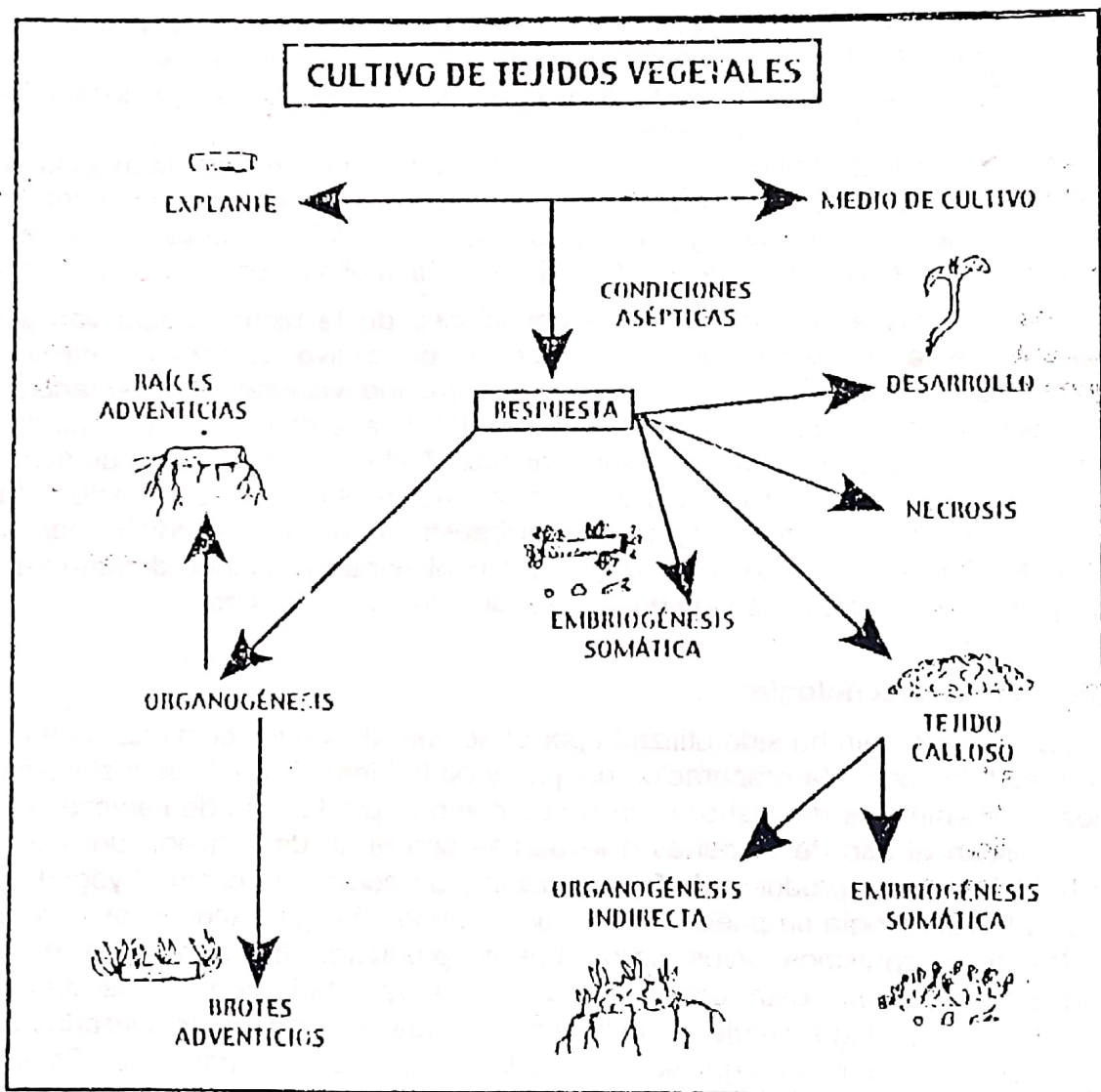


**CATEDRA DE FISIOLOGIA VEGETAL**  
**CURSO DE FISIOLOGIA VEGETAL. 2011**

**BIOTECNOLOGIA VEGETAL**  
**CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES**

Ing. Ftal. M. Sc. Marcela Ruscitti <sup>(1)</sup>, Ing. Agr. José Beltrano <sup>(3)</sup> e Ing. Agr. Daniel O. Giménez <sup>(2)</sup>



(1) Ayudante Diplomada, (2) Prof. Adjunto, (3) Prof. Titular, de la Cátedra de Fisiología Vegetal

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

# CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

## INTRODUCCION

La biotecnología vegetal es una de las disciplinas que más desarrollo ha mostrado en los últimos años. Actualmente ofrece una alternativa real para la resolución de un gran número de problemas relacionados con el mejor aprovechamiento de las plantas ya que permite incrementar la cantidad y la calidad de los alimentos de origen vegetal, además de obtener nuevos productos con diversas aplicaciones a partir de plantas.

La población mundial actualmente supera los 6000 millones de personas y en base al crecimiento calculado llegará a 11000 millones en el año 2050. El 97% de este incremento será en países en vías de desarrollo de Africa, Asia y América Latina; países en los cuales hoy existen 700 millones de personas que no tienen un adecuado suministro de alimentos. Para poder hacerle frente al crecimiento demográfico se requerirá para el 2050 duplicar o triplicar la producción de alimentos, fundamentalmente en estos países en los cuales vivirán el 90% de estos 11000 millones de personas.

Este gran reto de la humanidad sólo será posible con el empleo combinado y armónico de todos los métodos de la mejora genética de las plantas y muy especialmente la biotecnología que tendrá que jugar un papel principal desde la clonación de los individuos élites obtenidos por cualquier método de mejora hasta la obtención de plantas transgénicas.

Los expertos aseguran que las innovaciones de la biotecnología van a triplicar el rendimiento de las cosechas sin requerir tierras de cultivo adicionales, salvando así los bosques naturales y el hábitat de los animales. Otras innovaciones pueden reducir o eliminar la dependencia en agroquímicos que pueden contribuir a la degradación del medio ambiente, otras preservarán el suelo y los recursos hídricos. Muchos expertos están de acuerdo en que el mundo no se puede permitir el lujo de esperar más antes de empezar a actuar. Si actuamos ahora desarrollando la tecnología y la infraestructura imprescindible para cubrir las necesidades futuras de la humanidad, podremos alimentar al mundo durante los siglos que vienen y mejorar la calidad de vida de la población de todo el mundo.

### **Definición de biotecnología:**

La biotecnología ha sido utilizada por el hombre desde los comienzos de la historia en actividades tales como la preparación del pan y de bebidas alcohólicas o el mejoramiento de cultivos y de animales domésticos. Procesos como la producción de cerveza, vino, queso y yogurt implican el uso de bacterias o levaduras con el fin de convertir un producto natural como la leche, en un producto de fermentación más apetecible como el yogurt. En términos generales biotecnología se puede definir como el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre. La biotecnología moderna está compuesta por una variedad de técnicas derivadas de la investigación en biología celular y molecular, las cuales pueden ser utilizadas en cualquier industria que utilice microorganismos o células vegetales o animales. Es la aplicación comercial de organismos vivos o sus productos, la cual involucra la manipulación deliberada de sus moléculas de DNA. Por tanto, podemos decir que la biotecnología abarca desde la biotecnología tradicional, muy conocida y establecida, como por ejemplo la fermentación de alimentos, hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas del DNA recombinante (ingeniería genética), los anticuerpos monoclonales y los nuevos métodos de cultivo de células y tejidos.

## Clasificación y técnicas usadas en biotecnología

La biotecnología, y en particular la llamada "nueva biotecnología", se ha convertido en las últimas décadas en el centro de la investigación científica. La mayor parte de los presupuestos gubernamentales dedicados a Investigación y Desarrollo está, hoy en día, dedicada a éste ámbito tecnocientífico.

La biotecnología puede ser clasificada en cinco amplias áreas.

- **Biología en Salud Humana** ( donde se incluye la **B. Alimentaria**)
- **Biología Animal.**
- **Biología Industrial.**
- **Biología Vegetal:** con las técnicas de la biotecnología moderna, es posible producir más rápidamente nuevas variedades de plantas con características mejoradas, mayor rendimiento, tolerancia a condiciones adversas, resistencia a herbicidas específicos, control de plagas, cultivo durante todo el año. Problemas de enfermedades y control de malezas ahora pueden ser tratados genéticamente en vez de con químicos. La ingeniería genética (proceso de transferir ADN de un organismo a otro) aporta grandes beneficios a la agricultura a través de la manipulación genética de microorganismos, plantas y animales. Una planta modificada por ingeniería genética, que contiene ADN de una fuente externa, es un organismo transgénico. Un ejemplo de planta transgénica es el tomate que permite mantenerse durante mas tiempo en los almacenes evitando que se reblandezcan antes de ser transportados.
- **Biología Ambiental:** la biotecnología ambiental se refiere a la aplicación de los procesos biológicos modernos para la protección y restauración de la calidad del ambiente. Actualmente, la principal aplicación es disminuir la polución. La biorremediación es un ejemplo y consiste en el uso de sistemas biológicos para la reducción de la polución del aire o de los sistemas acuáticos y terrestres.

