

MICROPROPAGACION



Dra. Ing. Ftal. Marcela Ruscitti
INFIVE (Instituto de Fisiología Vegetal)
UNLP – CONICET
marcelaruscitti@gmail.com

MICROPROPAGACIÓN:



- ❖ Permite multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades.
- ❖ Constituye la principal aplicación comercial del **cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.**

Cultivo in vitro de tejidos vegetales

Conjunto de técnicas que permiten el cultivo en **condiciones asépticas** de **explantos** (órganos, tejidos, células) empleando **medios nutritivos** artificiales.



Sus aplicaciones van desde estudios básicos sobre fisiología y bioquímica, hasta la **propagación masiva o micropropagación de plantas**, la obtención de plantas libres de patógenos, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético y la ingeniería genética.



¿ En qué se basan estas técnicas ?

Totipotencialidad celular

Toda célula vegetal es capaz de regenerar una planta entera a partir de un cultivo *in vitro*.

Desdiferenciación / Rediferenciación

La **desdiferenciación** consiste en la transformación de las características de un tipo celular para dar lugar a células de tipo meristemático. Luego sigue la **rediferenciación** en nuevos tipos celulares

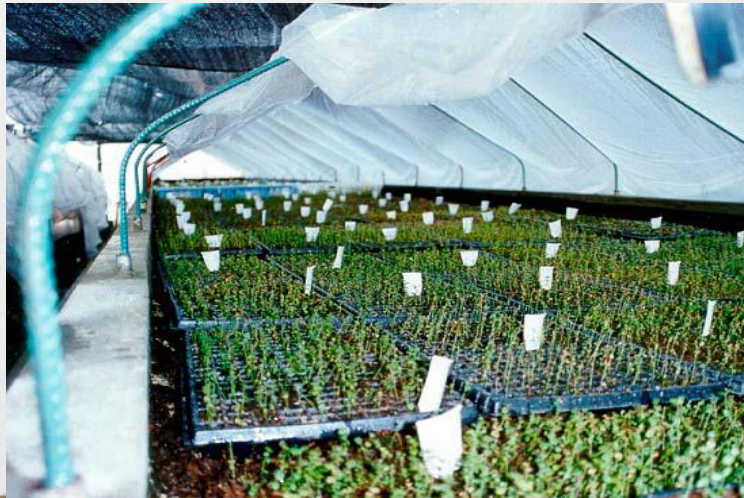
Balance de hormonas

Todo proceso de diferenciación está regulado por el balance entre diferentes tipos de hormonas o reguladores del crecimiento

A partir de los avances en la investigación de la regeneración de plantas *in vitro* se desarrolló toda una industria que abarca desde la micropropagación hasta la transformación genética.



BIOFÁBRICAS



Biofábrica:

Es un lugar para la producción a gran escala de plantas mejoradas

El procedimiento completo de producción no sólo incluye el sector de **laboratorio**, sino que también involucra el desarrollo en **invernáculos**, abarca desde que se siembra *in vitro* hasta que se entrega el plantín.



Instituto de
Biotecnología de
las Plantas
@ibp.co.cu



disminución de
los costos de
producción

mejor eficiencia
en los procesos

mayor calidad
sanitaria y
genética de las
plantas

- BIOFABRICA DE PRIMERA GENERACIÓN: el término surge en Cuba en la década del '80
- BIOFABRICA DE SEGUNDA GENERACIÓN: embriogénesis somática en biorreactores y semilla artificial
- BIOFABRICA DE TERCERA GENERACIÓN: mejora en el diseño de las instalaciones
- BIOFABRICA DE CUARTA GENERACIÓN: fuerte componente de Investigación + Desarrollo



 **Biofábrica**
MISIONES S.A.



[Inicio](#) [Biofábrica](#) [Cannabis Medicinal](#) [Vinculaciones](#) [Servicios](#) [Productos](#) [Formación Educativa](#) [Noticias](#) [Contacto](#)



Ejemplo de Biofábrica: laboratorio *in vitro* de orquídeas



Organización del laboratorio de cultivo de tejidos: condiciones asépticas

- ❖ área de preparación (balanzas, medidor de pH, heladera, destilador de agua)

- ❖ área de lavado y esterilización (autoclave, estufa, lavavajillas)
- ❖ área de transferencia o siembra (flujo laminar)
- ❖ área de incubación o crecimiento (control de temperatura, iluminación y humedad relativa)
- ❖ área de observación (microscopio, lupa)
- ❖ invernáculo



Laboratorio de cultivo de tejidos



AUTOCLAVE



FLUJO LAMINAR DE AIRE ESTERIL



Condiciones de incubación

- Temperatura
- Luz
- Calidad
- Cantidad
- Control del fotoperiodo



El CTV requiere una infraestructura mínima especializada y condiciones controladas de cultivo

¿CÓMO SE HACE?

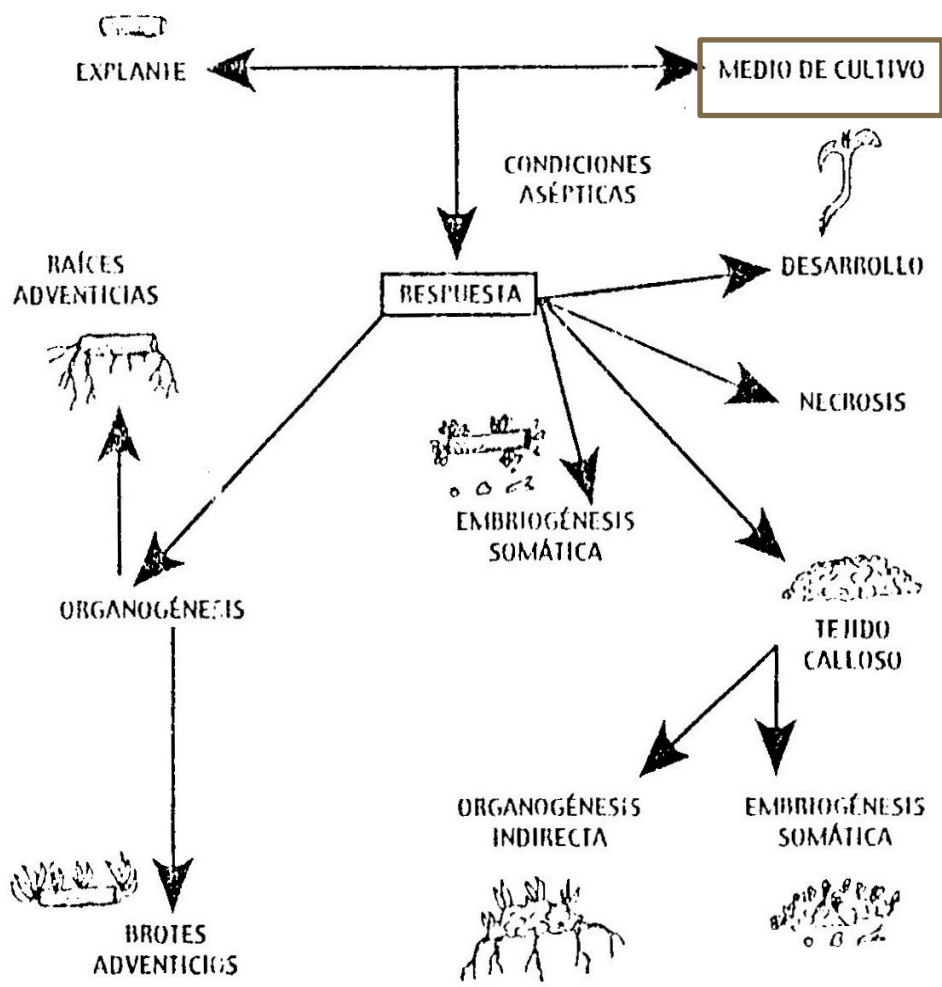
Formulación del medio de cultivo

Elección y acondicionamiento del explante

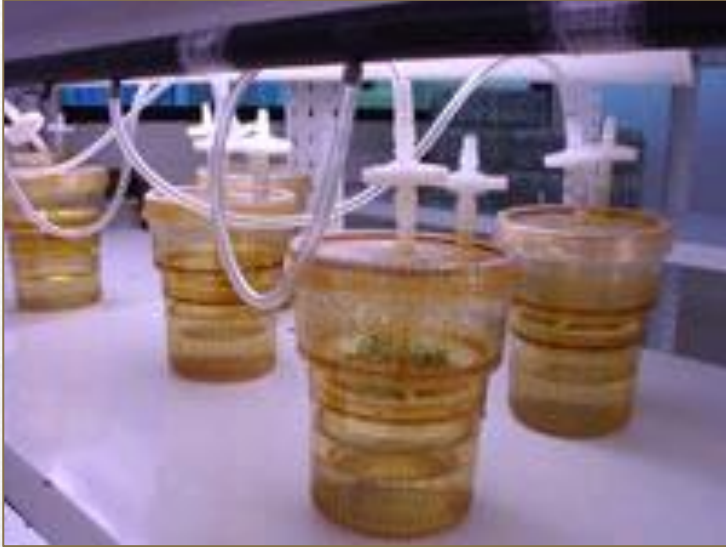
Ajuste de condiciones ambientales y de asepsia

