

R Fundamentos de Biotecnología Vegetal

**GLORIA JAIMES
DE LINDARTE**
Profesora asociada
Dpto. Biología U.F.P.S.

**CARLOS
BUSTAMANTE CORZO**
Profesor titular
Dpto. Biología U.F.P.S.

INTRODUCCION

En el primer semestre de 1996 la Universidad Francisco de Paula Santander ofreció por primera vez la carrera de Ingeniería en Producción Biotecnológica, la cual ha tenido gran aceptación por la juventud regional.

Se pretende en este artículo dar a conocer las bases en que se fundamenta la biotecnología vegetal, con el propósito de que las personas interesadas en su estudio tengan una fuente de información cercana y eficaz.

1. ASPECTOS GENERALES

Aunque el concepto de **Biotecnología** es bastante amplio, se puede definir como el "uso de sistemas biológicos a nivel celular y molecular para la producción de bienes y servicios" (2).

En la moderna producción agrícola, la biotecnología vegetal comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante o propágulo se cultiva asépticamente en un medio de composición definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Estas técnicas se conocen con el nombre genérico de **cultivo in vitro de tejidos vegetales**.

Los explantes o propágulos son segmentos diminutos de cualquier órgano o tejido de una planta y pueden ser secciones de raíces, tallos, hojas, yemas, pétalos, meristemas e incluso protoplastos, células aisladas y granos de polen.

Toda la metodología usada en el cultivo de tejidos vegetales se fundamenta en dos principios básicos: Primero. La **totipotencialidad celular**, propuesta por Haberlandt (1902) y que se refiere a la capacidad que tienen las células vegetales de formar el cuerpo entero de la planta.

Segundo. La hipótesis del **balance hormonal**, sugerida por Skoog y Miller (1957) la cual señala la importancia del equilibrio entre las hormonas que regulan las actividades fisiológicas en cada órgano y en cada vegetal.

2. OBJETIVOS DEL CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS

La regeneración de plantas por cultivo de tejidos puede presentarse como una continuación del crecimiento y desarrollo de estructuras organizadas separadas de la planta (ejemplo. meris-

temas apicales) o puede ser el resultado de un proceso de **formación de novo**, a partir de células o grupos de células donde no existía organización alguna; estas células pueden provenir de los órganos vegetativos (somáticos) o de las estructuras sexuales (gaméticas) de la planta.

La formación de plantas **de novo** puede ocurrir mediante la diferenciación de órganos vegetativos (organogénesis) que se inicia en células que forman **callo** o mediante la diferenciación de embriones a partir de células individuales (embriogénesis somática o asexual (Roca, 5).

Por consiguiente, los objetivos de la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son entre otros:

1. Propagación masiva de plantas libres de patógenos
2. Incremento de la variabilidad genética

3. Rescate de embriones

4. Conservación e intercambio de germoplasma

3. PROPAGACION CLONAL

Uno de los usos más extendidos del cultivo de tejidos *in vitro* es la propagación en breve tiempo de grandes cantidades de plantas que en condiciones naturales crecen y se multiplican muy lentamente. Si se dispone de una sola plántula sana, es posible en menos de un año obtener más de un millón de plantas idénticas a la planta madre y libres de patógenos.

En los laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia se están multiplicando millones de plántulas de variedades de plátanos importados resistentes a la Sigatoka Negra. Allí, sembrando un brote, proveniente de meristemas, se inducen en tubos de ensayo hasta 50 brotes en

menos de 15 días. Cada uno de estos brotes puede a su vez, ser dividido y subcultivado. Finalmente pueden aislarse y ser puestos a enraizar en otros medios nutritivos. Este método llamado **micropropagación** puede ser adaptado para otras especies de interés agronómico o simplemente botánico o ecológico.

Se han desarrollado diferentes métodos para la propagación masiva **in vitro**, los cuales constituyen una forma económica y rápida para aumentar el rendimiento y la calidad de plantas alimenticias atacadas por enfermedades causadas por virus o bacterias. El principal método utilizado es el cultivo de meristemas.

3.1. CULTIVO DE MERISTEMAS

consiste en el cultivo de explantes procedentes de la región meristemática de yemas terminales o auxiliares, comple-

tamente latentes o en crecimiento.

Los explantes pueden proceder de:

1. El **domo apical** o sea del extremo superior del meristema apical del vástago o **túnica**, sin primordios foliares.
2. Apice meristemático (Meristem tip) que incluye la región meristemática subapical o **corpus** con dos primordios foliares.
3. Apice del retoño (Shoot tip) o zona meristemática con varios primordios foliares hasta dos centímetros de longitud. En algunas ocasiones se puede llamar yema al "ápice del retoño".

El tamaño del propágulo en el cultivo de meristemas es tan pequeño que las técnicas de propagación asexual **in vitro** reciben el nombre de **micropropagación**.

