

Elección, preparación y establecimiento de los explantos para iniciar un cultivo bajo condiciones de asepsia

Introducción

Actualmente, en todo cultivo de tejidos vegetales pueden identificarse distintas etapas o fases bien definidas, cada una con sus objetivos específicos. Dos de ellas son comunes a todos los protocolos seguidos, son las Fase 0 o preparativa y la Fase I también llamada de establecimiento o iniciación de los cultivos.

Fase 0: preparativa

Inicialmente, esta fase fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban comúnmente en la fase I. Sin embargo, en la actualidad existe un consenso que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de trabajo eficiente y repetible, por lo que cada vez se le va prestando mayor atención. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético. En esta fase es necesario tener en cuenta:

- Selección de las plantas donantes:

La iniciación de todo proceso de cultivo de tejidos sólo tiene sentido cuando se emplea un material de partida adecuado. La constitución genética de la planta donante es el primer factor a evaluar. Para la mayoría de las plantas propagadas *in vitro*, el material inicial es una planta élite seleccionada por características fenotípicas especiales.

- Estado fisiológico de la planta donante: es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas con diferente edad fisiológica. Generalmente, se utilizan plantas en estado de crecimiento activo: vigoroso y sano.

Precisamente para uniformar el estado fisiológico de las plantas donantes, o sea de los explantos, es que se incluyen en esta etapa una serie de pretratamientos:

- La selección y crecimiento de la planta madre bajo condiciones higiénicas reduce notablemente los contaminantes, principalmente fúngicos. La mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* provienen de la planta madre. Si se logra establecer un explanto axénico, la contaminación posterior será debida a fallas en la técnica o procedimiento. Es por esta razón que siempre es más recomendable diagnosticar y tratar las plantas donantes, donde es mucho más fácil detectar los contaminantes.
- Crecimiento de las plantas en ambientes controlados: el impacto de la fase 0 no está limitado solamente al aspecto sanitario de los explantos sino también a la supervivencia de los mismos. Una práctica común para uniformar el estado fisiológico de los explantos es cultivar las plantas donantes en ambientes controlados (luz, temperatura y humedad relativa) con niveles óptimos para cada especie en particular.

Fase 1: establecimiento de los cultivos axénicos.

Esta etapa consiste básicamente en la elección del explanto y la desinfección del mismo para iniciar un cultivo axénico.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede iniciarse a partir de diferentes órganos o tejidos, siendo de gran importancia en la posterior respuesta del explanto: su tamaño, tipo y época de recolección.

Los explantos tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro*.

El tamaño del explanto es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explanto es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño del explanto es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas.

Desinfección del explanto

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana. Hoy en día la contaminación es uno de los principales y más severos problemas para los micropropagadores de plantas en el mundo, es un fenómeno multicausal que debe tenerse en cuenta desde la concepción misma de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Factores tan disímiles como el diseño arquitectónico de los locales de trabajo, la procedencia y edad del explanto inicial, la higiene ambiental o la habilidad y preparación técnica de los operarios, entre otros, pueden favorecer o controlar la incidencia de contaminantes microbianos.

Como contaminantes frecuentes en el cultivo *in vitro* se mencionan a los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras. Muchos no son conocidos por provocar daños a las plantas en el campo y sin embargo se convierten en patógenos *in vitro*. Su efecto negativo sobre las plantas puede ser considerable si tenemos en cuenta que compiten con ellas por los nutrientes del medio de cultivo y les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de cultivo de metabolitos tóxicos. De esta forma pueden reducir los coeficientes de multiplicación, inhibir el enraizamiento y ocasionar la muerte de la planta.

Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantos son desinfectados superficialmente. El procedimiento para la desinfección superficial debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantos. No es factible recomendar un procedimiento general para este propósito y se deben considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explanto.

Los explantos provenientes de vegetales que crecen en invernáculo o en cuartos climatizados son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo. También es más fácil la desinfección de explantos o de órganos jóvenes que la de explantos provenientes de material adulto.

Los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de Calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl_2). Los tres primeros se emplean en concentraciones de 1 a 3 % en tiempos de 10 a 20 minutos, el alcohol se usa generalmente al 70 % y se emplea en combinación con otros desinfectantes.

Terminado el tiempo de desinfección se realizan varios enjuagues con agua destilada estéril para eliminar los restos de los agentes químicos, de esta forma el material está en condiciones de ser sembrado en el medio de cultivo.