Las técnicas biotecnológicas utilizadas en los diferentes campos de aplicación de la biotecnología se pueden agrupar en dos grandes grupos:

**Cultivo de tejidos:** Trabaja a un nivel superior a la célula e incluye células, tejidos y órganos que se desarrollan en condiciones controladas.

**Tecnología del ADN:** Involucra la manipulación de genes a nivel del ADN, aislamiento de genes, su recombinación y expresión en nuevas formas, etc.

Se llama Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) o "cultivo *in vitro*" al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas. Es decir, **el cultivo *in vitro* consiste en hacer crecer un material vegetal en condiciones axénicas en un medio nutritivo artificial contenido en un recipiente de plástico o de vidrio.**

El CTV es una herramienta para la resolución de problemas básicos y aplicados en bioquímica, genética y fisiología vegetal, y tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal.

El CTV se basa en tres principios básicos, de cuya comprensión y manipulación depende el éxito o fracaso de cualquier trabajo en este campo. Los principios básicos son los siguientes:

- Elección del explante: se llama explante al órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que va ser utilizado para iniciar el cultivo. Puede ser una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, de tallo, de cotiledón, etc.
- Elección del medio y condiciones de cultivo: conjuntamente con el tipo de explante determina la respuesta que se obtendrá del mismo.
- Condiciones asépticas: para que el cultivo de cualquier tejido vegetal prospere de la manera deseada, sin organismos contaminantes.

### Aspectos históricos:

En 1838, Schleiden y Schwann fueron los primeros en postular que cada célula viva de un organismo multicelular podría tener la capacidad de dividirse y desarrollar un nuevo individuo, si se le proporcionan los sustratos y las condiciones apropiadas. El fisiólogo austriaco Haberlandt, a comienzos del siglo XX, enunció que **es posible regenerar una planta entera a partir de cualquier célula de su cuerpo (totipotencia)**. En otras palabras la **totipotencialidad celular** significa que cada célula posee la capacidad de regenerar una planta completa dado que posee toda la información genética para ello.

El primero en cultivar tejidos vegetales con éxito fue White en 1934, quien logró cultivar ápices de raíces de tomate en medios enriquecidos con sales, azúcares y levadura. En 1939, trabajando en laboratorios diferentes, Nobecourt y Gautheret en Francia y White en Estados Unidos, lograron el crecimiento de tejidos de raíz y observaron la formación de callos en medio semisólido (geles). Los callos transferidos a medio fresco, proliferaron indefinidamente.

Un hecho importante que permitió el desarrollo del cultivo de tejidos, fue la identificación de la hormona cinetina, lo cual permitió a Skoog y Miller en 1957 postular la hipótesis de que la iniciación de raíces y brotes en cultivos de callos, puede estar regulada por la relación auxina-citocinina en el medio de cultivo. Otros aspectos históricos de importancia son el desarrollo *in vitro* de ápices caulinares, cultivos de ovarios aislados, aislamiento y fusión de protoplastos.

En la década del 70 la Revolución Verde introduce semillas híbridas en los países del tercer mundo. En la década del 80 los científicos descubren cómo transferir fragmentos de información genética de un organismo a otro, permitiendo la expresión de caracteres deseables en el organismo receptor. La primera aplicación comercial de esta tecnología es, en 1982, la producción de insulina humana para el tratamiento de la diabetes y en 1983 la primera planta mejorada genéticamente: una planta de tabaco con resistencia a un antibiótico.

### Usos más frecuentes del cultivo de tejidos y perspectivas futuras:

1 – El uso más frecuente de la técnica es el de la rápida multiplicación de individuos vegetales. Esto se debe, entre otros factores, a la posibilidad de obtener un elevado número de explantes a partir de una planta donante y a la velocidad de multiplicación debida al control tanto del medio, como de las condiciones ambientales en las cuales se lleva a cabo la multiplicación.

2 – Un uso bastante extendido de la técnica es la obtención de plantas libres de virus, fundamentalmente cuando se usa el meristema como explante.

3 – En la mejora vegetal el cultivo de tejidos juega un papel determinante, ya que a través del cultivo *in vitro* es posible la obtención de individuos haploides, cuya duplicación posterior de su número cromosómico dará origen a diploides, triploides, etc., homocigóticos. El intercambio y almacenamiento de germoplasma es otra utilización frecuente de la técnica. La ingeniería genética (para obtención de plantas transgénicas) y la fusión de protoplastos, son también una gran ayuda para la mejora de las plantas, al igual que la selección por resistencia a un agente determinado.

4 – Producción de metabolitos secundarios. Las plantas aportan cierto tipo de compuestos, que si bien tienen una aplicación restringida resultan indispensables para un sinnúmero de procesos importantes para el bienestar humano. Algunos ejemplos de metabolitos secundarios son: el taxol (agente anticancerígeno), el mentol (saborizante, fragancia), las piretrinas (insecticidas), la quinina (fármaco antimalárico), la codeína (sedante).

5 – La recuperación de la producción debida a aspectos sanitarios y/o a la obtención de nuevas variedades en cultivo de tejidos es también uno de los frecuentes usos de la técnica.

## **FACTORES QUE AFECTAN EL EXITO EN EL CULTIVO DE TEJIDOS**

Son muchos los factores que afectan la capacidad de supervivencia de los explantes, su establecimiento, su capacidad para reproducirse y regenerarse.

**1- ASEPSIA:** es el mantenimiento de las condiciones estériles durante el cultivo de tejidos vegetales. Las condiciones físicas y químicas en que normalmente se encuentran los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias y hongos), los cuales pueden destruir los cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo.

Para establecer cultivos asépticos es necesario:

1. esterilizar los medios de cultivo
2. desinfectar superficialmente los explantes, para eliminar bacterias y hongos exógenos
3. realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia

La asepsia se refiere tanto al material vegetal, a los medios, recipientes, cuartos de cultivo, lugares de transferencia, como a los operarios y herramientas con las cuales se lleva a cabo la manipulación de los mismos.

Con respecto a la asepsia del material vegetal son muchos los productos utilizados, los más comunes son el hipoclorito de Sodio ( $\text{NaClO}$ ) y el hipoclorito de Calcio. Sin embargo en algunos cultivos este último hipoclorito ha llegado a causar toxicidad; algunos alcoholes etílicos e isopropílicos son también utilizados como desinfectante y generalmente el tiempo de exposición a los alcoholes es menor que el tiempo de exposición a los hipocloritos. Otros productos utilizados frecuentemente son el agua oxigenada, nitrato de Plata, cloruro de Mercurio, fungicidas, antibióticos y algunos desinfectantes a base de Iodo.

Después de expuestos los distintos materiales a la acción de los desinfectantes superficiales, se llevan a cabo varios enjuagues con agua estéril, con el fin de remover tales productos de las superficies y evitar toxicidad.

Durante la desinfección es común adicionar a los productos usados, algún humectante o tensioactivo (Tween 20) que permita una mayor penetración al disminuir la tensión superficial.

La esterilización de los medios de cultivo, como de herramientas se realiza en autoclave con presiones de 1.0 a 1.2  $\text{Kg/cm}^2$  a temperatura de 120 °C y durante 20 a 40 minutos (ver figura 1).

Algunos medios pueden incluir sustancias inestables a altas temperaturas (antibióticos, hormonas, algunas vitaminas, etc.), que por tal razón no deben ser sometidas al proceso de autoclavado. En este caso se aconseja el agregado de los productos termolábiles por medio de filtración. En lo relacionado con áreas de transferencia debe tenerse el mayor cuidado posible para lograr la asepsia. En la actualidad, la mayoría de los laboratorios cuenta con cámara de flujo laminar de aire estéril (ver figura 2).

