

PARTE V
Métodos de propagación y
conservación de germoplasma

V.-Capítulo 1

Micropropagación

Olmos, Sofía; Luciani, Gabriela;
Galdeano, Ernestina

1 Introducción

La micropropagación consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada.

Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciban.

Esta regeneración ocurre en fases consecutivas: la fase de desdiferenciación, donde las células se vuelven competentes para responder ante cualquier estímulo organogénico o embriogénico; la fase de inducción, donde las células se determinan para formar un órgano o embrión, y la fase de realización, donde se forma el órgano o embrión propiamente dicho. Estas fases están directamente afectadas por el balance hormonal del medio de cultivo, por lo cual la optimización de los protocolos de regeneración debe realizarse teniendo en cuenta los requerimientos intrínsecos de cada genotipo en cada fase del cultivo. Así, en general, puede decirse que el proceso de desdiferenciación generalmente es promovido por una auxina, la fase de inducción por un balance hormonal específico del órgano o embrión a formarse y la fase de realización, por una disminución de la concentración hormonal en el medio de cultivo.

2 Etapas de la micropropagación

La regeneración de plantas *in vitro* presenta cuatro etapas principales: 1) estableci-

miento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0), que es la etapa de preparación de los explantos para el establecimiento.

- Etapa 0: Preparación del material vegetal

El empleo de explantos que se encuentran expuestos a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro*. Los factores que influyen sobre la calidad del explanto son: 1) El tipo de órgano que sirve como explanto, 2) la edad ontogénica y fisiológica del mismo, 3) la estación en la cual se colecta el material vegetal, 4) el tamaño y 5) el estado sanitario general de la planta donante.

La planta donante debe elegirse sobre la base de una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explanto a establecer en condiciones *in vitro*. En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos.

Se recomienda colectar explantos primarios a campo durante la estación primaveral y estival, cuando existe una brotación activa de las yemas, ya que el empleo de yemas en estado de dormición ocasiona serios problemas de contaminación.

A fin de lograr explantos de óptima calidad es conveniente hacer crecer las plantas donantes por un tiempo mínimo en condiciones de invernáculo. De esta forma es posible incidir directamente sobre el estado sanitario y la calidad de los explantos mediante el control de la intensidad lumínica, temperatura y reguladores de crecimiento. Para especies ornamentales tropicales y subtropicales se recomienda mantener las plantas donantes en condiciones de alta temperatura (25°C) y baja humedad relativa (75%), a fin de reducir la proliferación de patógenos.

Los procesos morfogénicos de floración, dormición y bulbificación son controlados por el fotoperiodo y la temperatura. Controlando estos factores también es posible obtener plantas donantes y explantos más homogéneos durante todo el año. Pueden aplicarse además pretratamientos con reguladores de crecimiento a las plantas donantes, así como también a los explantos mismos. En especies leñosas suele utilizarse como pretratamiento la inmersión de los explantos primarios en soluciones con citocininas a fin de inducir la brotación de yemas.

- Etapa 1: Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explanto. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantos.

Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas. En este sentido, es importante señalar que el empleo de yemas adventicias (también llamadas yemas formadas de *novo*) está asociado con una mayor probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales respecto de los sistemas de propagación, basados en la regeneración a partir de yemas axilares o embriones somáticos.

La obtención de cultivos axénicos puede lograrse trabajando tanto sobre aspectos preventivos como curativos. Una acción preventiva la constituye el empleo de métodos de verificación de patógenos en los explantos. Esto puede realizarse mediante análisis específicos para las enfermedades del cultivo, tales como DAS-ELISA o PCR, análisis generales para patógenos cultivables como el empleo de medios de cultivo para el crecimiento de bacterias y hongos y métodos específicos para la detección e identificación de patógenos intracelulares como virus, viroides y bacterias. La realización de estos

análisis directamente sobre las plantas donantes, previo establecimiento, presenta dos ventajas. En primer lugar, el empleo de tejidos maduros permite visualizar los síntomas más marcados de la enfermedad; en segundo lugar, la carga de patógenos es mayor y por lo tanto la precisión del sistema de detección aumenta. Por otro lado, las plantas enfermas pueden tratarse con técnicas adecuadas para la eliminación de patógenos como la termoterapia, la quimioterapia a través de la aplicación de antibióticos, desinfectantes, antivirales y el cultivo de meristemas.

La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantos con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,5 a 1,5% de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los explantos deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril.

Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio. En la Etapa 1 también pueden observarse infecciones por bacterias y hongos asociados a trips que sobreviven a los tratamientos de esterilización y por patógenos endógenos latentes dentro del sistema vascular, resultado de una esterilización inefectiva de los explantos. Estos patógenos latentes podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo.

- Etapa 2: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Es importante señalar que en esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido giberélico y las

condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantos.

Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica.

La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo. La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago, esto último generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis.

La principal desventaja del primer método es que el número de yemas axilares por explanto limita la cantidad de vástagos. Esto se ve compensado, sin embargo, por un aumento en la tasa de multiplicación con los sucesivos subcultivos. La formación de yemas adventicias ofrece mayor potencial para la producción de vástagos, ya que la inducción de vástagos ocurre en sitios distintos al de los meristemas.

La embriogénesis somática es una vía más conveniente porque permite saltar las etapas de formación de yemas y enraizamiento regenerando plantas en una forma mucho más rápida y eficiente, disminuyendo además el riesgo de variación somaclonal. A su vez, la disponibilidad de protocolos para la obtención de embriones somáticos es clave para la automatización de la micropropagación y la consecuente reducción de costos para su

implementación a escala comercial. Los biorreactores son equipos que contienen aproximadamente 2 litros de medio de cultivo líquido estéril y donde los embriones somáticos pueden regenerar y madurar a partir de suspensiones celulares, sustentados por la circulación permanente de nutrientes y de aire (Fig.1). Hoy en día, el empleo de biorreactores para la micropropagación a gran escala está limitado por dos motivos críticos.

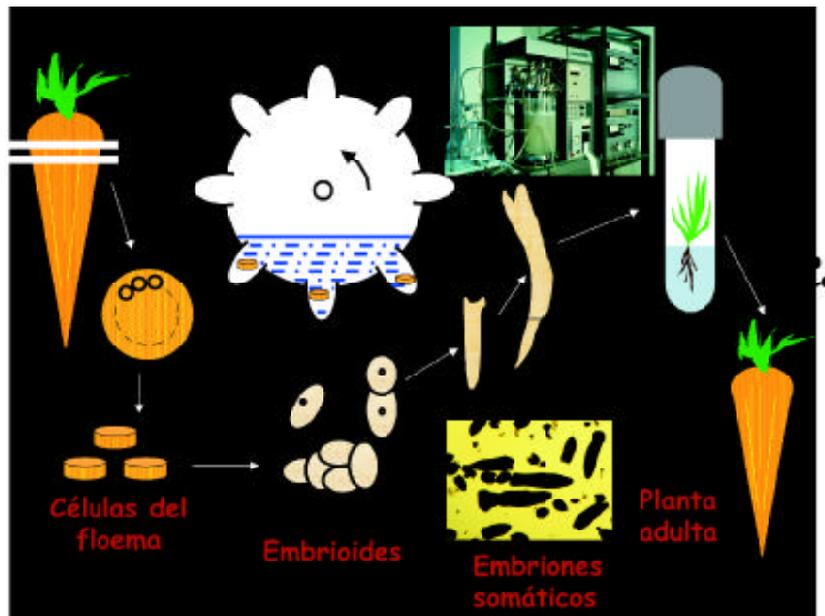


Figura 1: Embriogénesis somática en zanahoria. A partir de células del floema se obtienen los embriones somáticos que son un excelente sistema de propagación clonal. Los biorreactores permiten el cultivo a gran escala de los mismos. (Gentileza Dr. Miguel Pedro Guerra)

En primer lugar, el declinamiento de las líneas celulares (clones) por efecto de la variación somaclonal y segundo, por los altos costos asociados con la conversión de estos embriones somáticos en plántulas.

Las condiciones culturales en las cuales crece el explanto son el resultado de la interacción de tres factores: el estado del explanto o material vegetal, determinado en parte por el medio de cultivo, el recipiente de cultivo y el ambiente externo o condiciones de crecimiento del cuarto de cultivo. La capacidad de respuesta de los explantos a un mismo medio de cultivo cambia con el número de subcultivos, el tipo de explanto subcultivado y el método del repique. Por esto mismo, el medio de cultivo debe optimizarse a fin de lograr la mayor tasa de multiplicación vegetativa. Comúnmente se

emplea como medio basal el medio MS completo sugerido por Murashige & Skoog (1962) suplementado con 3% de sacarosa como fuente de carbono. A este medio se le adicionan además reguladores de crecimiento, tanto del tipo de auxinas como de citocininas.

