

Capítulo 1

Aspectos Generales del Cultivo *in vitro*

Enzo Aguirre, Margarita Calle & Jean Pierre Baudoin

1.1. INTRODUCCIÓN

Como toda técnica científica, el cultivo *in vitro* de explantes vegetales es el resultado de innovaciones, observaciones y experimentaciones que han permitido acumular conocimientos cada vez más profundos, constituyéndose en una valiosa fuente de progreso (Seilleur, 1989).

Ovando (2004) define al cultivo de tejidos vegetales como una herramienta de la biotecnología vegetal que aísla partes de una planta y las hace crecer en un medio de cultivo artificial *in vitro* en condiciones de asepsia para obtener metabolitos, tejidos, órganos o plantas completas. El mismo autor menciona que el concepto *in vitro*, presente en casi todos los reportes de biotecnología de plantas, es una forma de indicar que las plantas o partes de plantas estudiadas fueron cultivadas dentro de un contenedor de vidrio (del latín *in*: adentro, *vitro*: vidrio), es decir, en un frasco de vidrio, en una placa Petri, en un matraz Erlenmeyer, etc. La utilización del término ayuda a entender que las plantas no fueron estudiadas en la naturaleza o en el campo, para lo cual se utiliza el término *in situ* (en el sitio).

Es así que los orígenes del cultivo de tejidos *in vitro*, se remontan a principios del siglo XX, cuando Haberlandt percibe el concepto de

sustancias de crecimiento al intentar cultivar células aisladas de plantas, postulando así el principio de la totipotencia vegetal, que se refiere a la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa bajo ciertas condiciones químicas y físicas a partir de cualquier parte aislada de la planta, misma que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas de cultivo *in vitro* actuales.

White en 1934 logra el crecimiento continuo de raíces de tomate en un medio rico en sales minerales y vitaminas del grupo B. Por otro lado, Gautheret en 1939 establece en cortes de zanahoria el primer cultivo a crecimiento continuo.

En la década del 50 estuvieron disponibles los conocimientos sobre los reguladores de crecimiento y los medios de cultivo que hicieron posible el rápido desarrollo de estas herramientas. Es así que Miller y sus colaboradores, en 1955, separan la kinetina cuya función en la inducción de las divisiones celulares ya era conocida.

Morel y Martin en 1952 inician el cultivo de meristemas, regenerando plantas libres de virus a partir de dalias virósicas.

Murashige y Skoog en los años 60 contribuyen a popularizar las técnicas del cultivo *in vitro* desarrollando métodos que han permiti-

tido la propagación de diversas especies vegetales.

Carlson en 1972 inicia la fusión de protoplasmas obteniendo el primer híbrido interespecífico en el género *Micofiana*.

Lepoivre y Quoirin, en 1977 difunden un método de cultivo para el cultivo de *Prunus*.

Boxus en los años 80 impulsa la propagación masiva de frutilla con resultados muy halagadores en condiciones de campo, aspecto que fundamenta aún más el aporte de la propagación masiva a la agricultura.

A partir de los avances alcanzados en la regeneración de plantas *in vitro* se ha desarrollado toda una industria de micro propagación que se inició en Europa y Estados Unidos, y que se encuentra ampliamente extendida en el resto del mundo, incluyendo países en desarrollo de América Latina, Asia y África (Pérez, Jiménez & Agramonte, 1998).

En la actualidad, el uso de técnicas como el sistema de inmersión temporal desarrollado en Francia y en Cuba y utilizado en diversos países, como en la UNALM en el Perú, ha permitido elevar las tasas de multiplicación de manera significativa, misma que se incrementa aún más si es suplementada con el uso de diferentes inhibidores de la síntesis de las giberelinas.

El cultivo *in vitro* es un método considerado rutinario en la propagación vegetativa, el cual permite la disponibilidad de un gran número de plantas en tiempos relativamente reducidos. Este proceso ha salido de la investigación y permite trabajar apoyando el progresivo desarrollo del productor. Por este método cualquier planta iniciada a partir de un tejido puede ser cultivada, si se ha desarrollado la fórmula correcta y los procesos para su cultivo (Kyte, 1987).

Algunos autores definen al cultivo de tejidos *in vitro* como una tecnología con facilidades de

producción y propagación de plantas útiles en la agricultura. Comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante o parte separada de un vegetal (por ejemplo: célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones controladas, debido a que éstas tienen células totipotenciales.

Ashmore (1997), indica que los cultivos *in vitro* ofrecen la oportunidad para la propagación, almacenamiento y distribución de germoplasma sano. En Bolivia, Cadima et al. (1996), establecen las pautas para iniciar en el país la conservación a mediano plazo de tubérculos andinos; posteriormente, Coca et al. (2004), Morales et al. (2004) y Vázquez et al. (2006) utilizan las técnicas *in vitro* para la recuperación de diferentes especies, incluyendo pasifloras y orquídeas, muchas de ellas endémicas de Bolivia.