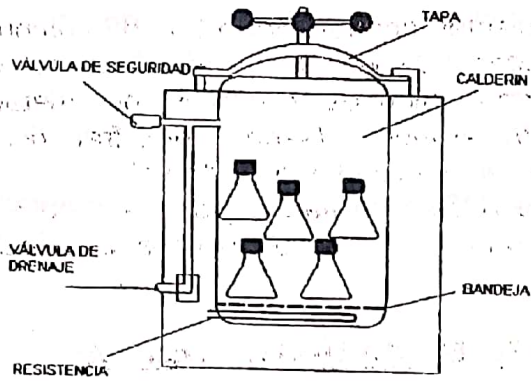


Figura 1. Esquema de un autoclave

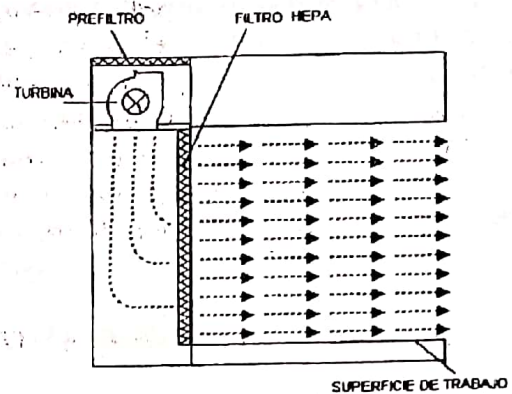


Figura 2. Esquema de una cámara de flujo

**2 - GENOTIPO:** algunas especies o géneros parecen ser más aptas para el cultivo *in vitro*; existen diferencias en la regeneración de plantas que son dependientes del genotipo. En el caso de algunas umbelíferas como la zanahoria, se ha encontrado que son plantas de rápida regeneración. Sin embargo pueden presentarse diferencias dentro de los géneros, las especies y aún dentro de las variedades, diferencias que han sido atribuidas al genotipo.

**3 - EFECTOS DE POSICIÓN Y COMPETENCIA:** aunque todas las células de un organismo contienen el mismo genoma, existen grandes diferencias entre célula y célula y entre distintos tipos de órganos en cuanto a la capacidad de regeneración en cultivo de tejidos. Se considera en general que los tejidos embriogénicos, meristemáticos y reproductivos tienen mayor propensión para el crecimiento y morfogénesis en cultivo de tejidos.

**4 - EL EXPLANTE:** se define como cualquier parte del vegetal que separado de la planta madre sirve para iniciar un cultivo de tejidos. Debe tenerse en cuenta el tamaño, la fuente y la edad fisiológica del explante. En cuanto al tamaño se ha postulado como regla general que en la medida en que el explante es más pequeño, menor es su capacidad de supervivencia, lo cual es lógico, si se tiene en cuenta que un menor número de células es las que deben asumir el crecimiento y que el estrés de separación es mayor.

Sin embargo, en general el tamaño del explante no es motivo de grandes problemas, excepción hecha del cultivo de meristemas propiamente dicho, realizado con fines de obtener plantas libres de virus. En estos casos puede presentarse un dilema: a medida que se aumenta el tamaño del explante se disminuye la posibilidad de lograr el objetivo de obtención de plantas libres de virus y a medida que se disminuye el tamaño, es menor la posibilidad de establecer el cultivo y alcanzar la morfogénesis.

En cuanto a la fuente del explante, o sea la planta donante del material vegetal, debe tenerse en cuenta que no todas las células de los tejidos pueden dividirse. Las células con menor diferenciación pueden retener un cierto grado de capacidad organogénica. Sin embargo, en algunos casos las células y tejidos altamente diferenciados pueden desdiferenciarse.

Las condiciones en las cuales crecen las plantas donantes también juegan un papel decisivo en el éxito del cultivo, por lo cual se aconseja que a dichas plantas se las mantenga en óptimas condiciones sanitarias. La edad tanto de la planta donante como del explante mismo es un factor de consideración. Los tejidos más jóvenes y menos diferenciados son en general los de mayor éxito en cultivo de tejidos.

En algunos tejidos arbóreos los callos pueden iniciarse solamente a partir de tejidos juveniles.

**5 – MEDIO DE CULTIVO:** el medio de cultivo para células, tejidos u órganos es el sustrato que aporta las sustancias esenciales para el crecimiento y controlan, en gran parte el patrón de desarrollo *in vitro*.

Estos medios contienen macronutrientes, micronutrientes, suplementos orgánicos (vitaminas, carbohidratos) y reguladores de crecimiento, como por ejemplo el medio de Knop, Gautheret, De Fossard, White, Gamborg (B5) y Murashige-Skoog (MS), entre otras. Los tres últimos son los más utilizados en la actualidad.

**Los Medios Nutritivos:** son formulaciones de composición conocida y controlada, de modo de lograr resultados reproducibles en cualquier época y lugar. Para su preparación se usarán drogas libres de impurezas (drogas proanálisis).

- a) Agua: debe ser destilada y desionizada, o bidestilada.
- b) Macronutrientes: C, H, N, O, S, Mg, Ca, K, P. Son incluidos en los medios de cultivo en forma de sales inorgánicas, pudiendo el nitrógeno y el azufre ser incorporados como suplemento orgánico (P.ej. caseína hidrolizada, urea, aminoácidos).
- c) Micronutrientes: Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B. Los micronutrientes del medio de Murashige-Skoog incluyen todos aquellos elementos minerales aceptados como esenciales para plantas superiores, con el agregado de Co y I.
- d) Carbohidratos: proporcionan la energía metabólica y los esqueletos carbonados necesarios para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, polisacáridos estructurales como celulosa, etc. La sacarosa es el carbohidrato más utilizado en la preparación de medios de cultivo.
- e) Vitaminas: cumplen funciones de cofactores de reacciones enzimáticas (tiaminafosfato, piridoxina), en otros se comportan como sustrato de reacciones metabólicas (ácido nicotínico). La composición vitamínica, en el caso de medio MS, está constituida por tiamina (Vitamina B1), ácido nicotínico (niacina) y piridoxina (vitamina B6), a la que normalmente se le adiciona el aminoácido glicina. Otros compuestos utilizados son: ácido ascórbico (antioxidante), ácido fólico, riboflavina y biotina.
- f) Mio-inositol: es una hexosa cíclica hidroxilada, que se incorpora al medio MS y a la mayoría de los medios de cultivo usados en la actualidad. Su presencia es necesaria en todas las células para lograr la ciclación de la glucosa. Debido a que la biosíntesis no siempre se verifica *in vitro*, se hace imprescindible su incorporación a los medios. Posee efecto estimulador para el crecimiento de callos y en la organogénesis directa de algunas especies.
- g) Hormonas Vegetales y Reguladores de Crecimiento: actúan en muy baja concentración ( $10^{-6}$ M- $10^{-8}$  M) y desencadenan diversas respuestas fisiológicas. Existen sustancias sintéticas, con similares características, a las que se denomina reguladores de crecimiento. Las hormonas vegetales se agrupan en base a su acción fisiológica: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico.  
De la misma forma que en la naturaleza, en donde cada hormona interactúa con otras hormonas para producir una respuesta en la planta, los reguladores vegetales de crecimiento (RC) son utilizados, en cultivo *in vitro*, en concentraciones del orden de partes por millón (ppm) y la elección del tipo de RC y la cantidad relativa de cada uno de ellos en el medio de cultivo está determinada por la respuesta esperada.
- h) Agentes gelificantes: los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos. En el primer caso normalmente exige algún soporte o agitación para asegurar la oxigenación del explante. Se usan puentes de papel de filtro o de fibras de celulosa, o se colocan los medios en agitadores orbitales (shaker) o en recipientes con flujo y reflujo del medio de cultivo. En los medios sólidos o semisólidos se utilizan diferentes agentes gelificantes, uno de ellos es el agar, un polisacárido extraído de algas marinas.
- i) El pH: es necesario ajustar el pH de la solución con el fin de lograr una correcta gelificación del medio y solubilidad de las sales minerales. En general el pH debe estar

entre 5,8 y 6,2 y es ajustado con ClH o NaOH, luego de agregar todos los ingredientes excluido el agente gelificante.

**6 – LUZ:** la calidad y la intensidad de la luz y la duración del período luminoso deben ser tenidos en cuenta cuando se realiza el cultivo de tejidos. Cuando se adiciona azúcar al medio, se trata de suministrar al explante una fuente de carbono, ya que inicialmente tales explantes no tienen la capacidad de realizar fotosíntesis, inclusive en el caso de callos, éstos pueden presentar un mejor crecimiento cuando se los coloca en completa oscuridad. En varios cultivos, la ausencia de luz trajo como consecuencia la disminución o supresión total de la formación de brotes.

La alternancia de luz y oscuridad (fotoperíodo) debe ser estudiada en cada caso, a pesar de que en cultivo de tejidos, puede presentarse un requisito fotoperiódico similar al de las plantas crecidas *extra vitro*. Se ha demostrado en algunas plantas que la longitud del día influye en los niveles endógenos de auxinas y citocininas. En cuanto a la longitud de onda, debe recordarse que muchos eventos morfogénicos son controlados por el fitocromo. Este pigmento podría controlar las respuestas ya sea por activación o represión diferencial de genes, o por ambas causas. En cuanto a la intensidad de la luz, también depende del tipo de cultivo y del estado del mismo. Un aumento en la intensidad lumínica puede incrementar la formación de brotes, la producción de biomasa o la diferenciación.