La etapa de multiplicación generalmente comprende dos periodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera implica, generalmente, el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento (generalmente de auxinas más que citocininas) para favorecer la desdiferenciación. La segunda etapa requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular. En este caso, el sistema es más dependiente de reguladores del tipo de las citocininas. En algunos casos, como ocurre en la formación de embriones somáticos, se requiere de una tercera y cuarta etapa, denominadas de maduración y de germinación respectivamente, cuya duración varía entre 1 a 2 semanas. Para la etapa de maduración se adiciona ABA (ácido abscísico) al medio basal en rangos de 5 a 20 micromolar, seguido del subcultivo a un medio basal conteniendo AG (ácido giberélico) en concentraciones de 0,1-1 micromolar, cuyo fin es lograr la germinación de los embriones obtenidos.

Los tipos de auxinas (a) y citocininas (b) y los rangos de concentración más empleados se mencionan a continuación: a) IBA (ácido 3-indolbutírico): 0,1-2 μM ; 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético): 4-35 μM ; AIA (ácido 3-indolacético): 0,1-2 μM ; ANA (ácido naftalenacético): 1-5 μM ; y, picloram: 1-10 μM ; b) BA (N6-benciladenina): 1-20 μM ; CIN (cinetina): 0,1-1 μM ; ZEA (zeatina): 1-10 μM ; 2ip (isopentiladenina): 1-5 μM ; y, TDZ (tidizuron): 0,01-1 μM .

Los tipos de reguladores, sus combinaciones y rangos de concentraciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada. Los cultivos se incuban en luz a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ con 14 horas de fotoperíodo e intensidad lumínica moderada ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

La presencia de compuestos fenólicos oxidados se encuentra asociada con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés, tales como aquel provocado por el daño mecánico producido durante el aislamiento del explanto de la planta madre.

Estos compuestos se encuentran en ge-

neral en las plantas en estado reducido y el ataque de patógenos produciría su oxidación y liberación. Esto inhibiría el crecimiento de los mismos, dañando, indirectamente, a los explantos. Estas sustancias (quinonas, fitoalexinas y protectores de auxinas) son muy lábiles y fácilmente oxidables. Por esto mismo, durante el establecimiento y multiplicación *in vitro* es necesario emplear estrategias tendientes a disminuir el estrés de las plantas y limitar al mínimo la producción y oxidación de los compuestos fenólicos. Para ello se emplean agentes absorbentes de fenoles en el medio de cultivo, tales como el carbón activado y la polivinilpirrolidona o antioxidantes como el ácido ascórbico, la modificación del potencial redox con agentes reductores, la inactivación de las fenoloxidasas con agentes quelantes o la reducción de su actividad o afinidad por el sustrato utilizando un bajo pH, o bien cultivando *in vitro* en condiciones de oscuridad. Es recomendable además lograr que la tasa de intercambio gaseoso entre los ambientes del recipiente y externo sea óptima, evitándose la acumulación de CO_2 y de etileno.

En este sentido, el sellado del recipiente es importante, el intercambio gaseoso es más limitado con el empleo de una tapa de plástico que con un film de polietileno extensible. La utilización de una tapa perforada con tapón de gomaespuma es altamente recomendable (Fig. 2).

Los principales problemas que pueden presentarse durante los sucesivos subcultivos *in vitro* son la vitrificación y la producción de compuestos fenólicos por los explantos.

La vitrificación consiste en un proceso de morfogénesis anormal con cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos que producen hojas de una apariencia vidriosa. Este fenómeno está regulado por dos factores clave que son la humedad relativa y el potencial agua, y afecta a dos procesos fisiológicos fundamentales: la fotosíntesis y la transpiración. Debido a la disfunción metabólica asociada, las plantas se vuelven heterótrofas y transpiran excesivamente debido a un mal funcionamiento estomático y a cambios estructurales en las paredes celulares. La principal consecuencia de la vitrificación es la baja supervivencia de las plántulas obtenida du-



Figura 2: Plantas de tabaco creciendo *in vitro* en un recipiente de vidrio con tapa metálica perforada y tapón de gomaespuma, que evita la acumulación de CO₂, etileno y excesiva humedad en el ambiente de cultivo.