Como se mencionó anteriormente el éxito de los sistemas de propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana, por lo tanto es necesario establecer cultivos asépticos, esto implica:

- 1- trabajar en ambientes adecuados
- 2- esterilizar los medios de cultivo (autoclave)
- 3- desinfectar superficialmente los explantos, para eliminar bacterias y hongos exógenos (como se explicó anteriormente)
- 4- realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia

Objetivos

- Aprender las diferentes técnicas de acondicionamiento y desinfección de explantos utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales
- Realizar un cultivo de explantos bajo condiciones de asepsia

Materiales

- etanol 70 %
- hipoclorito de sodio (lavandina)
- Tween 20 (agente surfactante)
- agitadores magnéticos, matraces, mecheros
- agua bidestilada, previamente autoclavada*
- tubos de ensayo, frascos, cajas de Petri, previamente autoclavados*
- pinzas, escalpelos
- campana de flujo laminar
- medio de cultivo, previamente autoclavados*
- explantos

* El material de vidrio a usar durante la siembra y los medios de cultivo deben ser esterilizados en autoclave a $1,05 \text{ kg/cm}^2$ y $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos, para eliminar los microorganismos (bacterias y hongos).

Metodología

1. Tipo de explanto:

Se utilizarán como explantos segmentos de tallo (secciones nodales e internodales) y hojas obtenidos de plantas madre de *Pelargonium graveolens*, que crecen en condiciones de invernáculo en la ciudad de La Plata; y secciones nodales de *Nicotiana tabacum*.

2. Elección, acondicionamiento y desinfección de los explantos.

Pelargonium graveolens:

Para su acondicionamiento los explantos serán tratados en superficie con fungicida (Benlate 1500 ppm) y ácido ascórbico durante 2 horas. La desinfección de las secciones nodales e internodales se realizará con etanol (70%) durante 2 minutos, peróxido de hidrógeno (5 vol.) 3 minutos, hipoclorito de sodio comercial (40%) durante 50 minutos y luego, se lavarán tres veces con agua destilada estéril. Las hojas serán desinfectadas con etanol (70%) durante 2 minutos, hipoclorito de sodio comercial (30%) durante 30 minutos y luego, se lavarán tres veces con agua destilada estéril. Los explantos desinfectados se cortarán con bisturí en segmentos de aproximadamente 1 cm de largo, en el caso de las secciones de tallo y las hojas en superficies de 1 a 1.5 cm² incluyendo la zona de la nervadura central y parte del pecíolo. A continuación los explantos están en condiciones de ser sembrados en el medio de cultivo.

Nicotiana tabacum:

Los segmentos de tallo de 5 cm de longitud aproximadamente se tratarán con alcohol etílico 70° durante 1 minuto, luego se sumergen en hipoclorito de sodio al 20% durante 30 minutos y finalmente se enjuagan tres veces con agua destilada estéril.

3. Trabajo en condiciones de asepsia.

A - Uso de la campana de flujo laminar

- encender la luz y el flujo de aire. Dejar que circule alrededor de 15 minutos antes de comenzar el trabajo

- atomizar la superficie de trabajo y los materiales con etanol 70 % (excepto los filtros)
- encender los mecheros
- rociarse las manos con alcohol al 70 % y dejarlas secar
- manipular los explantos lo menos posible

B - Siembra de explantos

- enjuagar los explantos 2 a 3 veces con agua bidestilada estéril
- colocar los explantos desinfectados y enjuagados en una caja de Petri estéril
- sumergir las pinzas y escalpelos en etanol y luego flamearlos en el mechero
- con la ayuda de estos instrumentos, sembrar los explantos en los tubos de ensayo o recipientes que contengan el medio nutritivo estéril. Tapar.

C - Condiciones de cultivo

- incubar los diferentes cultivos bajo temperatura constante ($25^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$), con una intensidad lumínica de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se puede también incubar en oscuridad, dependiendo los requerimientos del explanto y de la respuesta buscada.

4. Observaciones

- revisar periódicamente para detectar contaminación
- controlar las respuestas de los explantos al medio de cultivo

FASE DE MULTIPLICACION

En este trabajo práctico se seguirán tres líneas morfogénicas para la regeneración de plantas *in Vitro*.

TIPOS DE MORFOGÉNESIS

En condiciones de cultivo *in vitro*, las células somáticas pueden regenerar órganos como brotes, raíces y/o flores (Organogenesis) o embriones (Embriogénesis somática) como respuesta a un determinado estímulo. Ambas vías de regeneración, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo.