Respuestas: observaciones macro y microscópicas

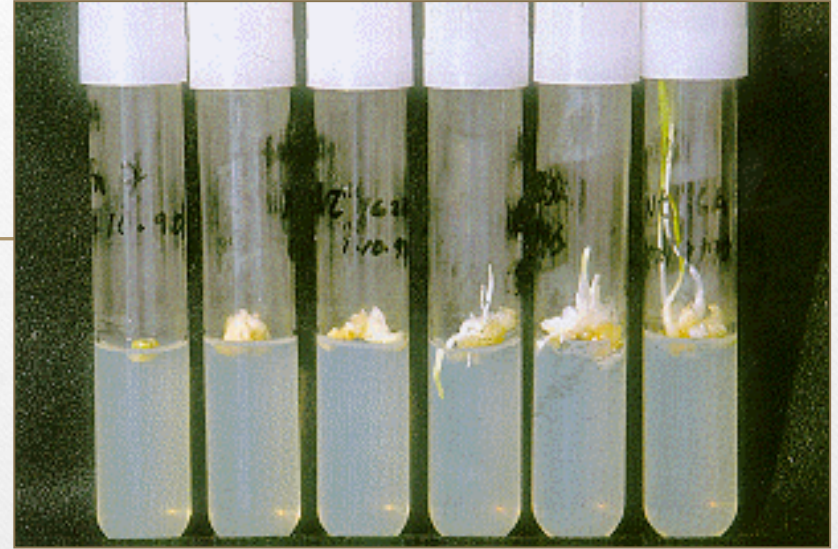
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES



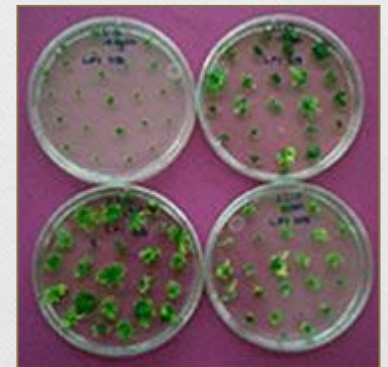
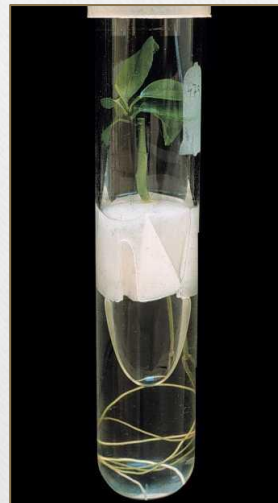
Medios de cultivo



líquido



semisólido



MEDIO DE CULTIVO

Propagación de plantines de ananá mediante inmersión temporaria en biorreactores



Composición del medio de cultivo

- **Agua destilada:** representa el 95% del medio
- **Fuente de carbono:** generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita porque los explantos no son completamente autótrofos
- **Sustancias inorgánicas:** macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada según la planta elegida
- **Vitaminas:** Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
- **Hormonas y reguladores del crecimiento:**

Composición del medio de cultivo

Hormonas y Reguladores del crecimiento:

- **Grupos básicos de reguladores del crecimiento:**
 - Auxinas
 - Citocininas
 - Giberelinas
 - Acido abscísico
 - Etileno
- **Generalidades:**
 - Actúan a bajas concentraciones
 - Interactúan unos con otros (los resultados están determinados por las concentraciones relativas entre las diferentes fitohormonas).
 - Los reguladores endógenos del crecimiento están presentes en la planta durante todo su ciclo de vida pero su concentración fluctúa.
 - Están involucrados en numerosos procesos fisiológicos.

Composición del medio de cultivo

- **Hormonas y reguladores del crecimiento en los medios de cultivo:**
-

Auxinas: promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios.

Citocininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales.

Otras: giberelinas, ácido abscísico, etileno.

Medios de cultivo: composición general

Compuestos inorgánicos

Macronutrientes: NO_4^- , PO_4^{3-} , K^+ , Ca^{2+} ,
 Mg^{2+} , SO_4^{2-}

Micronutrientes: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ,
 Mo^{2+} , Co^{2+} , I^-

Carbohidratos

Sacarosa, glucosa, mio-inositol

Vitaminas

Tiamina (B1)

Piridoxina

Acido nicotínico (C)

Biotina

Aminoácidos

Glicina

Reguladores del crecimiento

Auxinas

Citoquininas

Giberelinas

Soporte inerte (medios semisólidos)

Agar (0,7 a 1%)