rante la aclimatación *ex vitro*. Por ello, es fundamental conocer el rol de los distintos factores que inciden negativamente sobre el desarrollo morfogénico normal (autótrofo) *in vitro*. Estos factores son el ambiente de cultivo, los componentes orgánicos e inorgánicos del medio, los reguladores de crecimiento, la luz y la temperatura. Una baja humedad relativa, elevada irradiación, la remoción de la fuente de carbohidratos del medio de cultivo y la defoliación de las plantas para estimular la formación de hojas nuevas estimulan la fotosíntesis y otras actividades metabólicas de las hojas en forma normal. Otras estrategias para lograr un óptimo crecimiento implican el empleo de retardantes del crecimiento para estimular la formación de hojas nuevas después del trasplante. O bien, el empleo de altos niveles de CO₂ (antagonista del etileno) para estabilizar la vía de lignificación y prevenir la vitrificación a través de la inhibición de la hiperhidratación, la hipolignificación y la formación de aerénquima.

- Etapa 3: Enraizamiento y aclimatación

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en las

especies leñosas es complicado por su limitada capacidad rizogénica.

El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. En un medio solidificado con agar, los nutrientes se reducen de 1/2 a 1/4 de la composición original, y la sacarosa se reduce a una concentración final de 1-2%. Medios con baja concentración salina, como el WPM (Lloyd & Mccown, 1980) y GD (Gresshoff & Doy, 1972), incrementan el porcentaje de enraizamiento de vástagos axilares en plantas latifoliadas. El empleo de agar presenta ventajas y desventajas sobre la rizogénesis. Por un lado, el enraizamiento de especies forestales en agar se favorecería al producirse una rizogénesis más sincrónica como resultado del contacto íntimo de las estacas con el medio de cultivo. Sin embargo, las raíces producidas por este método son usualmente delgadas y no se forman raíces cabellera. Adicionalmente, el empleo de agar está asociado con la formación de callo en la base de las estacas, que conduce al establecimiento de conexiones vasculares interrumpidas entre raíces y vástagos.

Comúnmente, a fin de proceder a su enraizamiento, los vástagos de buen tamaño provenientes de la etapa de multiplicación y provistos de al menos 4-5 yemas, se colocan durante períodos cortos en soluciones con concentraciones elevadas de auxinas. La auxina más utilizada es el IBA (ácido 3-indolbutírico), que puede utilizarse a concentraciones de 1-10 μ M durante pocas horas. Alternativamente se pueden emplear niveles más bajos de auxinas (0.1 a 1 μ M), pero manteniendo la inducción por un período más prolongado (3 a 7 días). Luego los vástagos se transfieren a un medio de cultivo basal desprovisto de reguladores de crecimiento para permitir el desarrollo de las raíces. Aproximadamente 20 días después del tratamiento de inducción es posible la obtención de una adecuada cantidad de raíces funcionales que permitan continuar hacia la etapa de aclimatación.

Es importante acentuar que el uso de

auxinas a elevadas concentraciones es contraproducente porque induce la formación de callo en la base de las estacas. Por ello, para cada cultivo es necesario optimizar un protocolo de rizogénesis que minimice la formación de callo y maximice la tasa de rizogénesis y supervivencia de las plantas.

El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la evapotranspiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas, que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva. Bajo condiciones *ex vitro* se utilizan diferentes sustratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales conviene que estén debidamente esterilizados.

3 Propagación de especies leñosas

El empleo de clones en programas de reforestación genera al menos un 10 % de incremento en ganancia genética en relación con el empleo de plantas regeneradas por semillas de árboles selectos. Sin embargo, la máxima ganancia genética puede ser obtenida mediante el empleo conjunto de propagación sexual y agámica. La reproducción sexual es importante para la introducción de genes nuevos, prevenir los efectos de la endogamia y el mejoramiento de características controladas por efectos aditivos de genes. La reproducción asexual, por otro lado, permite la multiplicación de individuos o grupos de individuos seleccionados de una población élite, que exhiben una significativa ganancia genética debida a efectos no aditivos de genes.

Tradicionalmente, las especies forestales fueron propagadas vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas, de braquiblastos en coníferas, así como también por injertos. La propagación por estacas de *Cryptomeria japonica* (kiri), *Populus* (álamo) y *Salix* (sauce) ha sido llevada a cabo duran-

te siglos en Asia y Europa. Sin embargo, para la mayoría de los árboles propagados por estacas se observa una rápida pérdida de capacidad de rizogénesis al aumentar la edad de la planta donante de las estacas. En este sentido, una de las principales ventajas de la micropropagación es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de multiplicación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores.