ORGANOGENESIS

La organogénesis incluye tanto rizogenesis como caulogenesis (formación de raíces y tallos respectivamente). A partir de la siembra *in vitro* puede inducirse la formación de nuevos órganos de manera directa a partir de los explantos (organogénesis directa) o bien en forma indirecta a partir de callos (organogénesis indirecta).

El callo es esencialmente un tejido parenquimatoso capaz de proliferación mas o menos indefinida cuando las porciones son cultivadas a intervalos, en un medio nuevo bajo condiciones asépticas.

El mecanismo regulador de los explantes que experimentan organogenesis involucra el balance de auxinas y citocininas: una relación relativamente alta de auxinas/citocininas favorece la formación de raíces y la inversa favorece la formación de brotes. La relación intermedia favorece la proliferación de callos.

EMBRIOGENESIS SOMATICA

Ciertas células bajo condiciones de cultivo *in vitro*, tienen la capacidad de formar embriones mediante un proceso similar a la embriogénesis cigótica. A este proceso se lo denomina **embriogénesis somática** y es una de las pruebas más notables de la totipotencialidad celular.

Los embriones somáticos tiene, al igual que los cigóticos, 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.

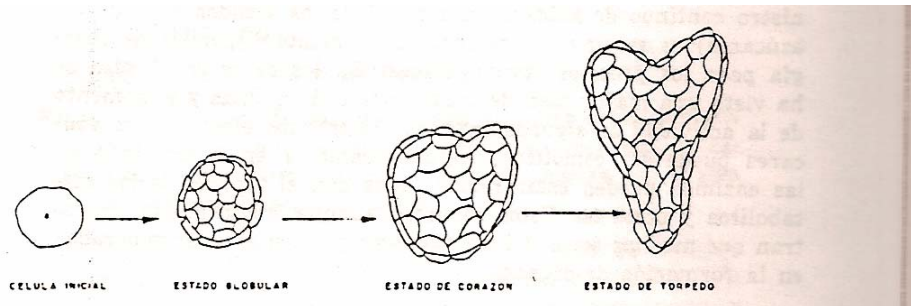
Como embriones somáticos, asexuales o adventicios se han definido los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas normales.

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*, la directa y la indirecta. En la **embriogénesis somática directa (ESD)**, los embriones aparecen directamente sobre el explanto original. Por otro lado la **embriogénesis somática indirecta (ESI)**, en un primer paso es indispensable obtener un tejido calloso o bien una suspensión celular embriogénica a partir de los cuales se obtendrá la diferenciación de los embriones somáticos en un segundo paso. Se supone que la ESD se da cuando en el explanto original existen ya células proembriogénicas, por lo que no es necesario el proceso de inducción y sólo se requiere proporcionar al tejido las condiciones adecuadas para que suceda la diferenciación de los embriones somáticos. En la ESI, el explanto no tiene células proembriogénicas, por lo que se requiere darle al tejido las condiciones para que ocurra la inducción y luego cambiarlo a otras que sean propicias para la diferenciación de los embriones.

Las células de tejidos jóvenes poseen buena proporción de células proembriogénicas, o sino, son fácilmente inducibles para que lo sean.

La célula que da origen al embrión sufre una serie de divisiones hasta formar el primer estado reconocido de los embrioides y que se denomina estado globular; continuando el desarrollo del embrión ya se establece una polaridad para dar origen al segundo estado denominado acorazonado y finalmente continua el desarrollo bipolar para dar origen a un embriode con forma de torpedo.

Para la división de la célula inicial es necesaria la presencia de auxinas.



La embriogénesis somática es una vía 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.

AUTOMATIZACIÓN EN EL PROCESO DE MICOPROPAGACION

En el sistema tradicional de micropropagación, cada brote se mantiene en frascos individuales, los cuales deben transferirse manualmente cada 20 ó 30 días a medios nutritivos frescos con el objetivo de evitar el agotamiento, alteración de las concentraciones de los nutrientes y el crecimiento excesivo de los brotes en los frascos individuales. Todo ello significa mantener una gran cantidad de frascos (proporcional al número de plantas producidas), y un número importante de personal para la preparación periódica de medios de cultivo y manejo de los brotes en sus diferentes etapas, lo que se traduce en un alto costo. Dentro de este contexto, surgió la necesidad de utilizar tecnologías innovadoras que tiendan a automatizar la micropropagación, como también a mejorar los protocolos de producción y aclimatación de las plántulas. El uso del medio líquido para la propagación in vitro tiene algunas ventajas y se considera una técnica ideal para la propagación masiva de plantas, porque reduce la manipulación y los costos, siendo además un requisito indispensable

para la automatización del proceso. Actualmente se han desarrollado sistemas de micropropagación alternativos, con el empleo de este medio.