La principal ventaja del cultivo de meristemas es que las plantas que se generan son general-

mente de un fenotipo homogéneo, indicando así estabilidad genética. La gran mayoría de las plantas obtenidas por cultivo de meristemas tiende a permanecer en el estado diploide.

La tasa inicial de multiplicación mediante cultivo de meristemas es reducida, pero va en aumento a medida que se va subcultivando. esta progresión geométrica permite la producción de millones de plantas en un solo año. Además, cada vez que se establezca una reserva suficiente de brotes múltiples, éstos pueden servir como fuente de propágulos y no se tendrán que utilizar explantes nuevos cada vez que se necesiten.

Muchas especies de plantas ornamentales se han propagado mediante el cultivo de meristemas, tales como: claveles (*Dianthus*), crisantemos (*Chrysanthemum*), anturios (*Anthurium*), gladiolos (*Gladiolus*), margaritas (*Gerbera*), fusias (*Fuchsia*), Flox (*Phlox*).

OTRAS VENTAJAS DE LA MICROPROPAGACION

Muchas especies de plantas son altamente resistentes a la mayoría de las prácticas de propagación. La propagación "in vitro" representa una alternativa como método de propagación para estas especies.

Las técnicas "in vitro" representan un método internacional muy seguro de intercambio de material vegetal, pues las condiciones de asepsia evitan el peligro de introducir agentes indeseables.

Las reservas de material "in vitro" pueden estar disponibles mucho tiempo después del año de almacenamiento.

3.2. MICROINJERTOS

Un método para producir clones de cítricos libres de virus, consiste en hacer microinjertos de ápices de tallos libres de virus

en plantas patrones obtenidos de semilla libres de agentes patógenos en cultivo estéril. La semilla se esteriliza y se hace germinar en un tubo de ensayo con medio estéril, a las tres semanas se remueve, se coloca en una caja de Petri cubierta con papel filtro estéril. Las plántulas se decapitan unos 3 cm. abajo del ápice. De un árbol de cítricos que vaya a servir como "púa" se cortan ramas terminales de 2 a 3 cm. de largo, se esterilizan en una superficie y se transfieren a cajas de Petri sobre papel filtro húmedo.

Los ápices de las ramas, con las hojas primordiales, se separan debajo de un microscopio de disección empleando microescalpelo hechos con pedazos de cuchillas para afeitar. Esos ápices se insertan en el extremo expuesto de los patrones decapitados. La planta injertada se transfiere luego a un soporte de papel filtro colocado en un tubo de ensayo. Se usa un medio de cultivo líquido con una solución de minerales (Grupo A) y los injertos se hacen crecer en la

luz. Mensualmente, los injertos se transfieren a un medio fresco, debiendo remover de continuo todos los brotes del patrón. En cinco meses, los injertos que hayan tenido éxito alcanzan un tamaño suficiente para ser transferidos a tierra.

4. GENERACION DE VARIABILIDAD

Inicialmente sólo se consideró el cultivo de tejidos "in vitro" como una técnica para propagar masivamente un cultivar o una especie, preservando las características genéticas de ella. Sin embargo, a medida que se per-