En la actualidad, las técnicas de cultivo *in vitro* constituyen uno de los métodos biotecnológicos que han aportado al desarrollo de una nueva agricultura, basándose en la ya mencionada totipotencialidad celular, sean tejidos, ápices meristemáticos e incluso células aisladas, genéticamente idénticas a la planta madre en un período corto con el objetivo de multiplicar, mejorar y conservar a mediano y largo plazo diferentes especies como hortalizas, frutales, ornamentales y forestales de interés alimenticio, medicinal y/o económico para el ser humano.

Asimismo, su contribución como herramienta en la conservación de germoplasma es innegable, al permitir conservar a mediano o largo plazo, y en espacios reducidos y exentos de patógenos, un sinnúmero de entradas, precautelando de esta manera los recursos fitogenéticos, contribuyendo a la seguridad alimentaria de las poblaciones y favoreciendo la revalorización de especies nativas en riesgo de pérdida definitiva (Iriarte et al., 1998).

1.2. PRINCIPIOS BOTÁNICOS PARA EL CULTIVO *IN VITRO*

La multiplicación asexual o vegetativa ocurriéndose fue dando naturalmente o a través de la intervención humana, y se ha ido especializando en invernaderos y viveros. El procedimiento de propagación vegetativa en la mayoría de los casos es a partir de cortes de tallos, raíces y hojas (Kyte, 1987).

Los tallos, porción de las plantas vasculares con hojas y yemas, tienen el potencial para la regeneración de plantas. Hay tallos subterráneos, como el rizoma del lirio o los estolones de fresa; el tubérculo de la papa y de otros tubérculos andinos como la oca, papalisa e isaño o cormos¹¹ que sirven como estructuras en la reproducción vegetativa.

Las raíces son órganos de las plantas superiores, casi siempre subterráneas, que tienen funciones de absorber, conducir agua, minerales disueltos, acumular nutrientes y fijar la planta firmemente en la tierra. También ellas sirven como estructuras reproductoras vegetativas, por ejemplo en manzano y rosa.

Las hojas son los principales órganos fotosintéticos de la gran mayoría de plantas. Bajo determinadas condiciones, pueden producir nuevas plantas a partir de cortes de las hojas, por ejemplo en begonia, tuna o violeta africana. En algunos casos, crecen de las hojas nuevas plantas sin estar separadas de la planta materna.

La multiplicación *in vitro* de plantas no crea nuevos procesos de crecimiento, simplemente dirige y ayuda al potencial natural de la planta para regenerar y multiplicar de una manera muy eficaz y predecible, en contraste con la propagación vegetativa convencional que requiere más espacio y más tiempo en la producción de plantas. A continuación describimos algunos métodos de regeneración del cultivo *in vitro* y las aplicaciones de las mismas.

¹¹ Tallos modificados.

1.3. MÉTODOS DE REGENERACIÓN *IN VITRO*

Los métodos de regeneración *in vitro* son:

1.3.1. Cultivo de órganos

La organogénesis es un evento morfogénico que se caracteriza por el desarrollo en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente enraizados. Los brotes pueden formarse a partir del explante o callo (Pérez, Jiménez y Agramonte, 1998).

1.3.2. Explantes primarios

Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos (Roca & Mroginski, 1991). En estos fragmentos de tejidos o de órganos proliferan las células de acuerdo al medio de cultivo utilizado.

1.3.3. Cultivo celular

Supone previamente una disgregación celular, ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar en un medio de cultivo adecuado. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento. Este tipo de cultivo, aplicado al mejoramiento de plantas, permite superar incompatibilidades sexuales en la cruce p. e. entre *S. acaule* y *S. andigenum* al realizar fusiones protoplásmicas, obteniendo de esta manera híbridos interespecíficos.

1.4. VENTAJAS DEL CULTIVO *IN VITRO*

En comparación con los sistemas convencionales, la mayoría de los autores coinciden en que el cultivo *in vitro* presenta las siguientes ventajas:

- Posibilidad de producción masiva de plantas homogéneas en una superficie reducida a bajos costos y tiempos reducidos.
- Ahorro de espacio con respecto a los sistemas tradicionales.
- Mejor control sobre la sanidad del material vegetal que propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existen pocos individuos.
- Propagación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales.
- Posibilidad de conservar germoplasma a mediano y largo plazo.

1.5. LIMITACIONES DEL CULTIVO *IN VITRO*

- Estabilidad genética débil en algunos sistemas de propagación *in vitro*.
- Aclimatación de las plántulas, como un proceso difícil con mayores probabilidades de pérdidas en esta etapa.
- Poca respuesta inicial de algunas especies y genotipos.
- Alto costo de establecimiento de un laboratorio, lo que incide indirectamente en el precio final de la planta producida.
- Alto costo de los reactivos, aspecto que influye incluso en el desarrollo de la investigación en esta área.
- Necesidad de mano de obra especializada.
- Alta dependencia de energía eléctrica.