Gelrite®

pH

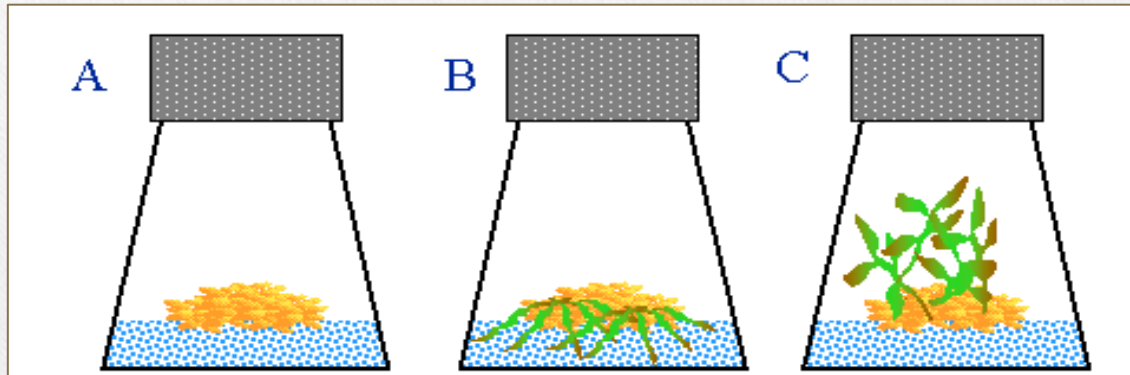
5,6 – 5,8

Esterilización

1 atmósfera, 20 min, 120°C en autoclave

Uso de Hormonas y Reguladores

Importancia del balance hormonal

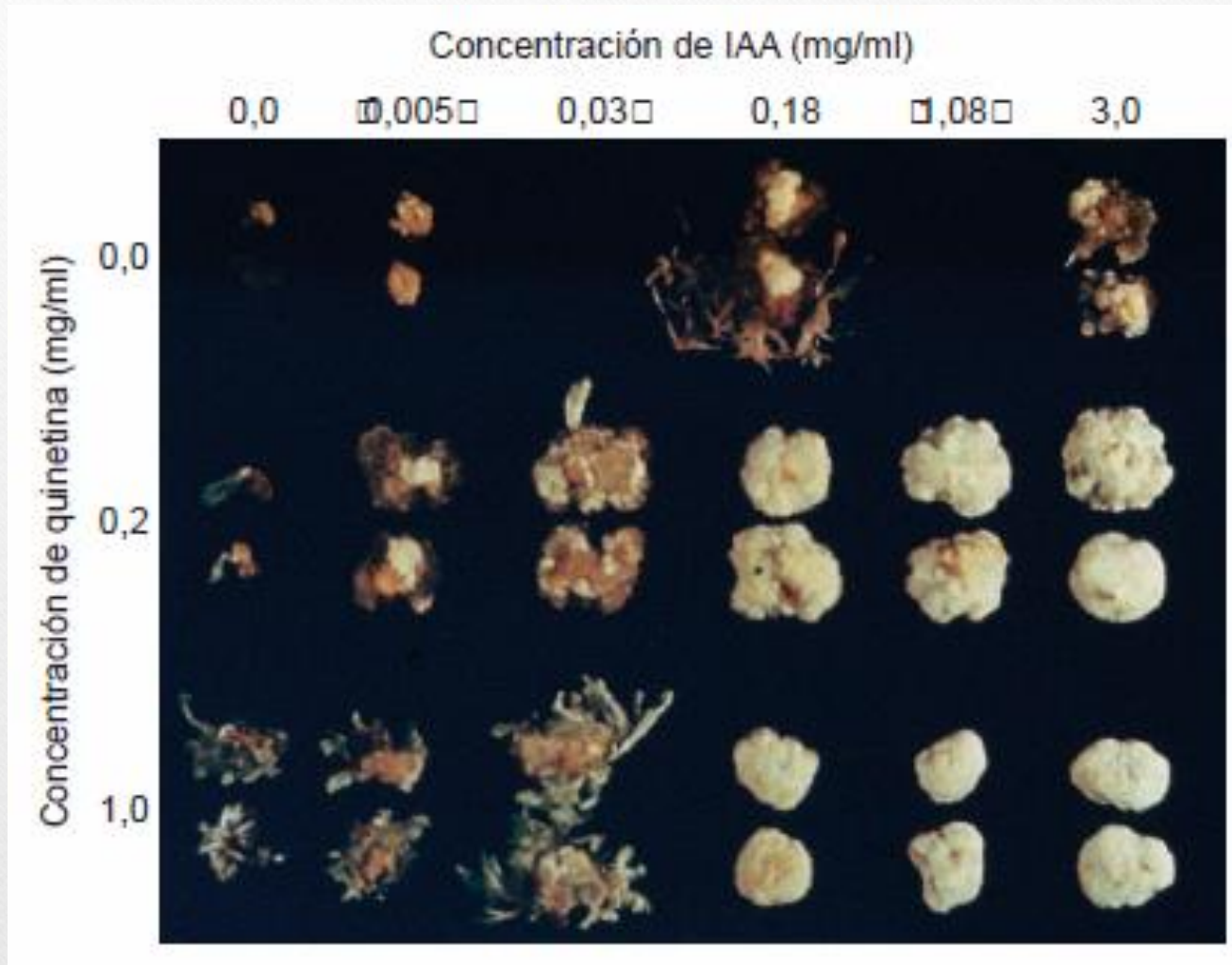


A: Auxina / Citocinina = 1 callo

B: Auxina / Citocinina > 1 raíz

C: Auxina / Citocinina < 1 brote

Importancia del balance hormonal



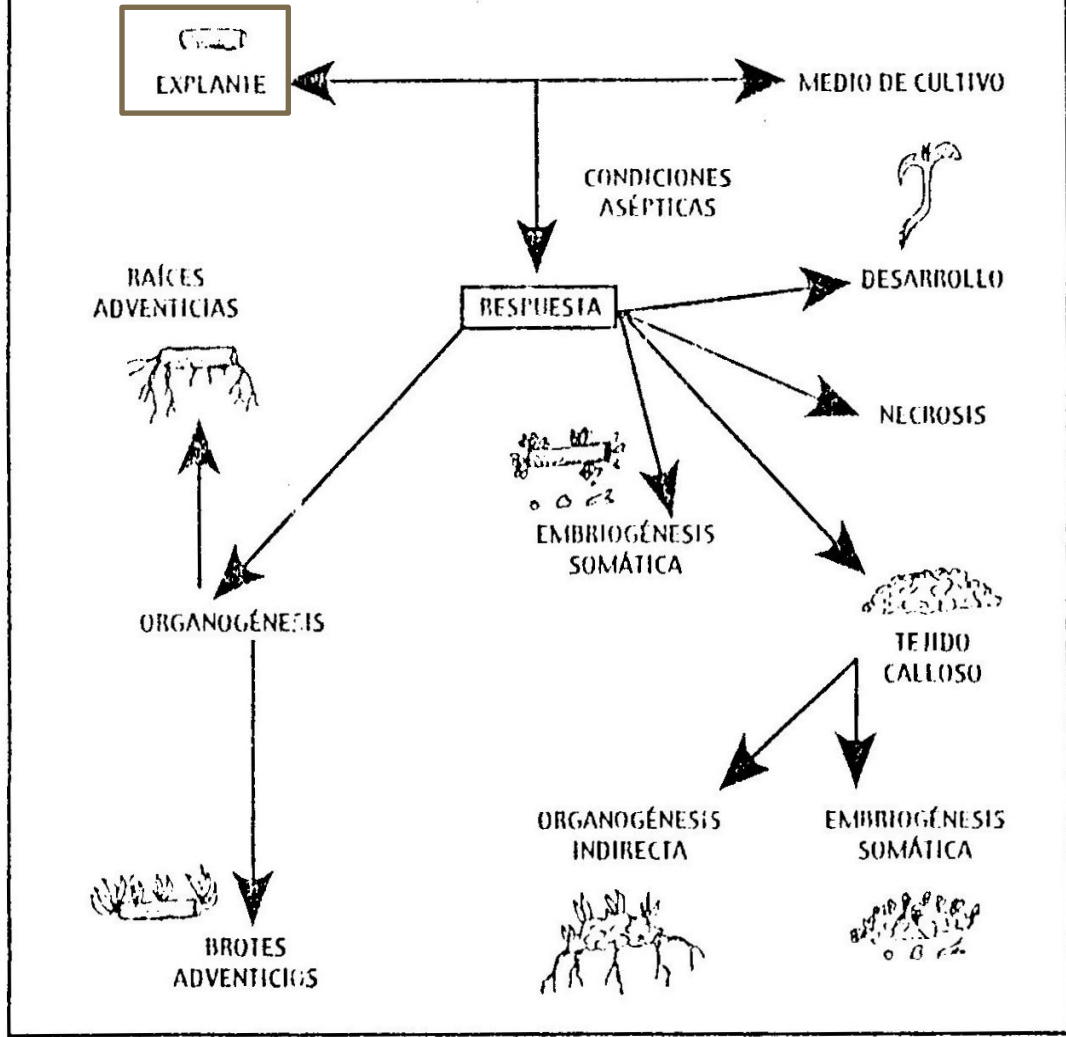


Wansang Lim, 1999

Callos, brotes y raíces



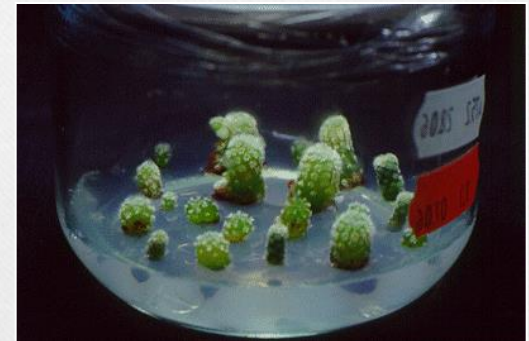
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES



Explante

Tejido separado de la planta madre y transferido a un medio artificial de crecimiento para iniciar el cultivo in vitro.

La selección del explante es un aspecto clave ya que, dependiendo de su ubicación en la planta, del tipo de tejido que contiene, de su edad cronológica y fisiológica, de su contenido endógeno de hormonas, entre otros, se comportará de una manera o de otra.



RESPUESTAS:

Existen dos posibles vías morfogénicas para la diferenciación de plantas completas

• Posibles vías morfogénicas:

- Organogénesis
- Embriogénesis

• Diferencias entre las dos posibles vías:

- La organogénesis es de origen **pluricelular**. Un grupo de células se desdiferencia inicialmente para luego rediferenciarse dando lugar a un órgano vegetal (brotes, raíces). No se obtienen por esta vía plantas completas en una sola etapa.
- La embriogénesis se presupone de origen **unicelular**. Una célula del explanto se aísla y constituye el punto de partida para la obtención de un embrión somático. Se diferencian embriones o estructuras bipolares. El resultado es una planta completa.

Morfogénesis

Se encuentran involucrados factores como la edad de la planta madre dadora de explantos, el tipo de explanto, el medio de cultivo, los reguladores del crecimiento y las condiciones artificiales de cultivo.

- **Organogénesis:** formación de órganos (tallos y raíces)

Directa

Indirecta (callo)

- **Embriogénesis:** formación de embriones somáticos

Directa

Indirecta (callo)