**7 – TEMPERATURA Y HUMEDAD:** las temperaturas requeridas varían con el material utilizado. Se afirma que en los tejidos de plantas tropicales puede esperarse mejor crecimiento a temperaturas mayores que las apropiadas para el cultivo de tejidos de plantas de zonas templadas.

En general en cultivo de tejidos se utilizan temperaturas que oscilan entre 24 °C y 28 °C. Se consiguen además respuestas diferentes alternando las temperaturas diurnas y nocturnas. La humedad relativa de los cuartos de cultivo debe ser permanentemente controlada, aproximadamente un 70% es lo normal.

**8 – POLARIDAD:** se refiere a la dirección preferencial en los procesos de distribución y movimiento de sustancias dentro de la planta, órgano o tejido y además a la dirección preferencial en la diferenciación. La polaridad puede ser causada por factores químicos, incluyendo el movimiento polar de sustancias como las auxinas, los gradientes de sustancias en las plantas o a diferencias anatómicas entre los distintos explantes. Se ha postulado que aunque la polaridad en algunos casos es reversible, en general, es mayor en tejidos de tallo que en tejidos de hojas y raíces.

**9 – SUBCULTIVO:** a pesar de que se supone que tanto en los cultivos de callos como en las suspensiones celulares existe una capacidad de proliferación celular indefinida, a medida que transcurren los subcultivos, se presentan dos fenómenos importantes: la pérdida de potencial morfogenético y la variabilidad genética.

La pérdida de potencial morfogenético es variable dependiendo de las especies. Se ha atribuido el fenómeno a la acumulación de anomalías cromosómicas durante los distintos cultivos, debido a que se han observado evidencias de aberraciones cromosómicas que incluyen cambios en el número (aneuploides y poliploides) o en el arreglo de cromosomas (deleciones, translocaciones, etc.)

En cuanto a la variabilidad genética observada, es más pronunciada en cultivo de callos y en plantas formadas a partir de ellos. La variación puede resultar de segregaciones, mutaciones, cambios en el número y estructura de los cromosomas, reversión a estados juveniles, segregación de genomas extranucleares. Esta variabilidad genética, llamada variación somaclonal, puede constituir un problema cuando se trata de clonación de plantas, pero puede ser aprovechada en la selección de células, callos o individuos tolerantes a ciertos

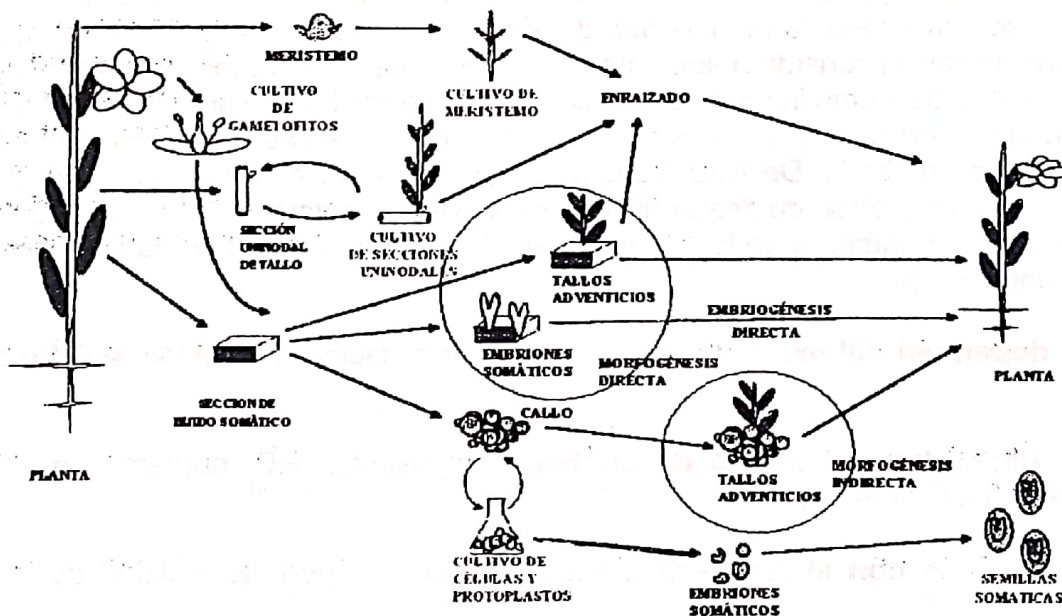


factores químicos, edáficos, ambientales, etc. En éste último caso la variación somaclonal no sólo es deseable sino que incluso puede ser acelerada mediante la utilización de mutágenos, que pueden ser físicos (radiaciones UV, X) o químicos (etilmetanosulfonato). Mediante este tipo de variación, combinada con esquemas adecuados de selección, ha sido posible obtener líneas con mayor resistencia a herbicidas, a sales, a sequía, a temperaturas extremas, a patógenos, entre otros.

## MORFOGENESIS

Una de las mayores ventajas que ofrece el cultivo de tejidos es la posibilidad de regenerar plantas completas a partir de pequeños fragmentos de tejido vegetal. Esto puede realizarse por distintas vías como la brotación y proliferación de yemas, la organogénesis y la embriogénesis somática.

En el primer caso se parte de meristemas ya formados para la obtención de una o varias plantas completas, mientras que en la organogénesis y la embriogénesis somática se parte de tejidos no meristemáticos y se requiere de un proceso de dediferenciación y rediferenciación. El término **morfogénesis** se refiere a la iniciación y el desarrollo de órganos (morfogénesis) y de embriones (embriogénesis somática) cultivados *in vitro*. Es sinónimo de diferenciación, y estudia los factores que intervienen y controlan el desarrollo organizado. La **embriogénesis somática** es el proceso mediante el cual se logra el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión gamética. La **organogénesis** incluye tanto rizogénesis como caulogénesis (formación de raíces y tallos respectivamente) a partir del explante. Si la organogénesis se produce después de la formación de callo, se denomina **organogénesis indirecta**, mientras que si se produce directamente del explante sin que este pase por una fase de callo, entonces se habla de **organogénesis directa**. El fenómeno de la organogénesis *in vitro* es posible debido a la **totipotencialidad** celular (ver figura 3).



**Figura 3.** Técnicas usadas para regenerar la planta entera

**Callo, inducción, mantenimiento y usos:** se denomina callo a una masa indiferenciada de células de rápida proliferación. En condiciones naturales aparece como mecanismo de cicatrización de heridas o bien en tumores inducidos por organismos fitopatógenos como el

En el caso de la "agalla de la corona" producida por *Agrobacterium tumefaciens*. Este tipo de tejidos puede obtenerse y mantenerse *in vitro* cuando se manejan apropiadamente los reguladores de crecimiento. El callo está compuesto por células similares a las del parénquima: una de las propiedades más importantes del tejido calloso es la friabilidad, que puede ser definida como la tendencia de las células a separarse unas de otras, por lo que un tejido friable es aquel que se disgrega fácilmente. Los cultivos de células en suspensión son favorecidos por las auxinas mientras que a altas concentraciones de citocininas se obtiene un tejido más duro. Para la obtención de callo se requiere un medio rico como el MS, generalmente sólido y con una alta proporción de auxinas (2,4-D; AIA; ANA). Por la alta tasa de proliferación se necesitan muchos subcultivos para mantenerlo en estado adecuado, si no se realizan en los plazos requeridos se produce el agotamiento de los nutrientes y la desecación del medio, así como la acumulación de desechos metabólicos tóxicos que pueden causar la necrosis del tejido.

El tejido calloso tiene varias aplicaciones, resultando un modelo apropiado para estudios de metabolismo celular, producción de compuestos secundarios y fitotoxicología. Es muy útil para el estudio de respuesta a diferentes tipos de estrés como déficit hídrico, salinidad, temperaturas extremas, etc. También puede ser un paso intermedio para la regeneración de plantas por las vías de organogénesis y/o embriogénesis somática indirecta.

**Factores que afectan el proceso de organogénesis:** entre los factores que contribuyen a la formación de órganos adventicios, se destacan los **reguladores de crecimiento (RC)**, en particular las auxinas y citocininas, ya que son en gran medida los que regulan los procesos de crecimiento y desarrollo en el cultivo de tejidos vegetales. Las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callos. Las más utilizadas son: AIA, AIB, ANA y 2,4-D. Las citocininas se incorporan al medio para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. La más usada es BAP y cinetina. Comparado con las anteriores, las giberelinas se utilizan raramente. Su función es el alargamiento de las regiones subapicales. El  $AG_3$  es el de mayor uso. El ácido absísico, en la mayoría de los casos, produce un efecto inhibitorio en los cultivos *in vitro*, pero en determinados casos promueve la maduración de embriones. Por otro lado los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como la finalidad del cultivo. Una relación alta de auxinas/citocininas favorece la formación de raíces, y su inversa la formación de yemas. La relación intermedia favorece la formación de callo. De esta manera, el balance entre auxinas y citocininas suele ser determinante para el patrón de desarrollo que siga el tejido. Además de los reguladores de crecimiento, hay un gran número de factores que afectan el proceso de la organogénesis y se mencionan a continuación.

