zea o TDZ (Thidrazuron)

Auxinas (0 – 1 mg/L)

- yemas axilares; AIA
 - yemas adventicias; ANA, AIB
- AG (0 – 1 mg/L) (esterilizado por filtro)
Cultivo de meristemos.

Esterilización del explante:

- tomar callos con 3 a 6 yemas
- lavar con agua corriente.
- Etanol 95 % - algunos segundos.
- 0,1 – 1 % de HgCl₂ con detergente (2 gotas/ 100 mL) 3 – 5 min.
- Lavar con agua estéril.
- Hipoclorito 7 – 15 % con detergente (2 gotas / 100 mL)
- Lavar 3 veces con agua estéril
- Eliminar extremos

Condiciones ambientales en los cuartos de cultivo.

Temp. – 18 – 28 °C, (23 °C), temperatura nocturna 1 ó 2 °C menor.

Luz – Fotoperiodo: oscuridad primeros días en cultivo de meristemos 16 h en otros casos.

Cantidad de luz = radiación fotosintética 30 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}$, s⁻¹.

Espectro de luz = luz blanca fluorescente.

Humedad relativa: - No de fácil control

En caso de vitrificación, enfriar los contenedores o el local.

Un fenómeno que puede aparecer durante la micropropagación es la:

VITRIFICACIÓN Ó HIPERHIDRICIDAD

- Desórdenes morfológicos y fisiológicos de las plantas “ in vitro”, que se presentan en las hojas dando una apariencia cristalina.
- Se manifiesta en las hojas.
- Afectan: la fotosíntesis y el intercambio gaseoso (CO₂ y vapor H₂O)

ESTOS FACTORES IMPIDEN EL ESTABLECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS MICROPROPAGADAS EN EL CAMPO.

Requerimientos especiales para la proliferación de los brotes “in vitro”.

- Alta humedad
- Factores nutricionales
- Carbohidratos y minerales
- Altos niveles de reguladores
- Baja intensidad luminosa

Son las mayores causas encontradas que inducen malformaciones de los brotes.

EVIDENCIAS RECIENTES INDICAN QUE LA HUMEDAD RELATIVA Y EL POTENCIAL DE AGUA SON LOS FACTORES PRINCIPALES INVOLUCRADOS EN UNA MORFOGÉNESIS ANORMAL “in vitro”.

Tabla 4. The evolution of gene transfer technology in crop plants in the 20 th century.

Before 1960	1960 – 1980	After 1980
<p style="text-align: center;">Gene transfer by sexual methods</p> <p>Phase I: Since 1900</p> <p>Production of hybrids by sexual crosses Early, and Mid 20 th century</p> <p>1900 – Mendel’s laws of inheritance rediscovered</p> <p>1900 – De Vries studies mutation in plants beginning of plant breeding</p> <p>1919 – Intraspecific and interspecific hybrids</p> <p>1929 – Intergeneric gene transfer</p> <p>1940 – 70 – development of superior commercial hybrids in Maize, Wheal, Barley, Rice, Sugarbeet, Potato, Brassica, Tomato, Cotton, etc...</p>	<p style="text-align: center;">Gene Transfer by non sexual methods</p> <p>Phase II: Since 1960</p> <p>Somatic hybrids by cell fusion</p> <ul style="list-style-type: none"> - in vitro techniques - Totipotency of single cell demonstrated - Plant culture media, growth hormones - Protoplast, organ, embryo, meristem, anther, ovary cultures. - Plant regeneration via direct organogenesis and somatic embryogenesis - Haploidy - Protoplast fusion - In vitro multiplication 	<p>Phase III: Since 1980</p> <p>Prokaryote-Eukaryote hybrids ortrans Kingdom hybrids:</p> <p>Obtained by Bacteria plant conjugal mating</p> <p>Use of recombinant DNA technology</p> <p>Transfer of plasmid DNA to plants via Agrobacterium or via direct DNA transfer:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Electroporation - Microinjection - Particle bombardment system <p>- gene inactivation through anti-sense DNA and m RNA insertion</p>