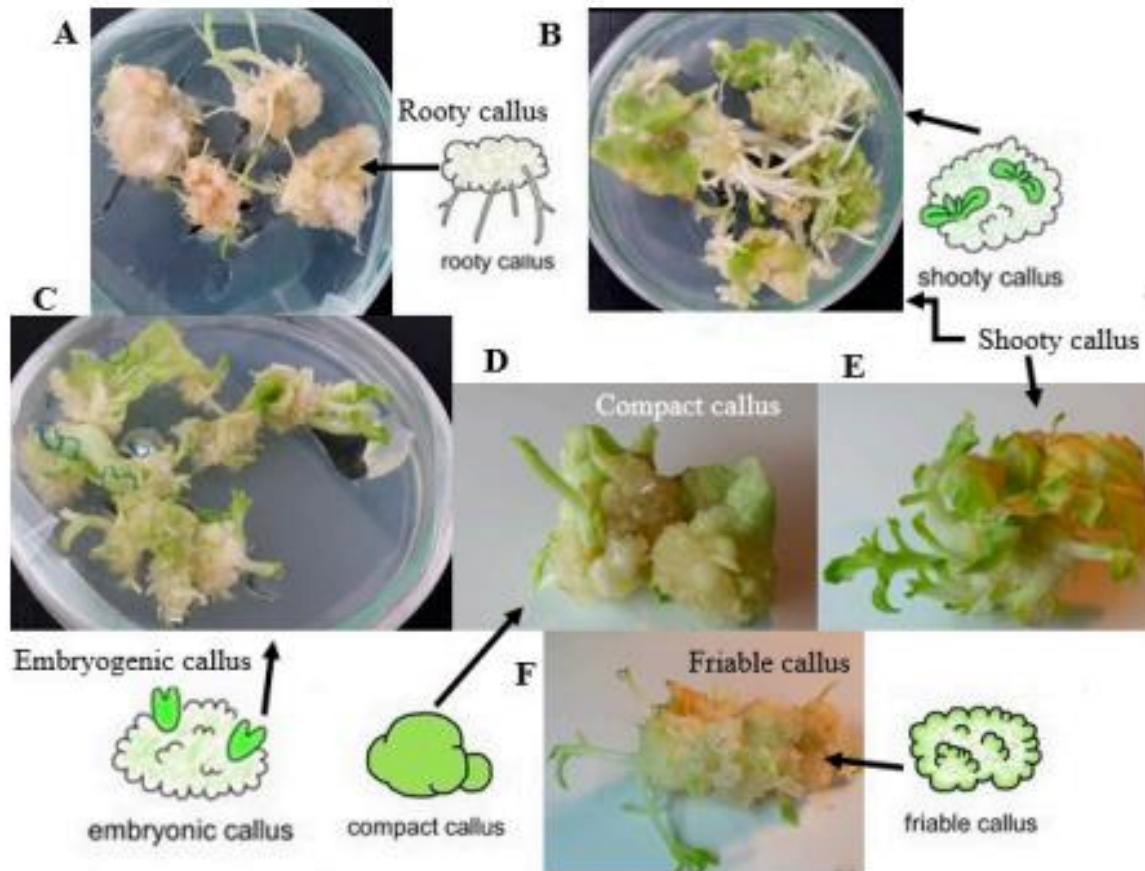
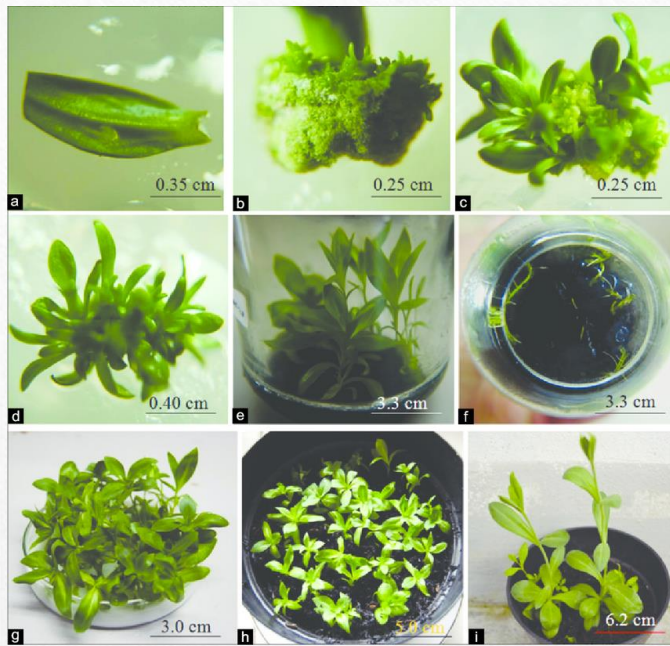


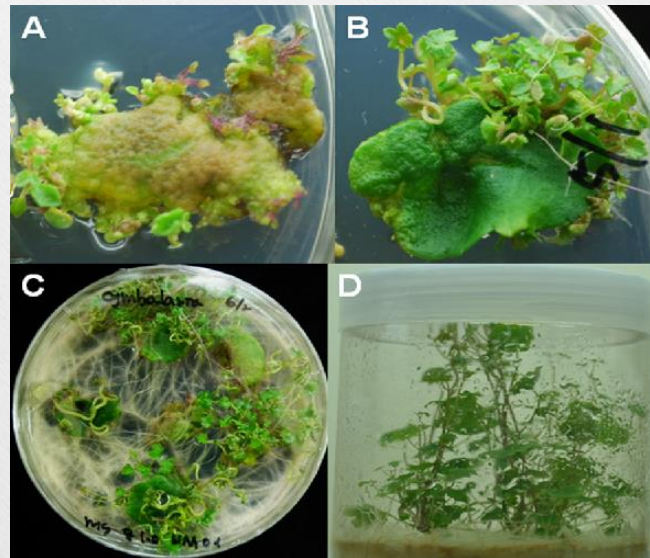
Figure 1. Morphology of different stages during plant organogenesis in *Nicotiana rustica*. (A) Root regeneration from callus tissue. (B) Shooty callus. (C) Embryo regeneration from callus tissue. (D) Compact callus (E) Shoot regeneration from callus tissue (F) Shoot clumps regenerated from a friable callus.

Organogénesis
a partir de hoja
de *Lisianthus*



Organogénesis de *Pinus*

Organogénesis de
Cymbalaria



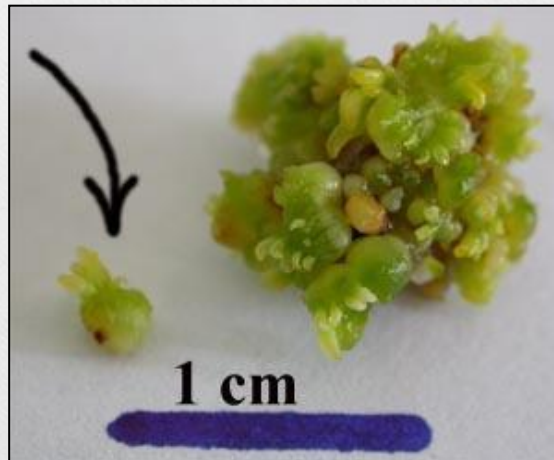
Embriogénesis somática

Es el proceso mediante el cual se logra el desarrollo de embriones a partir de una célula que no es el producto de una fusión gamética.

Los embriones somáticos tienen la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un **proceso asexual** por lo que la nueva planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial.



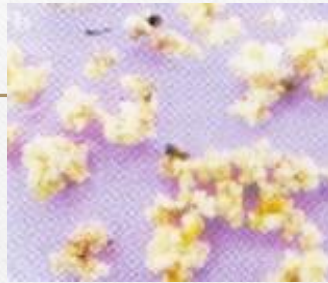
Callo embriogénico



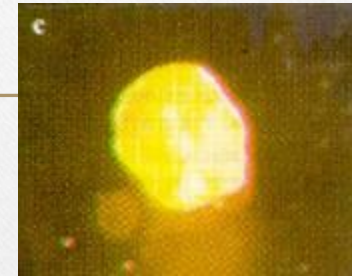
Embriogénesis somática



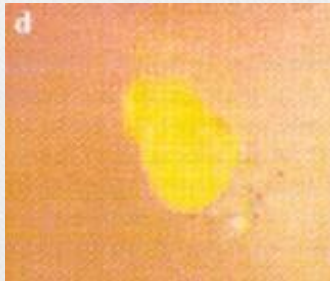
Callo
embriogénico



embriones



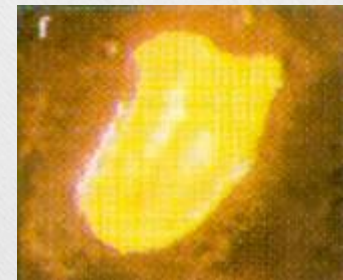
Embrión en estado
globular



Embrión en estado
de corazón



Embrión en estado
de torpedo

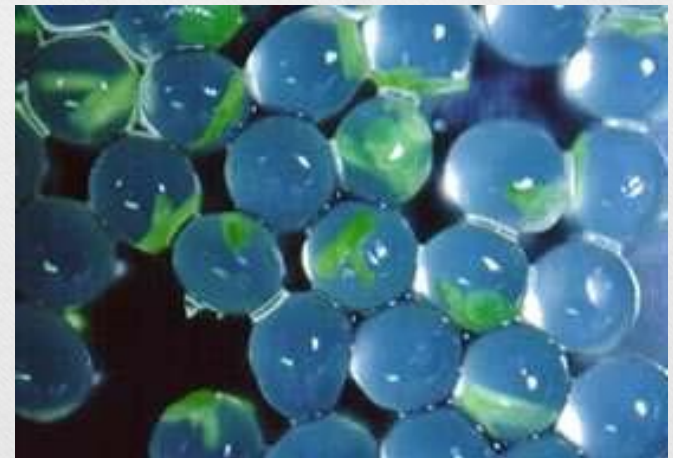
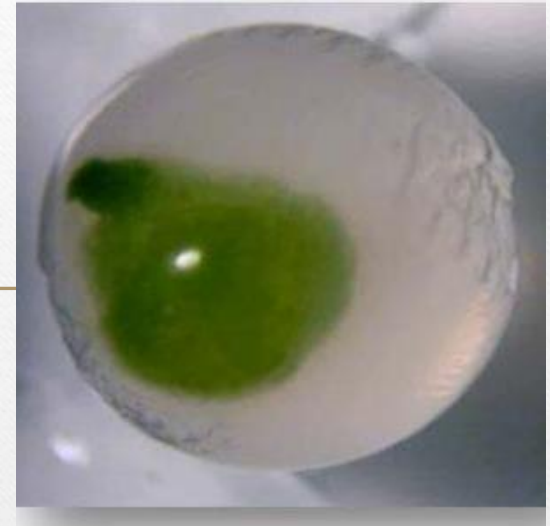