**Factores que dependen del explanto:** genotipo, topótesis, ciclótesis, tamaño, edad o época del año.

**Factores que dependen del medio de cultivo:** composición (RC, nutrientes minerales, orgánicos, agente gelificante, etc.).

**Factores relacionados con el ambiente de incubación:** fotoperíodo, calidad de la luz y temperatura.

**Desdiferenciación y Rediferenciación:** la primera desdiferenciación del explante original comienza inmediatamente después del aislamiento del tejido y se manifiesta con un incremento en el crecimiento y la consecuente proliferación de una masa indiferenciada de células. En este proceso las células revierten a su estado embrional o meristemático. La mayoría de estas células tienen aspecto parénquimático, poseen núcleo y citoplasma inconspicuo y son altamente vacuoladas. También pueden encontrarse elementos lignificados

dispersos. La segunda fase consiste en la rediferenciación de diferentes tipos celulares. A los pocos días de iniciado el cultivo, ocurren intensas divisiones celulares localizadas en regiones distribuidas de manera azarosa en el tejido. Tales regiones de actividad mitótica llevan a la formación de nódulos, centros de crecimiento o **meristemoides**, con escasa vascularización por traqueidas aisladas en el centro. Inicialmente estos aparecen apolares, pero rápidamente muestran direccionalidad para formar primordios ya sean yemas o raíces. Los primordios de órganos están formados por una o varias células diferenciadas pequeñas similares a meristemáticas con citoplasma denso y un gran núcleo. Frecuentemente aparecen yemas y raíces en cultivos separados, pero puede ocurrir la formación de ambos en el mismo tejido. Como se mencionó anteriormente, la regeneración en la mayoría de las plantas vía el cultivo de tejidos puede ocurrir a través de organogénesis o embriogénesis. Una yema y un embrión son distinguibles por las diferencias morfológicas entre ambos. La yema es una estructura **monopolar**, desarrolla una conexión con el tejido vascular preexistente disperso en el callo o el explanto cultivado. Un embrión es una estructura **bipolar** y no posee conexión vascular con el tejido del callo o explanto.

### **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. Este no es un proceso que sucede únicamente en cultivos *in vitro*, de hecho es relativamente común en algunas familias de plantas y se conoce como *apomixis*.

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. 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.

#### **ETAPAS DE LA EMBRIOGENESIS SOMATICA:**

- **INDUCCION.**

Es el proceso de conversión de una célula somática en una célula proembriogénica.

Los factores determinantes para que suceda el proceso de inducción son: genotipo, grado de diferenciación de las células del explanto, auxinas (2,4-D y 2,4,5-T) y aislamiento celular (las células deben separarse entre sí para dar una respuesta).

- **HISTODIFERENCIACION**

En esta etapa las masas proembriogénicas se diferencian formando embriones somáticos, mediante una división y diferenciación simultáneas. Para que estas células cesen su multiplicación y pasen a la etapa de diferenciación se requiere la eliminación de las auxinas exógenas. Inicialmente se establece una polaridad en las células proembriogénicas, que se mantiene durante todo el desarrollo del embrión. Durante esta etapa los embriones somáticos

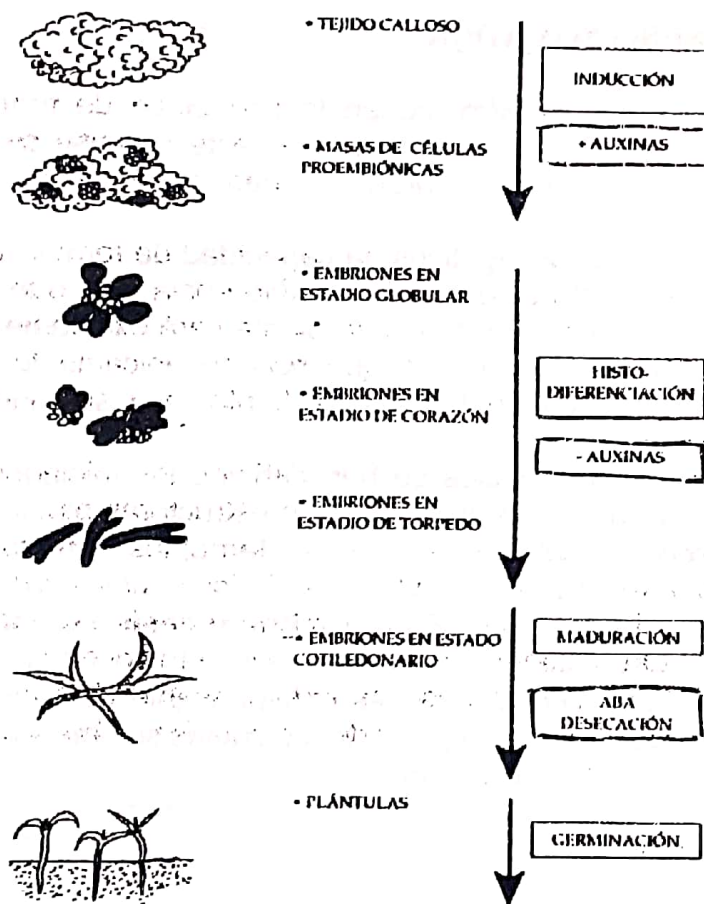
pasan por una serie de estadios intermedios similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica. Estos estadios son: *globular, de corazón y de torpedo*.

- **MADURACION**

Un embrión somático en estadio de torpedo aún no posee la capacidad de dar una nueva planta. Para que adquiera esta capacidad se requiere una fase de maduración donde ocurre la elongación celular pero ya sin división. Se sabe que para muchas especies los estímulos que hacen posible la maduración son el ácido abscísico y la desecación. En las dicotiledóneas al embrión somático maduro se le da el nombre de *estadio cotiledonario*.

- **GERMINACION**

Es el proceso de elongación y reactivación metabólica de un embrión somático maduro para convertirse en una plántula. Para que esto suceda se requieren de estímulos como la luz, el ácido giberélico o citocininas. Los embriones somáticos carecen de tejidos de reserva, por ello su germinación sólo ocurre *in vitro* donde el medio de cultivo aporta los nutrientes, o bien cuando se les proporciona depósitos artificiales de nutrientes como sucede en las semillas artificiales (ver figura 4).



**Figura 4.** Etapas de la embriogénesis somática

## APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

### 1- MICROPROPAGACION

Las plantas pueden ser propagadas de dos formas: vegetativamente o en forma asexual y sexualmente, por semillas. En la forma asexual, las características únicas de una planta son perpetuadas, pues, durante la mitosis, los genes son copiados de manera exacta. El grupo de plantas producido de esta forma se denomina clón (conjunto de individuos que provienen de un antecesor común). La **micropropagación** se refiere a la propagación clonal *in vitro* de plantas, a partir de un pequeño trozo de material vegetal como meristemas, brotes axilares, embriones somáticos o yemas adventicias. Ésta, es una de las aplicaciones más utilizadas de entre todas las técnicas que componen la llamada **biotecnología** vegetal.

#### Etapas de la micropropagación

Todo proceso de micropropagación requiere el cumplimiento de una serie de etapas, que van desde el establecimiento del explante en un medio de cultivo adecuado hasta la rusticación de las plantas obtenidas, para que puedan prosperar en un ambiente externo, sea este invernáculo o campo. Esas etapas son:

##### **Etapas 0: " Selección de las plantas madre"**

Se trata de una etapa preparativa, en la cual se seleccionan y acondicionan las plantas madres que serán utilizadas para iniciar los cultivos *in vitro*. Se debe tener en cuenta la edad y el estado nutricional y sanitario de la planta madre.

##### **Etapas 1. Establecimiento de los cultivos axénicos**

Consiste básicamente en la elección del explante y la esterilización del mismo para iniciar un cultivo axénico. La micropropagación de cualquier planta puede iniciarse a partir de diferentes órganos o tejidos, siendo de gran importancia su tamaño, tipo y época de recolección.

Ejemplos de especies micropropagadas por medio de ápices caulinares hay muchos, entre ellos: maní, café, clavel, tomate, manzano, pera, mandioca, papa, entre otras.