3.1 Métodos de Micropropagación

Los trabajos pioneros en el cultivo de tejidos cambiales de especies forestales condujeron, en el año 1940, a la formación de yemas adventicias en *Ulmus campestris*. Durante la década del 40 se publicaron logros adicionales en la producción separada de vástagos y raíces en especies latifoliadas. En 1950 se publicó por primera vez la obtención de organogénesis en coníferas, con la formación de vástagos a partir de callos de *Sequoia sempervirens*. En la década 1970-80 se obtuvieron las primeras plantas de álamo (*Populus tremuloides*) y *Pinus palustris*. En ambos casos la formación de plántulas se logró vía organogénesis. Luego del año 1975 la micropropagación de especies latifoliadas se realizó a través de la regeneración indirecta, pasando por una etapa de callo.

Actualmente, la multiplicación *in vitro* de coníferas y latifoliadas se logra a través de tres vías, 1) brotación de yemas adventicias, 2) producción de yemas adventicias y 3) embriogénesis somática.

La brotación de yemas adventicias emplea ápices de vástagos, yemas laterales y microestacas. Es el principal método utilizado para especies latifoliadas. En las coníferas, la elongación de las yemas axilares a partir de braquiblastos de plantas adultas no ha sido muy exitosa. En latifoliadas de clima templado los mejores explantos los constituyen las yemas y vástagos en activo crecimiento más que las yemas en estado de dormición. Los vástagos se colectan en primavera y a principios del verano a fin de obtener material con reducido nivel de contaminación. Alternativamente, las yemas en dormición pueden ser colectadas y brotadas en condiciones ambientales controladas.

Para la inducción de vástagos, tanto en gimnospermas como en angiospermas, se requiere el empleo de citocininas. Las más usadas son la N6-benciladenina (BA) y el tidiazurón (TDZ).

Los medios basales más usados para angiospermas son el MS (Murashige & Skoog, 1962) o el WPM (Lloyd & Mccown, 1980). Para el caso de gimnospermas, el empleo de medios reducidos en sales minerales y baja cantidad de nitrógeno resulta mucho mejor que el empleo de un medio altamente salino y nitrogenado como el MS.

La inducción de yemas adventicias es el método más empleado para gimnospermas y angiospermas. En este caso, las yemas se inducen directamente sobre el explanto en general sin previo pasaje por una etapa de callo. En general, cuanto más joven es el tejido, tanto mayor es la respuesta a los tratamientos que conducen a la organogénesis de novo. Los explantos más frecuentes son embriones cigóticos maduros, seguidos de cotiledones y epicótilos de plántulas. Generalmente se utiliza BA a concentraciones mayores o iguales a 5 ppm como única fuente de inducción o en combinación con otras citocininas. La adición de auxinas puede ser beneficiosa, aunque en coníferas se ha encontrado que promueve la formación de callo y reduce el proceso de organogénesis.

En algunos casos, como en *Populus spp.*, la formación de yemas adventicias se logra a partir de un callo originado a partir de tejido cambial.

El método llamado multiplicación mediante nódulos meristemáticos es un método también utilizado para pino radiata y álamo. En este caso se obtiene básicamente un tejido meristemático (no un verdadero callo) usando relaciones altas de auxina/citocinina para luego inducir la producción de vástagos.

La disponibilidad de protocolos vía embriogénesis somática para especies forestales es aún limitada. En las angiospermas los primeros embriones somáticos se obtuvieron de *Santalum album*, donde sin embargo no fue posible la obtención de plantas completas. Veinte años después pudieron lograrse plantas completas de abeto (*Picea abies*), una gimnosperma. En las gimnospermas los mayores éxitos se lograron empleando como explantos embriones cigóticos maduros e

inmaduros. En la mayoría de los casos los embriones se originan en forma indirecta a partir de callos embriogénicos o bien, directamente, desde el explanto. En las coníferas puede ocurrir un proceso de poliembriónia, previa formación de callo que conduce a una alta tasa de multiplicación inicial. En general, los medios de cultivo más efectivos para estos fines contienen elevados niveles de sales y suministran nitrógeno tanto como NH_4^+ y NO_3^- . Las auxinas más comúnmente empleadas en el medio de inducción son el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y el ANA (ácido naftalenacético), en concentraciones mayores de 2 μM . En algunos casos es necesario además el empleo de alguna citocinina, generalmente en concentraciones mayores a 1 μM si se trata de BA y entre 0,1-1 μM en el caso del TDZ.