Embrión en estado
cotiledonar

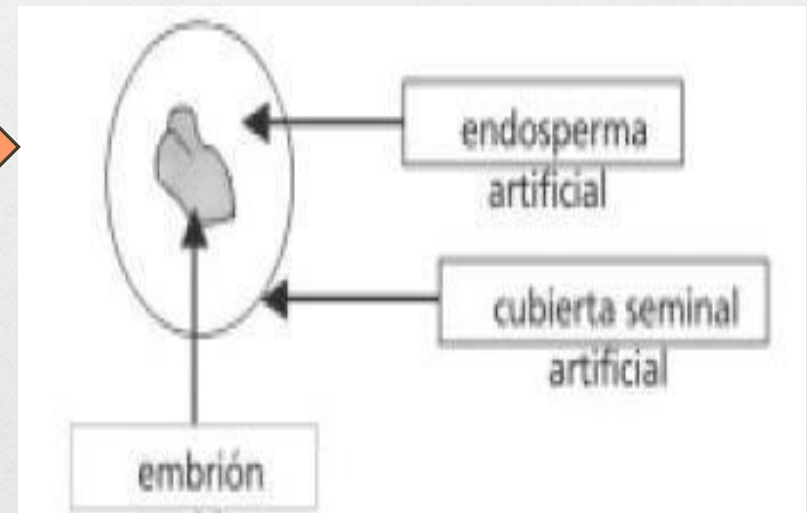
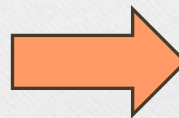
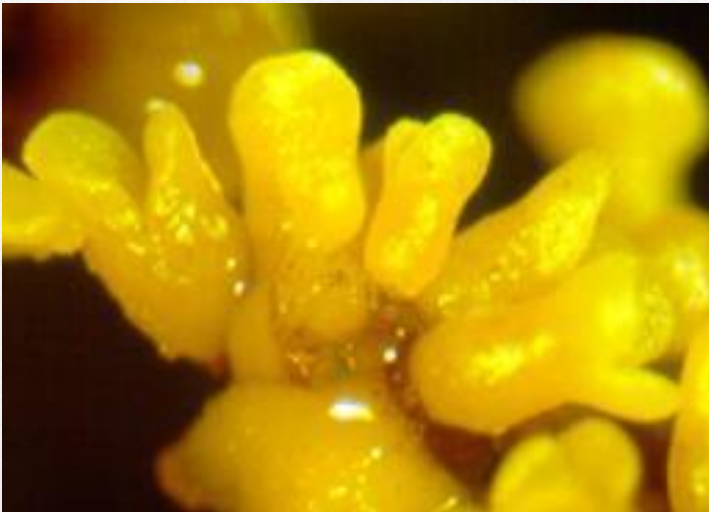
Embriogénesis somática semilla artificial



Embriones maduros encapsulados
en alginato de sodio

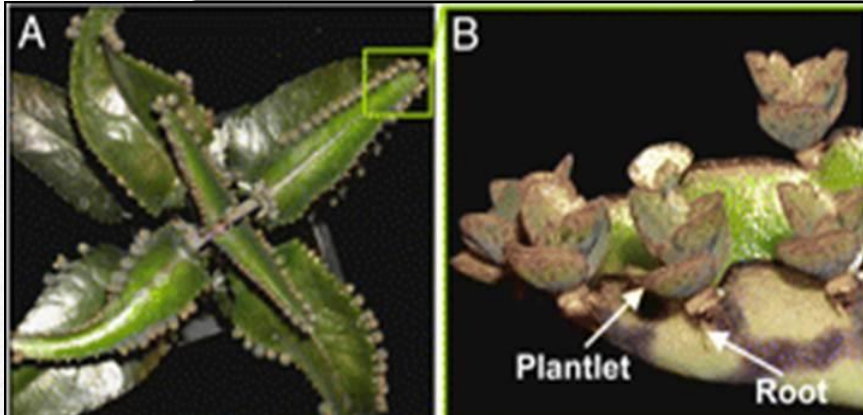


Una semilla artificial es una estructura vegetal de origen asexual obtenida in vitro a partir del cultivo de tejidos y modificada, que intenta imitar una semilla natural.

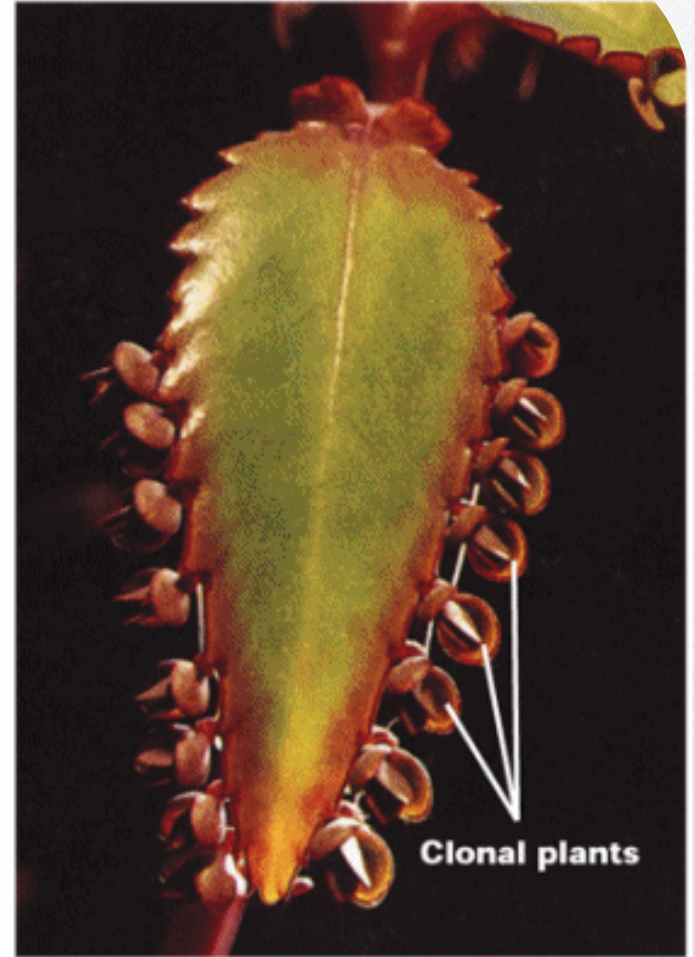


Embriogénesis somática natural: kalanchoe

(A)



(B)



Hasta ahora vimos:

- Medios de cultivo: que tienen y cómo se preparan
- Explantes: que son y cuáles son los mejores
- Posibles respuestas: brotes, raíces, embriones, plantas completas



Aplicaciones: micropropagación

Micropropagación

La micropropagación es una técnica rápida de multiplicación que permite obtener un gran número de individuos de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto, utilizando el cultivo *in vitro* de tejidos.



Requiere un control integral de las condiciones para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana.

La micropropagación incluye varias fases:

FASE O : Preparación de la planta madre

FASE I : Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia

(elección del explante y desinfección superficial)

FASE II : Multiplicación de brotes

FASE III : Enraizamiento de brotes

FASE IV: Aclimatación, pasaje de las plantas crecidas in vitro a las condiciones de maceta o campo



FASE O: PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE

- Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantos con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado.
- Importancia del cuidado de las **plantas madres**



FASE I: ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO EN CONDICIONES DE ASEPSIA

Desinfección:

- Lavado del material con agua corriente, eliminación de las partes muertas e infectadas de la planta.
- Introducción de la porción de planta en alcohol diluido al 80% durante unos segundos.
- Sumergir la planta en una solución de hipoclorito de sodio o Ca con un agente humectante durante 10-30 minutos.
- Enjuague del material con agua estéril para eliminar la solución de hipoclorito de sodio. El enjuague debe tener lugar bajo condiciones de asepsia, y suele realizarse en tres veces sucesivas de unos 2 minutos cada una.