Se puede emplear también, la yema apical de estolones y rizomas como ocurre en frutilla y helechos. En begonias y violeta africana, se usan trozos de hojas inmaduras o pecíolos.

En el caso de plantas con órganos subterráneos engrosados (bulbos, cormos), como es el caso de tulipanes, lirios, jacintos, narcisos, cebolla, se emplean las escamas engrosadas inmaduras.

Muchas especies leñosas, especialmente las forestales, son micropropagadas empleando segmentos nodales, como por ejemplo el Eucalyptus, álamo, Pseudotsuga, pistacho, etc.

##### **Etapas 2. Multiplicación del tejido**

Etapas donde se realiza verdaderamente la micropropagación, obteniéndose un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de tejido.

Existen diferentes vías de micropropagación. Éstas incluyen:

1. Propagación a partir de yemas axilares o brotes
2. Formación de brotes adventicios o embriones somáticos

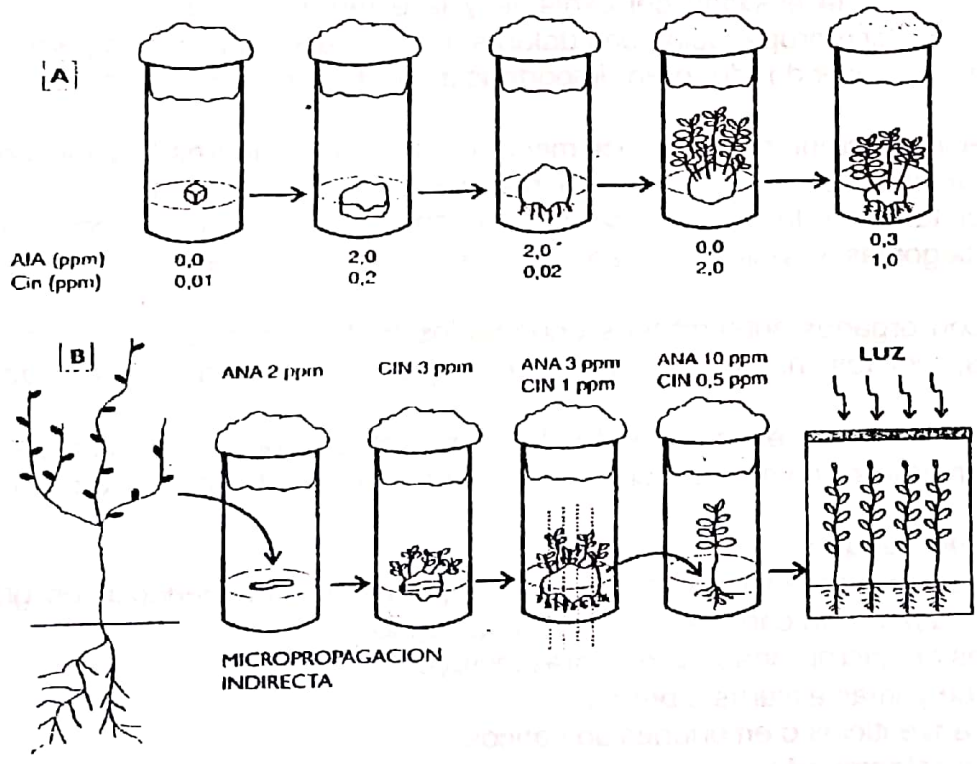
##### **Etapas 3. Elongación y enraizamiento**

Por lo general, lo que se obtiene en la Etapa 2 son pequeños brotes, en la mayoría de los casos carentes de raíz y con poca probabilidad de adaptarse con éxito a las condiciones ambientales externas. En la Etapa 3 lo que se pretende es que los brotes formen su sistema radical al mismo tiempo que se elonguen para facilitar su manipulación y hacer más probable su adaptación a las condiciones ambientales externas. El enraizamiento se puede lograr separando los brotes y transfiriéndolos a un medio de cultivo apropiado. La formación de raíces se favorece en medios diluidos conteniendo auxinas o carbón activado. El éxito del

transplante y supervivencia de las plantas generadas *in vitro* depende en mayor medida de la calidad de sus raíces.

### Etapa 4. Adaptación al medio externo

En los últimos años las técnicas de cultivo de tejidos han sobrepasado la fase de investigación, dando como resultado la producción masiva de muchas especies a escala comercial. El éxito del cultivo de tejidos vegetales en la propagación **masiva** de plantas depende de la capacidad para manejar en el invernadero estas plantas, con un alto grado de supervivencia y a bajo costo. Durante la aclimatación los factores más importantes a considerar son: humedad, temperatura, luz, sustrato, disponibilidad de agua y nutrientes minerales. El cambio tan drástico puede ocasionar una gran mortandad si no se toman ciertas precauciones. En primer lugar, sería conveniente que durante los días finales de la Etapa III, los frascos recibieran una carga luminosa mayor que fuera preparando a las plantitas para las nuevas condiciones ambientales. También, si fuese posible, convendría destapar los frascos, al menos el día anterior al transplante. Al retirar las plantas de los frascos debe tomarse la precaución de eliminar, por lavado, todo el agar que pueda quedar retenido entre las raíces. El tipo de sustrato que se puede emplear para el crecimiento ulterior puede ser de distintos tipos: suelo, perlita, vermiculita, arena de grano grueso, turba, corteza de pino, hojas secas de coníferas, etc., así como combinaciones de algunos de ellos. Es posible que en el riego inicial sea conveniente el agregado de algún fungicida. Una vez que las plantitas han sido transplantadas, se llevarán ha invernáculo. En estas condiciones es fundamental asegurar un ambiente con humedad relativa cercana al 100 % (riego por neblina) (ver figura 5).



**Figura 5. A)** Diferenciación de raíces o de yemas determinado por el balance de auxinas / citocininas

**B)** Micropropagación mediante caulogénesis y rizogénesis secuencial en callos

## 2- CULTIVO DE MERISTEMAS

Los meristemos apicales y axilares, al ser de manera natural los puntos de crecimiento en los vegetales tienen la capacidad de formar nuevos brotes. Esa capacidad natural la mantienen cuando se establecen y cultivan *in vitro*. Debido a ello, a partir de meristemas

apicales o axilares, cultivados en un medio adecuado es posible regenerar plantas completas más rápidamente que con tejidos de otras fuentes.

El cultivo de meristemas fue utilizado en un inicio, para la eliminación de hongos y bacterias en plantas, y poco después, para la producción de plantas libres de virus. En la actualidad se obtienen los mejores resultados al combinar la termoterapia con el aislamiento y el cultivo de meristemas y la subsecuente regeneración de plantas completas.

Las plantas producidas por esta técnica son muy estables genéticamente y revisten gran importancia en la producción clonal de cultivos de interés económico, la limitante del método es que el número de plantas obtenidas está en relación al número de yemas preexistentes.

En el cultivo de meristemas, éstos deben aislarse mediante disección con ayuda del microscopio. El explante aislado es muy pequeño, usualmente de menos de 1mm de diámetro, y consta del domo apical del meristemo con un pequeño número de primordios foliares. El principal uso de este tipo de cultivo es la producción de plantas libres de virus y de cualquier otro patógeno.

### **Ventajas del cultivo de meristemas:**

- ◆ Es un sistema ideal para la propagación clonal de individuos selectos, ya que ofrece la máxima estabilidad genética.
- ◆ El sistema es relativamente sencillo, y es muy similar en todas las especies, por lo que no requiere de demasiada experimentación para encontrar las condiciones adecuadas.
- ◆ El sistema de cultivo de meristemas, solo o combinado con termoterapia o quimioterapia nos permite la obtención rápida de plantas libres de patógenos, incluso de virus y viroides. Esto tiene una enorme importancia sobre todo en cultivos que se propagan vegetativamente, ya que es la única forma de obtener material sano.
- ◆ Es ideal para ser utilizado en la conservación *in vitro* de germoplasma, ya sea mediante crecimiento retardado o criopreservación (permite mantener gran cantidad de material, en un espacio reducido, con la calidad y sanidad deseables). Por otra parte, el cultivo de yemas o meristemas facilita el transporte de material vegetal sin el acarreo de problemas fitosanitarios.
- ◆ Se utiliza para trabajos de transformación genética basados en la inoculación de meristemas apicales con *Agrobacterium tumefaciens*, los cuales crecen y producen estructuras reproductivas.