Uno de los sistemas de automatización más conocidos es el que aplica la técnica llamada «sistema de inmersión temporal» (SIT), que mediante líquidos especiales (biorreactores), logra acelerar la producción comercial de plantas. Esta nueva técnica, consiste en sumergir en un medio líquido durante breves periodos de tiempo los explantes para acelerar la aparición de brotes, sustentados por la circulación permanente de nutrientes y de aire. Mediante un controlador automático se regula la frecuencia y el tiempo de inmersión.

Más recientemente, Teisson y Alvard (1995) desarrollaron un aparato para la micropropagación de plantas a partir de la modificación de una unidad de filtración Nalgene de 250 mL de capacidad cuyo nombre comercial es RITA (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado).

La automatización de todas, o algunas de las etapas de la micropropagación, demostró ser fundamental ya que se reduce el uso de mano de obra, reactivos y material fungible, disminuyen los niveles de contaminación y manipulación de explantes, aumentan las tasas de multiplicación y mejora el porcentaje de enraizamiento y supervivencia de las plantas en la etapa de aclimatación.

Los antecedentes indican que la producción de plantas en el SIT (Sistema de Inmersión Temporal) en biorreactores, comparada con la micropropagación convencional, reduce los costos de producción entre un 50 y un 60% y mejora sustancialmente la calidad de las plantas producidas.

Semillas sintéticas

Las semillas sintéticas o artificiales son el resultado de la aplicación del fenómeno de embriogénesis somática. Se las define como a un simple embrión somático encapsulado. Esta semilla se diferencia de la semilla verdadera en que el embrión es somático y no cigótico, y que si tiene endosperma y cubierta, éstos son artificiales. Esta semilla, puesta en condiciones adecuadas, germina y se convierte en una planta.

Las semillas sintéticas pueden fabricarse de diferentes maneras. Básicamente pueden utilizarse embriones hidratados, tal como resultan del proceso de embriogénesis somática, o bien pueden ser desecados. En algunos casos estos embriones están protegidos por cubiertas protectoras.

Se pueden distinguir 5 tipos básicos de semillas sintéticas:

- **Semillas sintéticas con embriones desecados sin cubierta.**
- **Semillas sintéticas con embriones somáticos desecados y provistos de cubierta protectora.**
- **Semillas sintéticas con embriones hidratados sin cubierta.**
- **Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados suspendidos en un gel viscoso («fluid drilling»).**
- **Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados y provistos de una cubierta protectora.**

Si bien el uso de estas semillas sintéticas aún es incipiente y sólo es utilizada en ciertos grupos de árboles forestales, las perspectivas para esta tecnología son altamente promisorias, pudiendo llegar a convertirse, en un futuro cercano, en el principal método de propagación de plantas.

Trabajo Practico de Laboratorio

1. **Organogénesis directa:** utilizar el medio de cultivo para inducir la proliferación de brotes adventicios (ver guía de medios de cultivo)

Condiciones de cultivo: la temperatura se mantendrá constante ($25^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$), la intensidad lumínica será de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y el fotoperíodo de 16 horas. Transcurridas tres semanas, los explantes se subcultivarán a un medio de cultivo con los macro y micronutrientes de MS a la mitad de su concentración y sin reguladores de crecimiento.

1. **Organogénesis indirecta:** utilizar el medio de cultivo para inducir la proliferación de callo (ver guía de medios de cultivo)

Condiciones de cultivo: la temperatura se mantendrá constante ($25^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$) y los explantos se incubarán en oscuridad.

Transcurridas tres semanas, se subcultivarán al medio de proliferación de brotes adventicios. Una vez obtenidos los brotes se utilizará un medio MS a la mitad de su concentración libre de reguladores de crecimiento.

1. **Embriogénesis somática:** utilizar el medio de cultivo para inducir la proliferación de embriones somáticos (ver guía de medios de cultivo).

Condiciones de cultivo: la temperatura se mantendrá constante ($25^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$) y los explantos se incubarán en oscuridad.

Transcurridas tres semanas, se subcultivarán a un medio de cultivo con los macro y micronutrientes de MS a la mitad de su concentración y sin reguladores de crecimiento.