1.6. APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS

Pierik (1987) y Roca & Mroginski (1991) mencionan que los objetivos perseguidos por el cultivo de tejidos vegetales son numerosos y brevemente describen las posibilidades de aplicación de tales objetivos de la siguiente manera:

- Estudios teóricos sobre fisiología y biología vegetal.
- Propagación masiva de plantas utilizando las técnicas de germinación de semillas cultivo de ápices, cultivo de nudos e inducción de brotes, microinjertación.
- Establecimiento y/o mantenimiento de plantas libres de virus y patógenos mediante la utilización del cultivo de meristemas, como componente inicial de cualquier programa nacional de certificación de semilla.
- Conservación de germoplasma, para lo cual se utilizan las técnicas de: microtubrización, crioconservación y crecimiento mínimo.
- Mejoramiento genético mediante la aplicación individual o conjunta de técnicas de: cultivo de embriones, cultivo de anteras, variación somaclonal, cultivo de callus, cultivo de suspensiones celulares, fusión de protoplastos y como herramienta en la ingeniería genética (transformación o transferencia de genes).

Fruto de la experiencia boliviana "en terreno", una de las más interesantes aplicaciones del cultivo de tejidos en el componente de la conservación y uso de los recursos fitogenéticos es su contribución a la revalorización y recuperación de especies nativas, dado que permite inicialmente una multiplicación masiva y favorece a la redistribución de estas especies con el aditamento de ser material sano y de identidad genética conocida.

1.7. BIBLIOGRAFÍA

- Asmone S.E. 1997. *Status report on the development and application and use of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources*. Rome, Italy. IPGRI, pp. 67.
- Berthouly M. & Ethiene H. 2005. *Temporary immersion System: a new concept for use liquid medium in mass propagation*. In: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer. Netherlands, pp. 165 – 195.
- Cadima X.; Aguirre G. & Villarreal C. 1996. *Conservación in vitro a mediano plazo de papa (Solanum spp.)*. IV Reunión Nacional de la Papa. Cochabamba, Bolivia.
- Doca, N., Ávila, T., Guzmán, L. 2004. *La conservación in vitro como una alternativa para las pasifloras andinas*. IV Reunión Nacional de Biotecnología. Santa Cruz, Bolivia.
- Marante V.; Badani A.; Villarreal C.; Aguirre G. & Fernández E. 1998. *Priorización, Limpieza viral, Producción y Devolución de Cultivares Nativos de papa Libres de Virus a sus zonas de origen*. Revista Latinoamericana de la Papa 2000 - 2001. Vol 12. pp. 73 – 95.
- Jiménez G.E. 1998. *Generalidades del cultivo in vitro*. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Juan N. Pérez (ed.). Las villas, Cuba, ed. GEO, pp. 14-17.
- Kyte L. 1987. *Plants from test tubes: An introduction to micropropagation*. Hong Kong, Lehmann, Timber Press, Inc., pp. 160.
- Mejía, R. s/f. *Alternativas de Equipamiento de laboratorio in vitro y técnicas de Micropropagación de Plantas*. Dirección de Comunicación Técnica INIA, UNALM. Lima, Perú, pp. 100.
- Morales, I., Penacho, E., Quispe, F., Nogales, S. 2004. *Producción in vitro y conservación de las orquídeas en Bolivia*. IV Reunión Nacional de biotecnología, Santa Cruz, Bolivia.
- Ovando, M.I. 2004. "Manual de Cultivo de Tejidos Vegetales para Ingenieros Biotecnólogos". Consulta: 19 enero 2009. En: <http://exa.unne.edu.ar/depar/areas/biologia/fisiologia.vegetal/public-htm/>
- Pérez, J. Jiménez, E. Agramante, D. 1998. *Aumento de la eficiencia en la micropropagación*. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Juan N. Pérez (ed.). Las villas, Cuba, ed. GEO, pp. 179 - 191.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht, Boston, Martinus Nyghof. pp. 344.
- Roca W. M. & Mroginski A.L. 1991. *Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales*. Mroginski, A.L., Roca, W. M. (ed.) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia. Ed CIAT, pp. 1-12.
- Seilleur, P. 1989. *Culture in vitro d'explants vegetaux*. Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat. Bélgica, pp. 132.
- Vázquez, C.; Villarreal, J.; Ugarte, C. & Aguirre G. 2006. *Multiplicación in vitro mediante protocormos de orquídeas nativas (Epidendrum spp., Gongora ileniana, Huntleya meleagris), del distrito biogeográfico del Chapare (Cochabamba)*. 2007. II Feria de Ciencia y Tecnología USFX Sucre, Bolivia, pp. 98.