### **Termoterapia:**

Consiste en la aplicación de altas temperaturas a las plantas completas o partes aisladas para la erradicación de virus. Algunos virus son más estables que otros, por lo que se necesitan períodos más largos para unos y más cortos para otros, ejemplos:

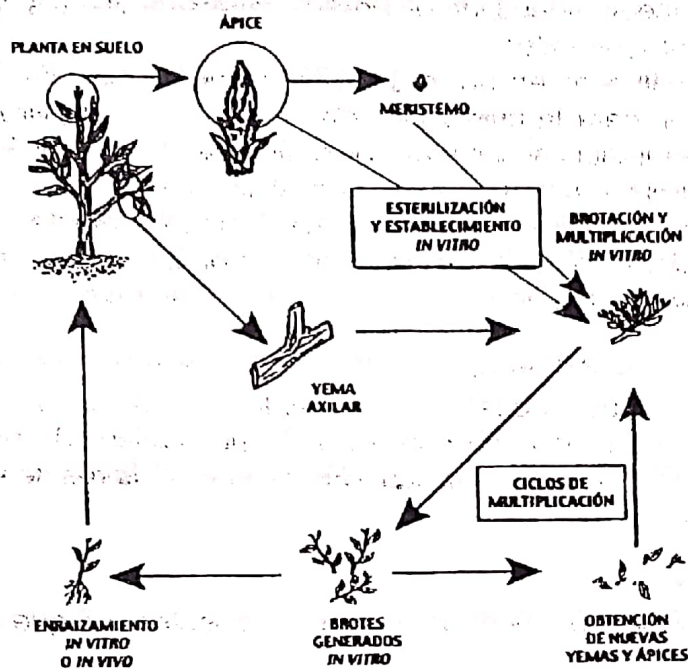
40°C, 7 días ————— erradicación de Aimv

40°C, 9 días ————— erradicación de Cmv

32°C, entre 16 y 168 días ————— otros virus detectados

### **Quimioterapia:**

Es la aplicación de productos químicos al medio de cultivo, lo que ocasiona una mayor probabilidad de obtener plantas libres de patógenos, por lo que al aplicarse diferentes productos quimioterapéuticos de manera exógena al medio, estamos asegurando la obtención de material sano. Algunos de los productos químicos utilizados son: verde de malaquita, 2.4D, auxinas y citocininas en altas concentraciones, Kibavirin, etc. (ver figura 6)



**Figura 6.** Sistema de propagación por cultivo de meristemas.

### 3- AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS

Esta es la técnica que ofrece las mayores posibilidades para la producción de nuevas entidades botánicas, ya que permite la fusión de protoplastos de distintas especies, no importa cual diferentes sean desde el punto de vista de la filogenia, para lograr la **HIBRIDACION SOMATICA**. El primer ejemplo de este tipo de hibridación fue la fusión de protoplastos de tomate y papa, realizada por Melchers y col. en 1978, que dió por resultado el "pomato". Desde entonces, se han descrito numerosas hibridaciones interespecíficas e intergenéricas, aún cuando no se conoce la existencia de ningún producto de fusión de interés económico en cultivo.

Se denomina protoplasto a una célula desprovista de pared celular, la cual ha sido eliminada por medios mecánicos o enzimáticos. Las hojas, preferentemente inmaduras, han demostrado ser el mejor material para obtener protoplastos. También se han obtenido protoplastos de raíces y de suspensiones celulares.

Después del tratamiento enzimático, los protoplastos son centrifugados (60-100 x durante 5-10 minutos) y lavados 2-3 veces con medio fresco sin enzimas. Una vez que se ha ajustado la concentración de protoplastos viables, estos pueden sembrarse en cajas de Petri que contienen medio semi-sólido, con agar y una capa superior de agarosa, las que son llevadas a condiciones de cultivo, generalmente con baja intensidad de luz. En esas condiciones a los 5-10 días se produce la regeneración de la pared celular y las primeras mitosis, dando origen a la formación de callos. Si se ha mantenido una buena separación entre los protoplastos sembrados, podrán lograrse callos cuyo origen ha sido unicelular.

Como se dijo antes, el aislamiento y cultivo de protoplastos constituye una herramienta muy eficiente para la hibridación somática, ya sea inter-específica como inter-genética. Protoplastos aislados de distintas especies pueden ser inducidos a fusionarse por medio de dos técnicas diferentes:

- medios químicos: por medios de compuestos tales como nitrato de sodio, dextran, alcohol polivinílico, polietilen-glicol (PEG), en presencia de alta concentración del catión Ca y elevado pH (8-10).
- electro-fusión: mediante el empleo de pulsos breves de corriente continua se busca la alteración de las cargas superficiales del plasmalemma, consiguiendo en esta forma la



fusión de protoplastos cuyas superficies limitantes se han despolarizado. Este es el método más empleado en estos momentos, se logran porcentajes de fusión cercanos al 100%.

#### **4- CULTIVO DE ANTERAS Y GRANOS DE POLEN**

El sueño de todo fitomejorador es la obtención de un nuevo cultivar mejorado en el menor número posible de generaciones. Es posible la obtención de plantas haploides, cuyo número  $n$  de cromosomas puede ser duplicado mediante tratamientos con colchicina, por el cultivo de células sexuales, ya sean las microsporas o los óvulos y la regeneración de plantas, en forma directa -sin formación de callos- o indirecta, con callo previo. Es más común el cultivo de anteras y granos de polen.

El número de especies en la que se produjeron plantas haploides es importante e incluye a plantas hortícolas (ají, tomate, berenjena, papa, nabo), frutícolas (manzano, vid, cerezo), cereales (trigo, centeno, cebada, maíz), forrajeras (ray grass, festuca), forestales (álamo) y en otras como algodón y poroto se llegó hasta la obtención de callo sin lograrse la regeneración de plantas.

#### **5- CULTIVO DE OVULOS Y FERTILIZACION "IN VITRO"**

Una alternativa al cultivo de polen para la obtención de plantas haploides es el cultivo de óvulos o sea del gametofito femenino. En esta forma se han obtenido plantas de tabaco, cebada, trigo, arroz. Las plantas se pueden originar directamente de la oósfera o de los núcleos antipodales o con previa formación de callo. El mejor estado del ovario para la regeneración de plantas haploides es durante las primeras etapas de la diferenciación del saco embrionario. Durante los trabajos de mejoramiento pueden existir casos de fracasos en la fertilización por distintos motivos (no germinación del polen, escaso crecimiento del tubo polínico, abscisión de las flores). En estos casos es posible realizar la fertilización *in vitro*, por cultivo de la placenta con los óvulos adheridos a ella o por cultivo de la flor todavía sin abrir y la colocación de polen sobre los estigmas.

#### **6- RESCATE DE EMBRIONES**

Existen situaciones de cruzamientos inter-específicos que aunque se produce la fertilización, poco después ocurre el aborto del embrión híbrido. Esto puede deberse a distintas causas, siendo la más común la incompatibilidad del embrión con el endosperma. También puede ser debido a la carencia de formación del endosperma, por falla de la provisión de nutrientes. En estos casos es posible rescatar al embrión inmaduro y cultivarlo *in vitro* hasta obtener una planta completa. Esta técnica permite, asimismo, la obtención de plantas en aquellos casos en que si bien existe un embrión normal, razones morfológicas o fisiológicas impiden la germinación de la semilla. Además la técnica puede emplearse con embriones normales si se quiere acortar el ciclo normal de la planta, pues no se necesita esperar la maduración completa de la semilla y su secado.

#### **7- SUSPENSIONES CELULARES Y PRODUCCION DE METABOLITOS**

El cultivo de células en medios líquidos con agitación da lugar a la formación de suspensiones celulares. El comportamiento es similar, en su crecimiento, a lo que ocurre en el callo. Es decir, que repiten la curva sigmoidea de crecimiento, con fases de crecimiento exponencial, lineal, desacelerada, senescente. Sin embargo, por medio de subcultivos repetidos en medios nutritivos frescos, es posible mantener el crecimiento de esas suspensiones durante un tiempo indefinido. Si el material así cultivado proviene de una especie que acumula un metabolito secundario importante para el hombre (alcaloides, glucósidos, esteroides, enzimas, compuestos aromáticos colorantes), es posible que dicho metabolito sea producido por las células de la suspensión, acumulado en ellas en las etapas finales de la curva de crecimiento o, aún mejor, excretado al medio de cultivo. Existen en la

bibliografía ejemplos de cultivo celulares con este objetivo, habiéndose diseñado biorreactores adecuados al cultivo de células vegetales. No existen dudas que si bien todavía el empleo de suspensiones celulares con el objeto de producir metabolitos no ha dado resultados espectaculares, el cúmulo de investigaciones que se traducen en trabajos publicados asegura que, en un futuro próximo, muchos productos vegetales podrán producirse en biorreactores, en la misma forma que ahora se elaboran los antibióticos.