3.2 Condiciones de cultivo

Los explantos jóvenes de especies leñosas, particularmente angiospermas, a menudo secretan al medio de cultivo polifenoles oxidados, visibles como pigmentos marrones y/o negros. Se observa también que en los explantos de árboles adultos el problema se acentúa. Por ello se recomienda el empleo de explantos primarios juveniles.

Los tipos de explantos más utilizados para el establecimiento *in vitro* son los segmentos nodales de explantos juveniles, las yemas axilares obtenidas por rejuvenecimiento de plantas adultas, y los embriones cigóticos y plántulas obtenidas de semillas de origen sexual.

La desinfección de los mismos se logra mediante inmersión en etanol al 70 % (1 a 2 minutos) seguido de una solución de lavandina comercial conteniendo de 0,8 a 2,4 % de hipoclorito de sodio durante 5-30 minutos. En la mayoría de los casos se emplean agentes tensoactivos, tales como Tritón[®] y Tween20[®], adicionados en la solución de lavandina. En todos los casos los explantos son lavados finalmente varias veces con agua destilada estéril.

Los medios basales más empleados son el MS, formulado por Murashige & Skoog (1962), diluido a la mitad o a un cuarto de su formulación original o el WPM, formulado por Lloyd & McCown (1981). Como medios de