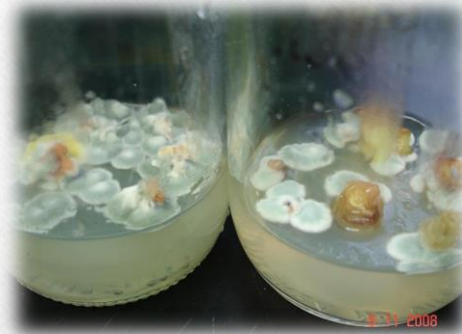
Siembra en condiciones de esterilidad



PROBLEMAS QUE SURGEN EN EL ESTABLECIMIENTO DE LOS EXPLANTES

1. Contaminación
2. Oxidación
3. Vitrificación
4. Necrosis
5. Falta de respuesta
6. Otros problemas

↳ Habitación
Variabilidad



FASE II: MULTIPLICACIÓN DE LOS BROTES



Multiplicación de *Pelargonium graveolens*



Auxinas

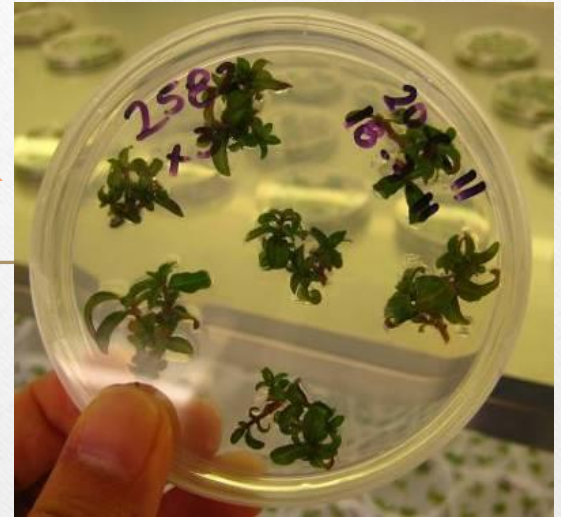


Citocininas

Plantines de STEVIA
Morita II in vitro



Giberelinas



FASE III: ENRAIZAMIENTO DE LOS EXPLANTOS

Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio que solo contenga auxinas o que el balance hormonal sea favorable a auxinas.



FASE IV: ACLIMATACIÓN



Control de:
Temperatura
Humedad
Irradiancia
Patógenos



- Paulatina adaptación de las vitroplantas a las condiciones de invernadero.

- Fase de endurecimiento.





Plantines de *Begonia rex*



Plantines de *Violeta africana*



Aclimatación

- Optimizar la transferencia del ambiente in vitro a condiciones de invernáculo o campo.
- Minimizar pérdidas y acelerar el proceso.

PLANTAS OBTENIDAS IN VITRO:

Hojas delgadas

Tallos débiles

Raíces débiles y poco funcionales

Conexión tallo-raíz incompleta

Baja tasa fotosintética

PROCESO GRADUAL:

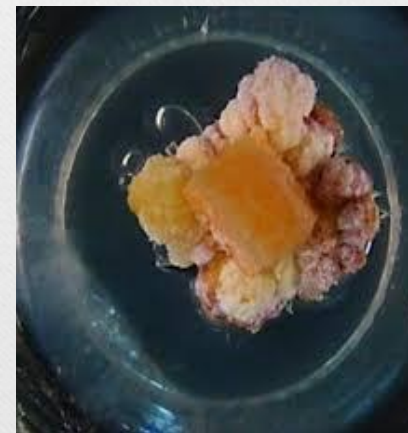
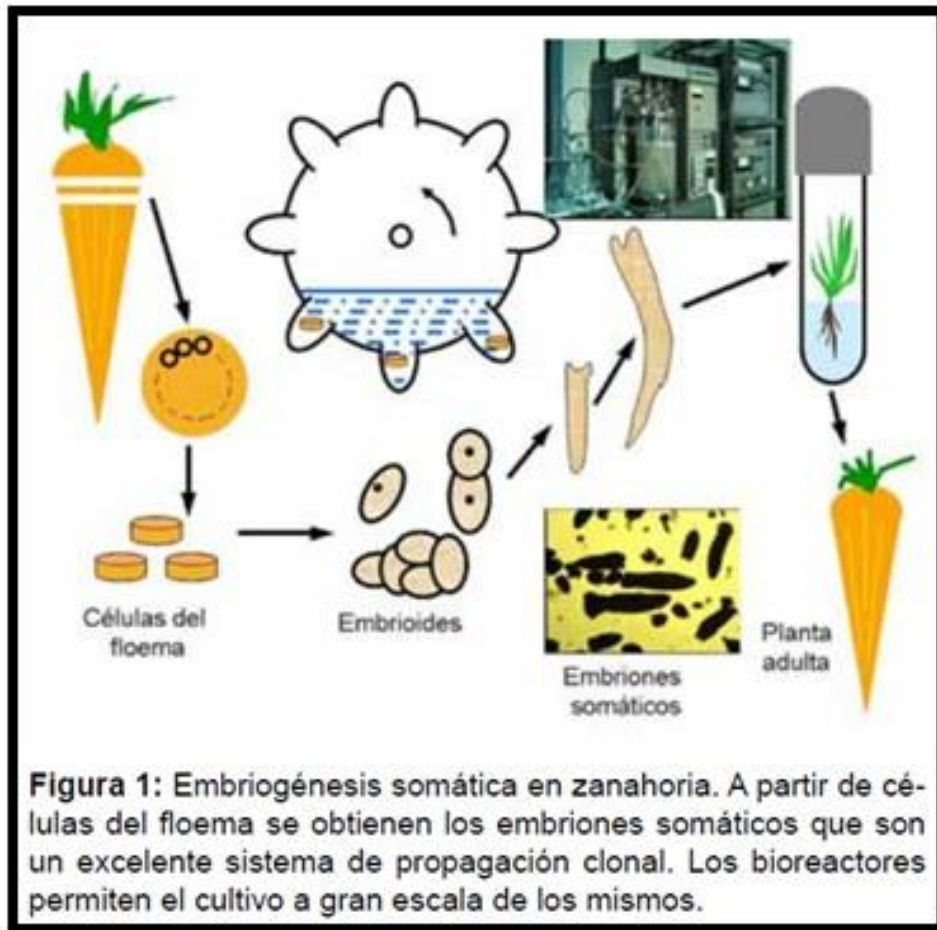
Disminución de la HR

Crecimiento autotrófico

Condiciones sépticas.



Micropropagación de zanahoria



Micropropagación de rauli

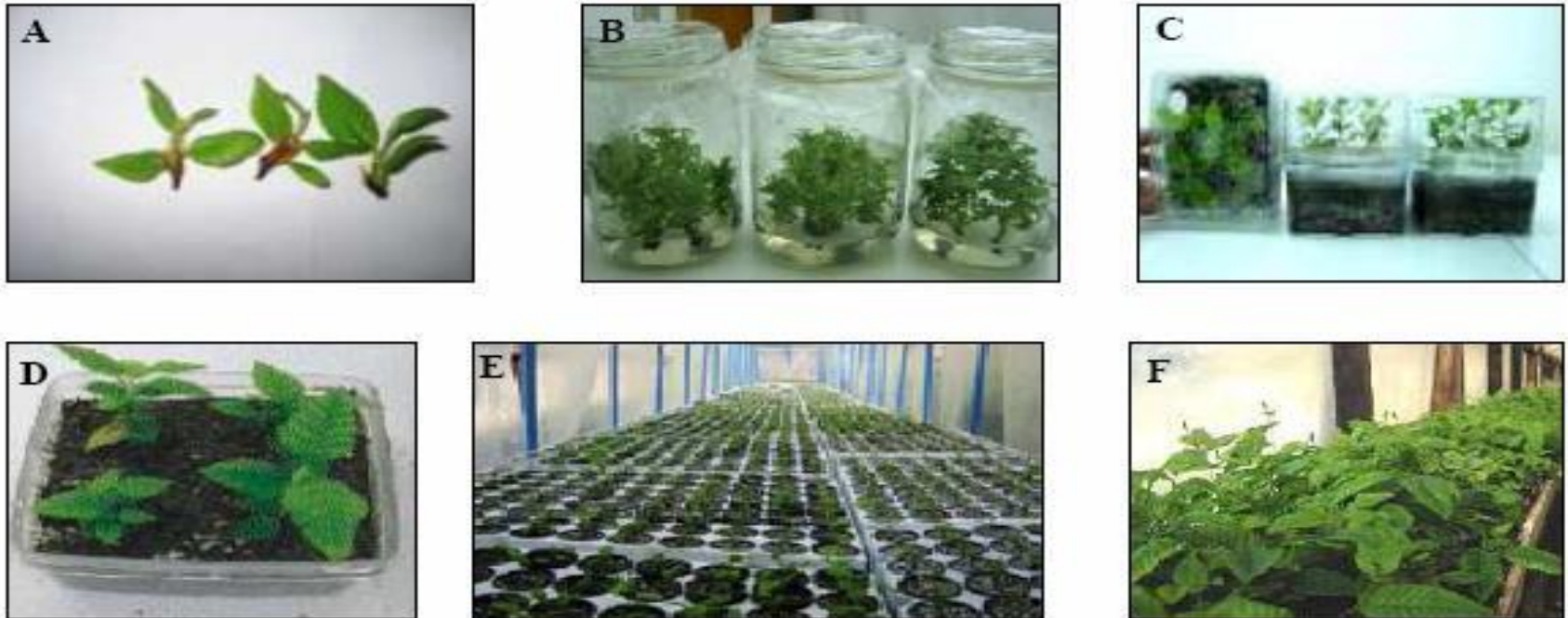
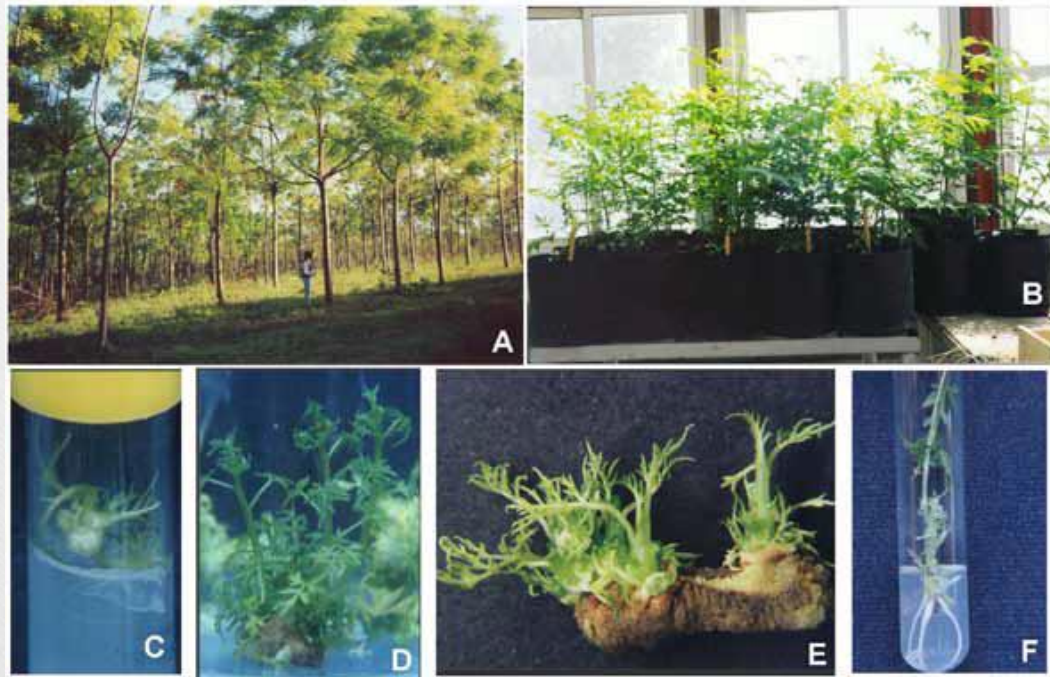