## **8- CRIOPRESERVACION Y CONSERVACION DE GERMOPLASMA**

Literalmente criopreservación significa conservación o bajas temperaturas; en la práctica significa la conservación de suspensiones celulares, callos y meristemas en N líquido (-196 °C). Esta conservación a tan baja temperatura significa una detención total de las actividades metabólicas, con mantenimiento de la estabilidad del material genético. Al mismo tiempo significa un ahorro de espacio y de mano de obra, ya que no es necesario efectuar cambios de medios u otra labor que insuma espacio, tiempo y costos, reduciendo las pérdidas por contaminación, error humano o fallas de equipos. Distintas precauciones deben tomarse antes de proceder a colocar el material en N líquido. Debe evitarse la formación de hielo intracelular y, al mismo tiempo, durante la deshidratación las células deben estar protegida contra el exceso de concentración de solutos que se produce. Para ello se emplean sustancias crioprotectoras, como dimetil sulfoxido, sacarosa, glicerol, prolina o mezcla de soluciones de estos compuestos. Hasta ahora, se citan alrededor de 80 especies que han sido criopreservadas en esta forma, ya sea en la forma de callos, suspensiones, protoplastos, embriones o como meristemas. La recuperación de material viable es alta entre 60 y 75 % del material conservado. El empleo de esta tecnología permite la conservación de germoplasma en vías de extinción, así como también fácilmente el intercambio internacional de materiales vegetales.

## **9- TRANSFORMACION GENETICA DE PLANTAS**

El fitomejoramiento tradicional, que surge de los experimentos realizados por Mendel, se basa en la producción de cultivares mejorados mediante cruzamientos dirigidos entre individuos de la misma especie o de especies emparentadas. Los individuos sobresalientes (híbridos) se seleccionan, en ciclos subsecuentes de cultivo, hasta que después de numerosas tandas de cruzamientos y retrocruzamientos, se obtiene una generación portadora de las características deseadas. Los programas de fitomejoramiento actuales, apoyados en la ingeniería genética, se proponen, igual que el tradicional, aumentar el rendimiento, disminuir las pérdidas ocasionadas por plagas y enfermedades y reducir los costos de producción. Pero además, abrigan intereses más ambiciosos en el ámbito industrial, químico y farmacéutico. La bioingeniería se está aplicando en agricultura para obtener cultivares transgénicos que superen en calidad a los conseguidos por métodos convencionales. La ingeniería genética permite el acceso y manipulación directa de la información contenida en el ADN, rompe con las barreras impuestas por la incompatibilidad sexual y nos deja introducir en plantas genes provenientes no sólo de otras especies vegetales alejadas desde el punto de vista de la evolución, sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales. Además, este método asegura la especificidad de la característica incorporada y ahorra tiempo, ya que basta con un solo ciclo de cultivo. La alteración del genoma de un organismo por la introducción de uno o más genes foráneos se denomina transformación genética y el organismo modificado, transgénico o transformado. El objetivo es introducir directamente caracteres nuevos, codificados por tales genes, en variedades de cultivo ya existentes. Entre los objetivos se encuentran resistencia a virus, insectos, hongos y bacterias, tolerancia a herbicidas, a estreses abióticos, modificación de la calidad nutritiva, etc. La producción de plantas transgénicas requiere de una serie de herramientas y técnicas indispensables tanto para la manipulación del ADN y producción de moléculas quiméricas portadoras de genes de interés, como para su introducción en un explanto vegetal y regeneración de una planta completa que pueda transmitir a las siguientes

generaciones el gen incorporado, en ésta última etapa es donde juega un rol fundamental el cultivo de tejidos vegetales.

### **Métodos de transformación genética de plantas:**

- **Transformación vía *Agrobacterium tumefaciens*:**

*Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria fitopatógena gram negativa que habita en forma normal en el suelo e infecta principalmente a dicotiledóneas ocasionándoles la enfermedad conocida como "agalla de la corona". Esta bacteria tiene la capacidad de transferir un fragmento de DNA de su plásmido (pTi) al genoma de células vegetales en forma natural. Esta característica permite introducir en su plásmido el material genético responsable de caracteres de interés agronómico y lograr su integración y expresión en la descendencia.

- **Transformación por biolística:**

El bombardeo de micropartículas es el proceso en el cual ADN o ARN adherido sobre microproyectiles es acelerado por la fuerza de un gas comprimido, pólvora, u otros medios. Las moléculas aceleradas a alta velocidad son dirigidas hacia el blanco (explanto) y, debido a la aceleración, los microproyectiles atraviesan la barrera de la pared y membrana celular y liberan el ácido nucleico que portan en el interior.

La utilización de esta metodología es especialmente recomendada en especies donde no es posible la transformación mediada por *Agrobacterium* y en especies recalcitrantes.

- **Transferencia de genes mediada por polietilenglicol (peg)**

Este procedimiento es uno de los más comúnmente utilizado e involucra PEG para alterar la permeabilidad de la membrana en forma reversible y permitir la entrada del ADN foráneo. Ha sido aplicado en protoplastos aislados de diferentes tejidos de dicotiledóneas y en gran número de monocotiledóneas, donde la diferenciación involucra procesos irreversibles y no es posible la obtención de plantas a partir de protoplastos de tejidos diferenciados. Por ello, en este grupo, el aislamiento se realiza a partir de suspensiones celulares, callos y/o embriones.

Una vez obtenidas las células transformadas genéticamente, por cualquiera de los métodos ya explicados, se debe regenerar la planta entera mediante alguna de las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, organogénesis o embriogénesis somática. De esta forma se obtendrá una planta genéticamente modificada que luego debe propagarse vegetativamente para no perder esa característica obtenida.

### **Principales logros de la transformación genética de plantas:**

- **Tolerancia a herbicidas:**

- glifosato
- fosfinotricina
- bromoxinilo

**MECANISMOS DE SELECTIVIDAD DE LOS CULTIVOS TRANSGENICOS UTILIZADOS EN LA ACTUALIDAD** (ver guía de Aplicación de Reguladores de Crecimiento, herbicidas).

- **Resistencia a plagas**

- Frente a larvas de insectos (coleópteros, lepidópteros, dípteros): se incorpora el gen Bt, que codifica el insecticida natural de especies de *Bacillus*.

- Frente a hongos (e insectos), usando genes vegetales que codifican enzimas hidrolíticas como quitinasa, glucanasa, etc.
- Los genes de inhibidores de proteasas o de alfa-amilasas son muy interesantes, porque afectan al comportamiento alimentario y reproductivo de muchos insectos. Cuando se colocan bajo el control de promotores específicos de semillas permiten protegerlas durante su almacenamiento. No suponen una excesiva presión selectiva, por lo que es menos probable la selección de mutaciones de insectos resistentes.

### • **Cualidades del producto**

- Evitar que se estropee por procesos fisiológicos
- Los ya citados ejemplos de control de la maduración
- En patatas, evitar la aparición de manchas negras cuando se golpean.

Hasta ahora se recurre a añadir sulfitos, pero los consumidores cada vez piden menos aditivos. Por I.G. se ha logrado, con estrategias antisentido, bloquear el gen de la PPO, con lo que disminuye la producción de las melaninas que confieren el color oscuro tras los golpes.

### • **Modificaciones útiles para la industria de elaboración**

- Aumento del contenido en sólidos del tomate: disminuye los costes de fabricación de salsas y baja el precio de transporte.

Gen *ipt* bajo el control de un promotor específico de ovario: aumenta la síntesis de citocininas, con lo que el fruto joven aumenta su fuerza de sumidero, captando mayor proporción de fotosintato, lo que confiere mayores concentraciones de sólidos.

Recientemente se ha abierto la posibilidad de manipular los genes de las gluteninas, lo que permitirá lograr masas especiales en la elaboración del pan y derivados.

El gluten es un complejo de proteínas (gluteninas) de reserva para suministrar aminoácidos en la germinación del grano. Cuando se muelen los granos de trigo y luego se añade agua, se forma la masa, cuyas propiedades dependen del gluten: red proteica continua con notables propiedades: elasticidad combinada con extensibilidad. Luego se añade la levadura, que genera CO<sub>2</sub>, quedando las burbujas atrapadas en la masa, y luego inmovilizadas con el horneado (estructura porosa).

### • **Mejora de las propiedades nutritivas**

- Muchos granos y semillas usados en alimentación humana y animal son deficientes en alguno(s) de los 10 aminoácidos esenciales. El grano de maíz tiene bajo contenido en lisina, por lo que hay que suplementar la dieta del ganado con alguna leguminosa o con lisina cristalina de fermentación microbiana.

- Ya existen experimentos en los que se manipula una ruta metabólica para evitar la retroinhibición de la lisina sobre las enzimas clave, con lo que aumenta el contenido en este aminoácido en el grano.
- En Australia se ha logrado un trébol transgénico que posee alto contenido en aa azufrados, lo que hace que las ovejas que se alimentan de él den más y mejor lana.