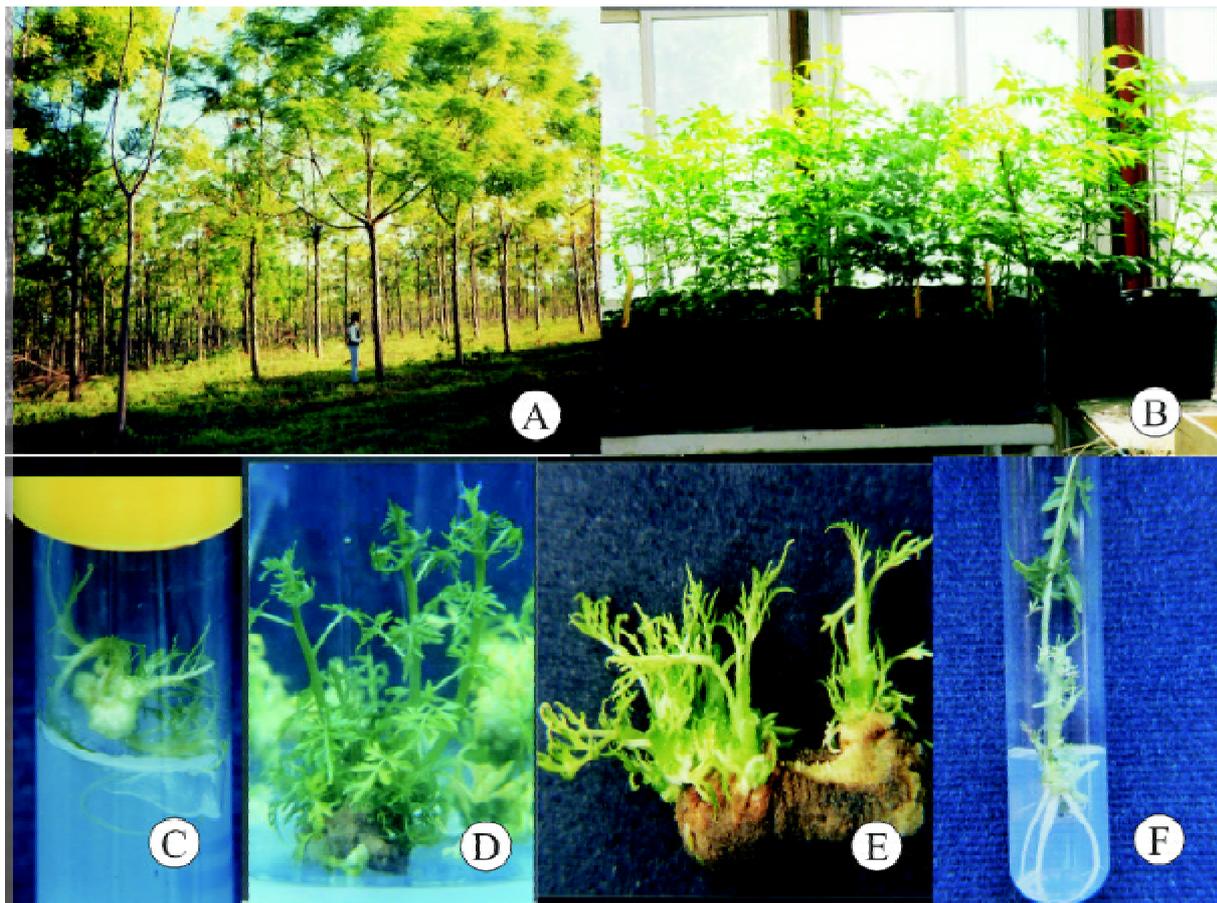


Figura 3: Etapas de la micropropagación en plantas de paraíso gigante, *Melia azedarach* var. *gigantea* L. (Olmos et al., 2002): A) Huerto semillero de paraíso gigante con ejemplares de seis años de edad, provincia de Misiones, Danzer Forestación S.A. Las semillas de los genotipos seleccionados fueron empleadas para generar una población de plantas donantes de explantos. B) Etapa 0, Preparación del material vegetal: plantas de origen sexual de 6 meses de edad crecidas en condiciones de invernadero y utilizadas como donantes de meristemas. C) Etapa 1: Establecimiento del cultivo: vástagos desarrollados a partir de meristemas luego de 30 días sobre medio de establecimiento (Medio basal de Murashige y Skoog, 1962 (MS) suplementado con 2,22 μM 6-bencil amino-purina (BAP) + 0,29 μM ácido giberélico (GA_3) + 0,25 μM ácido 3-indolbutírico (IBA). D) Etapa de Multiplicación: vástagos luego de 30 días sobre medio de multiplicación (medio MS suplementado con 2,22 μM BAP, estos vástagos fueron empleados como explantos para los subcultivos siguientes o para pasar a la etapa de enraizamiento. E) Explantos provenientes de la etapa de multiplicación con problemas de vitrificación y presencia de callo. En estos casos, el medio de multiplicación para los cultivos subsiguientes fue modificado reduciendo la concentración de BAP a 0,44 μM . F) Vástago enraizado en medio de MS con la concentración salina reducida a la mitad, suplementado con 9,89 μM IBA durante 2 días, seguido por el subcultivo en medio basal durante 30 días hasta estar listo para pasar a la etapa de aclimatación.

multiplicación se emplean además el BTM (broadleaved tree medium, Chalupa, 1983) y el medio de Périnet y Lalonde (1983). Los reguladores de crecimiento más utilizados son el ácido naftale-nacético (ANA) y la benciladenina (BA). También han sido efectivas auxinas como el ácido indol-butírico (IBA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y citocininas como la 2- isopentil amino purina (2iP), cinetina (CIN), zeatina (Z) y tiazaurón (TDZ).

En general, los cultivos se incuban a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con 14 horas de fotoperíodo e intensidad

de lumí-nicas moderadas.

En la Fig. 3 se muestran las etapas de la micropropagación de plantas de paraíso gigante, *Melia azedarach* var. *gigantea* L. (Olmos et al., 2002).

3.3 Problemas asociados a la micropropagación de especie leñosas

Es mucho más difícil propagar material adulto que juvenil ya que los primeros son recalcitrantes, es decir, difíciles de regenerar. Sin embargo, aún en estos casos es posible

extraer ex-plantos de mayor capacidad regenerativa mediante dos formas: 1) seleccionando los tejidos más juveniles dentro de un árbol o 2) induciendo el rejuvenecimiento del árbol donante antes de aislar los explantos.

Para seleccionar el material más juvenil en una planta adulta hay que considerar el fenómeno de topófisis. Este es un proceso por el cual el tipo de crecimiento de un nuevo individuo está determinado por la posición que ocupaba en la planta adulta. Esto es ocasionado por efecto del envejecimiento fisiológico e implica que los explantos más reactivos *in vitro* se encuentran en las yemas de las áreas basales del tronco y raíces.

A su vez, el rejuvenecimiento es un proceso de reversión temporaria de las características adultas que permite lograr material vegetal en estado de juvenilidad. En general, a fin de contrarrestar los efectos debidos a la topófisis, se recomienda emplear tejidos juveniles y un tamaño de explanto muy pequeño.

La juvenilidad puede lograrse por dos métodos. En primer lugar, mediante el empleo de órganos juveniles separados de plantas adultas, la utilización de estacas enraizadas o bien de brotes epicórmicos. En segundo lugar, mediante el rejuvenecimiento de partes adultas, la iniciación de yemas adventicias y embriones (en este caso se logra un rejuvenecimiento total por el inicio de un nuevo ciclo ontogénico), del injerto de yemas adultas sobre pies juveniles, de tratamientos con reguladores de crecimiento (como citocininas como el BA), por la poda severa (recepado de árboles adultos) y a través del cultivo *in vitro* de meristemas.