Figura 1. Etapas del proceso de micropropagación de rauli. A) explante inicial: brotes apicales; B) multiplicación de brotes; C) etapa de pre-aclimatación en laboratorio; D) plantas a transferir a invernadero; E) plantas bajo túnel plastificado en invernadero para mantener alta humedad; F) plantas después de tres meses en invernadero.

Figure 1. Stages of the rauli micropropagation process. A) initial explant: apical shoots, B) shoot multiplication; C) laboratory pre-acclimation stage; D) plants to be transferred to the greenhouse; E) plants under plastic tunnel in greenhouse to maintain high humidity; F) plants after three months in greenhouse.

Micropropagación *Melia azedarach* var. *gigantea* L.

- A) Huerto semillero con ejemplares de seis años de edad, Misiones
- B) Etapa 0, plantas de 6 meses de edad en invernadero y utilizadas como donantes de meristemas.
- C) Etapa 1: Establecimiento del cultivo.
- D) Etapa de multiplicación
- E) Explantos con problemas de vitrificación y presencia de callo.
- F) Vástago enraizado para pasar a la etapa de aclimatización.



Micropropagación de arándano

Secciones uninodales



Planta en el campo

Material vegetal



Hijos de 20-30 cm de plantas de *A. vera* en condiciones de campo. Tomados en época de seca (diciembre-abril)

Establecimiento *in vitro*



Desinfección



2% NaClO 15 min

Multiplicación *in vitro*
Medios semisólidos



6-BAP+AIB
45 días de cultivo

Aclimatización *ex vitro*



100% Compost de cachaza
60 días

Esquema propuesto de propagación *in vitro* de *Aloe vera* L.

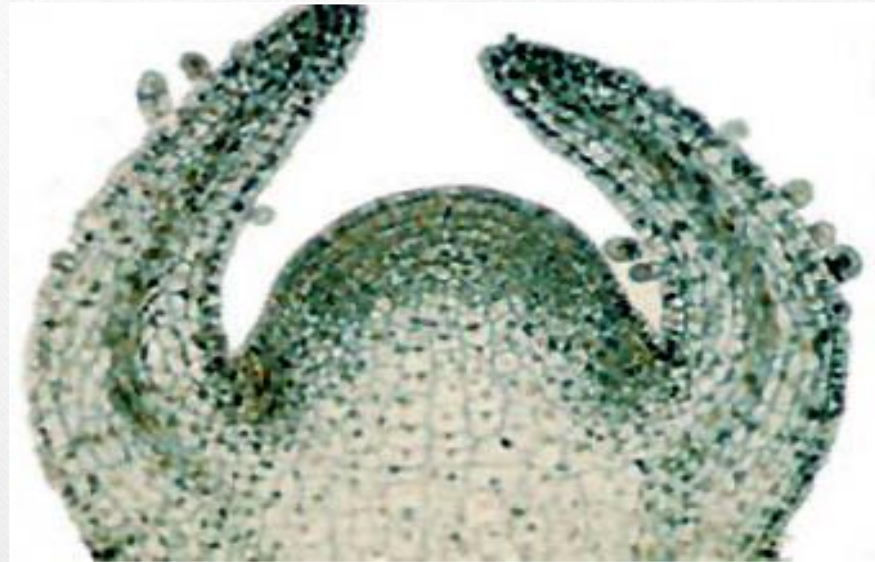


Sistemas de micropropagación vegetal:

Casos particulares

- Cultivo de meristemas
 - Microinjertos
-

Los meristemos determinan el crecimiento de la planta y dan origen a sus diferentes órganos



- Posibilitan la micropropagación de diferentes especies vegetales.
- Constituyen el explanto ideal para liberar de patógenos *in vitro* a plantas infectadas por virus, hongos y/o bacterias.
- Son ampliamente utilizados como explantos para la criopreservación y conservación de germoplasma.

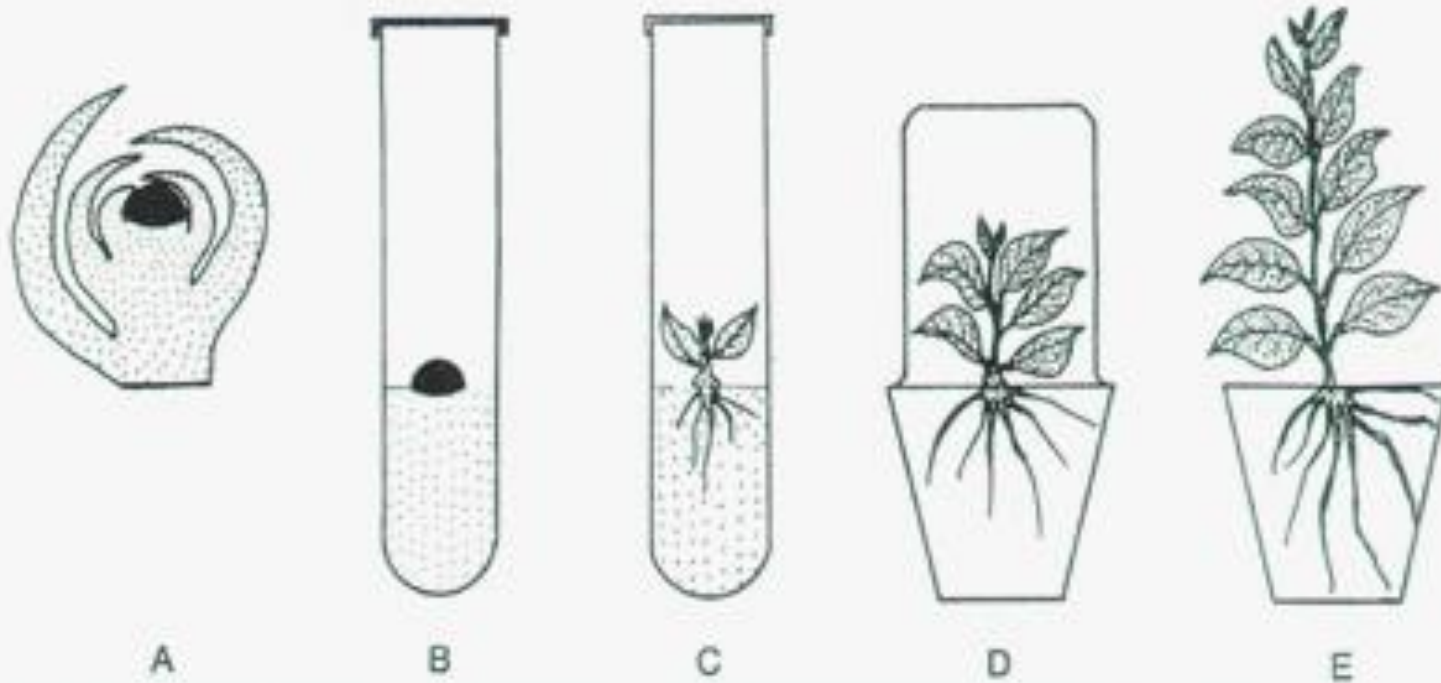


FIG. 8.3. Meristem-tip culture. (A) Apical meristem showing section to be excised. (B) Excised meristem tip cultured on agar medium. (C) Plantlet regenerated from excised meristem tip. (D) Plantlet transferred to sterile soil. (E) Virus-free plant growing in soil.