Tanto los atributos de supervivencia a campo, como la tasa de crecimiento, el plagiotropismo y la susceptibilidad a enfermedades de las plantas, tienen una correlación directa con la calidad de los vástagos durante el cultivo *in vitro*. Un problema crucial a resolver en cada sistema de propagación es la calidad diferencial de las raíces de las plantas regeneradas en relación con aquellas obtenidas por semillas. Por ejemplo, las plantas regeneradas de *Pinus elliotti* suelen tener una raíz principal no ramificada y gruesa. En cambio, las plantas obtenidas a través de semillas tienen raíces más delgadas y de

mayor crecimiento lateral que permiten comparativamente un mejor anclaje y una mayor resistencia a los vientos.

4 Propagación de especies herbáceas

La micropropagación de especies herbáceas está orientada a proveer material libre de patógenos, propagar material seleccionado por su mayor rendimiento o por su mayor resistencia a enfermedades y estreses ambientales, conservar la diversidad específica en bancos de germoplasma, obtener material para estudios fisiológicos y genéticos y sentar las bases para la aplicación de técnicas de ingeniería genética.

Existe una gran variedad de protocolos, desarrollados en función de la especie y de los objetivos de la propagación. Existen protocolos generales para monocotiledóneas como en el caso ciertos cereales (trigo, maíz, cebada, avena, arroz), pasturas (pasto bermuda, festuca alta, raigrás, pasto llorón) y hortícolas (cebolla, ajo, puerro); protocolos generales para dicotiledóneas que incluyen especies hortícolas (tomate, papa, pimiento y zanahoria) y leguminosas forrajeras (alfalfa, maní, trébol blanco) y protocolos para especies modelo como *Arabidopsis* y tabaco.

En todos los casos, las formas de propagación son las mismas. Se emplean vías de regeneración por formación de yemas axilares, yemas adventicias y embriogénesis somática. En los dos primeros casos, el sistema de propagación a través de la organogénesis directa asegura la estabilidad genética de las plantas regeneradas y se emplean cuando el objetivo es la propagación clonal a gran escala. La embriogénesis u organogénesis indirecta, con formación de callo, se emplea en cambio para generar variabilidad en programas de mejoramiento.

En el caso de ajo y cebolla, por ejemplo, las etapas de la micropropagación incluyen tanto la multiplicación de yemas axilares por el cultivo de meristemas, la formación directa de yemas adventicias en explantos obtenidos a partir de placas basales o umbelas inmaduras y la formación indirecta de yemas adventicias y/o embriones somáticos obtenidos a partir de callos que provienen de distintos tipos de explantos (meristemas, bro-

tes, placa basal ó raíces). En el caso de alfalfa y otras leguminosas como soja y maní, la micropropagación es llevada a cabo por la vía de la embriogénesis somática, donde los embriones se obtienen utilizando tejidos juveniles (embriones, cotiledones y pecíolos) como explantos. En algunos casos como pasto llorón (*Eragrostis curvula*) es posible la regeneración de plantas mediante embriogénesis, organogénesis y regeneración directa a partir de los explantos.

5 Lecturas Recomendadas

CASO, O. H. 1992. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agriscientia* 9 (1): 5-16.

CHALUPA, V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13: 7-39.

DEBERGH PC; PE READ, 1993. Micropropagation. En *Micropropagation*. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1-13.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BRAVO, J.E. 1984. Cell culture methods for crop improvement. *Handbook of Plant Cell Culture* 2: 47-68.

KLOPFENSTEIN, N.B.; KERL, J.G. 1995. The potential of biotechnology in temperate agroforestry practices. In:

Agroforestry systems 32. Kluwer Academic Publishers. Netherlands: 29-44.

LLOYD, G.; B. MCCOWN. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kolmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagator Society* 30: 421-427.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

PÉRINET, P.; M. LALONDE. 1983. *In vitro* propagation and nodulation of the actinorhizal host plant *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Plant Science Letters* 29: 9-17.

SCHENK, R.U.; HILDEBRANDT, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50:199-204.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. 1991. Application of micropropagation to forestry. En *Micropropagation*. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 311-336.

ZIV M, 1993. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En *Micropropagation*. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 45-92.