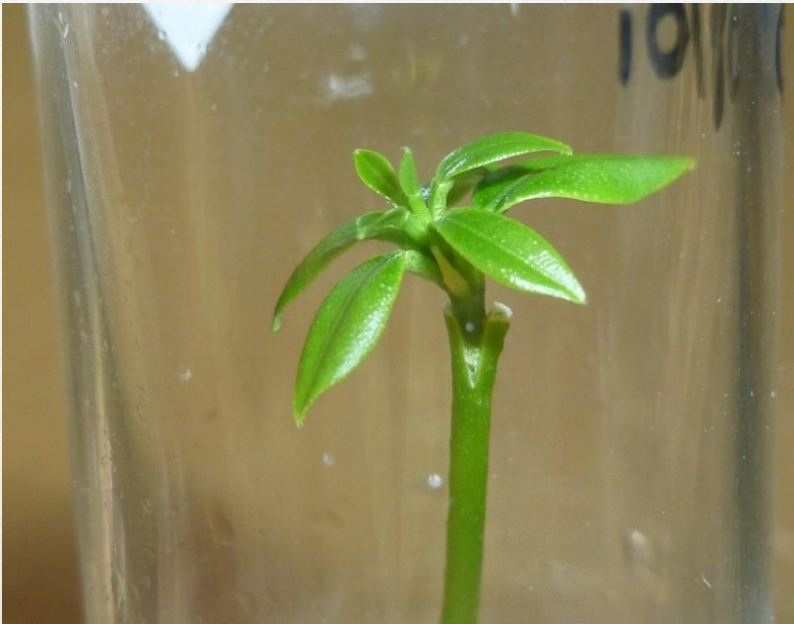
El cultivo de meristemos facilita la eliminación de patógenos

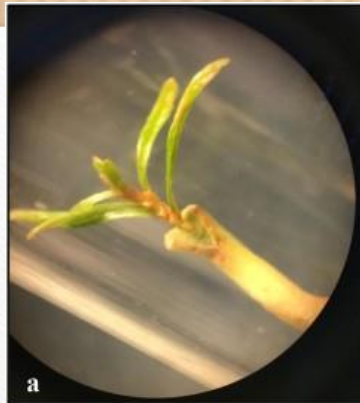
- El domo meristemático no está vascularizado (muchos patógenos se translocan por los tejidos de conducción).
- El número de partículas virales es menor en los meristemos que en otros tejidos.
- La velocidad de división celular en el meristemo es mayor que la velocidad de replicación de un virus.
- Las primeras plantas saneadas a partir del cultivo de meristemos fueron obtenidas por Morel y Martin entre 1952 y 1957 a partir de cultivos de papa y *Dahlia*.

Microinjerto de ápices caulinares in vitro

Obtención de plantas libres de patógenos

La aplicación más importante de la técnica del microinjerto es la obtención de plantas sanas a partir de plantas enfermas. Es efectivo para la eliminación de todos los patógenos de cítricos con los que ha sido ensayada. Se incluyen también enfermedades causadas por virus, viroides, micoplasmas, bacterias de floema.





Argania spinosa

Citrus

Ventajas y aplicaciones de la micropropagación vegetal

- Propagación vegetativa rápida y a gran escala
- Uniformidad del material clonado
- Multiplicación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales
- Reducción en el tiempo de multiplicación y en el espacio requerido
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado
- Introducción rápida de nuevos cultivares
- Conservación de germoplasma
- Facilidades para el intercambio internacional de material vegetal
- Cultivo de meristemas y Microinjertos

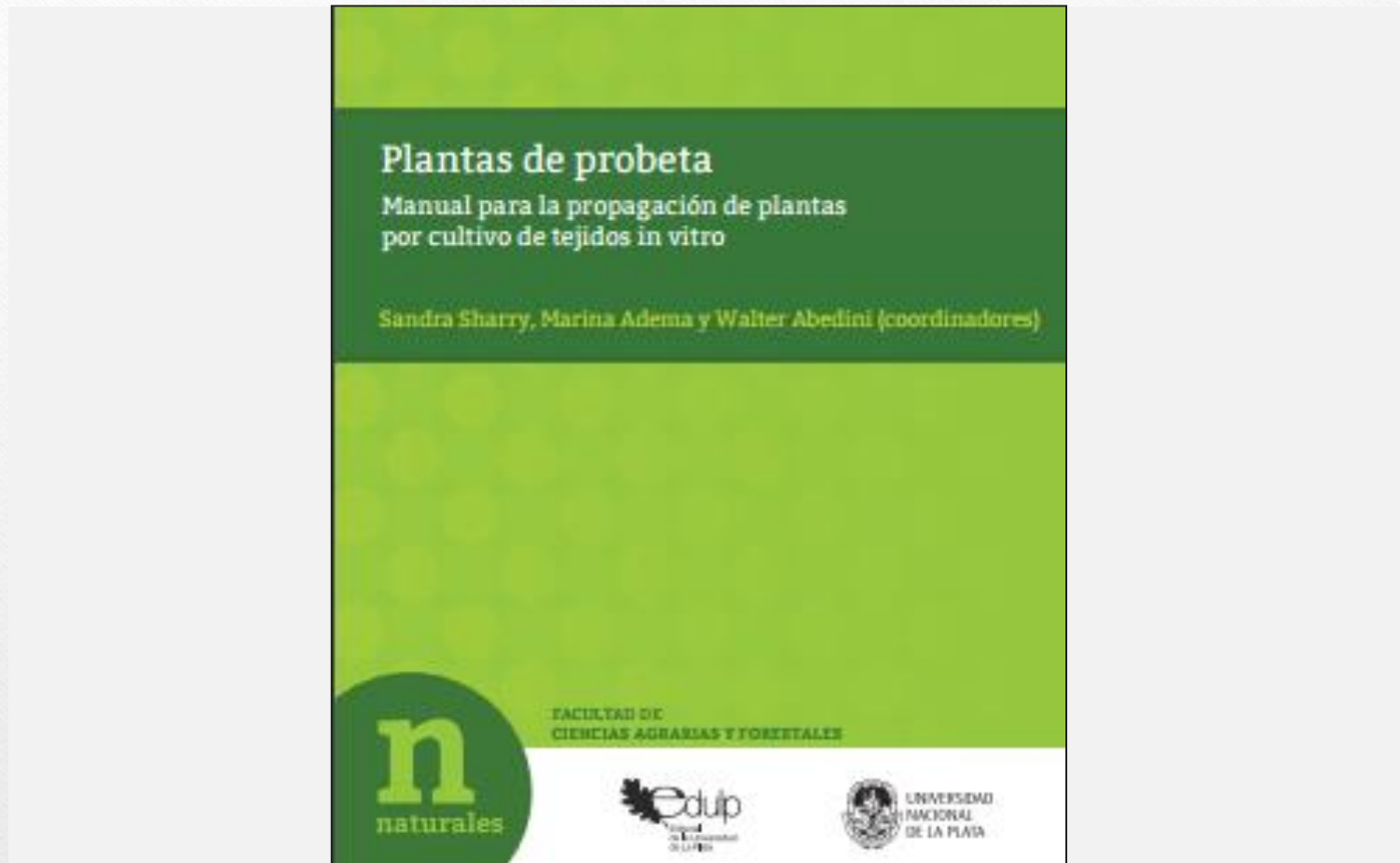
Costos de la micropropagación – ¿Desventaja?

- Capital para la instalación del laboratorio
- Costo de la mano de obra
- Costo de los materiales
- Características del comportamiento in vitro del material:
 - Facilidad de establecimiento, rejuvenecimiento, etc.
 - Tasa de multiplicación
 - Enraizamiento in vitro/ex vitro
- Pérdidas que ocurren en cada etapa del proceso:
 - contaminación
 - hiperhidricidad
 - % plantas que no enraizan
 - % plantas que no sobreviven la aclimatación

Micropropagación vs propagación vegetativa convencional

- Es posible propagar algunas especies que no se propagan “in vivo”.
- Se necesita muy poco material de partida.
- El crecimiento es mayor por rejuvenecimiento y sanidad.
- Se requiere poca área para el cultivo del material.
- Se elimina el efecto estacional.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA



http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo__.pdf-PDFA.pdf?sequence=1

¡¡ Muchas gracias !!