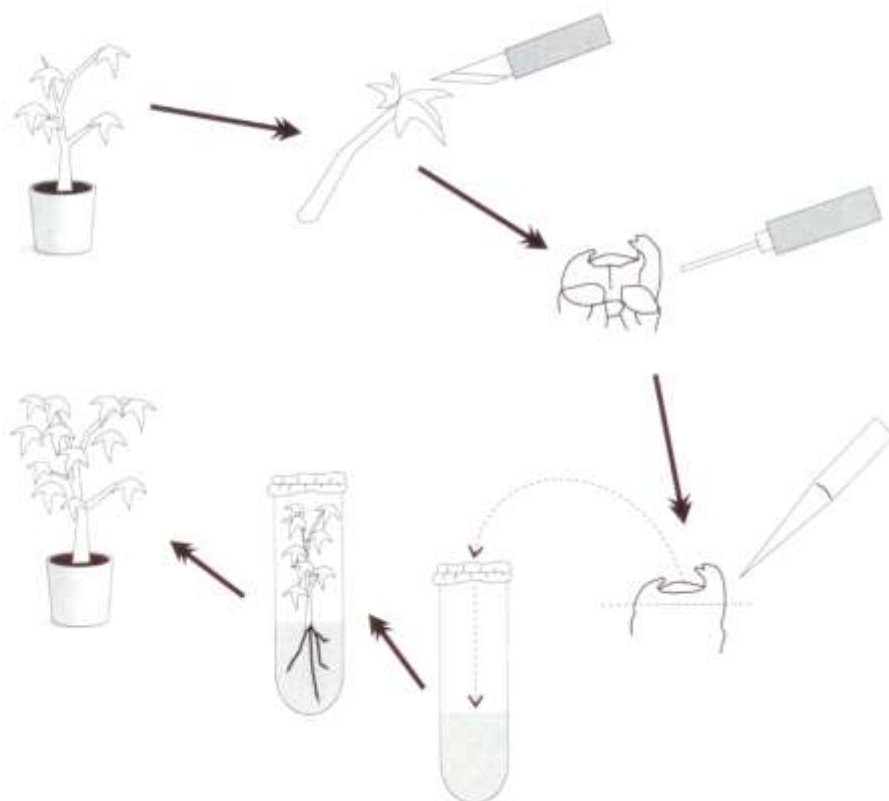


Figura No.1 Aislamiento de los meristemas apicales

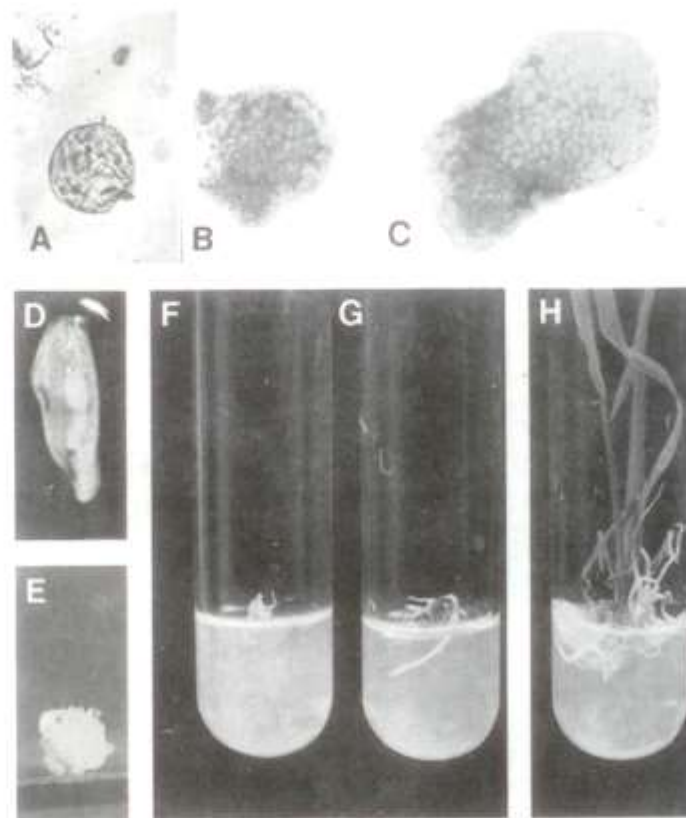
feccionaron las técnicas se observó que durante el cultivo in vitro, las células pueden cambiar dramáticamente su genoma, e incluso su complemento cromosómico.

Por esta razón el cultivo de tejidos, especialmente de sistemas no organizados (Ej: callos, células en suspensión y protoplastos) constituye una fuente enorme de variabilidad genética, la cual puede resultar en el mejoramiento de variedades seleccionadas en una o dos características importantes.

Para el mejoramiento genético de plantas se utilizan las técnicas que se fundamentan en los siguientes procesos:

- Variación somaclonal
- Variación gametoclonal

- Hibridación somática
- Embriogénesis somática
- Rescate de embriones



4.1 VARIACION SOMACLONAL

La base de la selección que realiza un fitomejorador para producir variedades e híbridos es la variación en una especie vege-

tal. Las técnicas agrupadas bajo el término de **variación somaclonal** se fundamentan en el hecho de que las condiciones de cultivos in vitro amplían la variación preexistente en un grupo

determinado de plantas; se denomina somaclonal porque trabaja sobre células somáticas totalmente diferenciadas.

Las variantes genéticas se originan por la acción de hormonas vegetales que incrementan la velocidad de división celular, resultando en una aglomeración celular llamada **callo**. Al incrementarse la

velocidad de división celular, crece la probabilidad de error en la copia del D.N.A. y, por lo tanto, la presencia de mutaciones que, a su vez, originan individuos con grandes o pequeñas diferencias entre sí con respecto de la población original. Las

metodologías que se utilizan para la obtención de somaclones son el cultivo de callos y el de células en suspensión.

CULTIVO DE CALLOS

Cuando en un medio de cultivo se utilizan ciertos tipos de hormonas vegetales como 2, 4D, ó 2, 4, 5T, la respuesta del explante o segmento de planta es desarrollar un callo. Si este es organogénico, tiene la capacidad de regenerar raíces, tallos, hojas y plántulas completas; si el callo es embriogénico, origina embriones asexuales que, si se cultivan en un medio apropiado, regeneran una plántula completa similar a la que se forma con los embriones sexuales.

El cultivo de callos se trabaja de acuerdo con el carácter que se desea mejorar. Si lo que se busca es resistencia a una enfermedad, se adiciona extracto del agente causal de la enfermedad o de sus toxinas al medio del

cultivo, con el objeto de que sólo se desarrollen las plántulas que sean potencialmente resistentes a la enfermedad. Luego de presentarse un crecimiento adecuado se requiere hacer una adaptación a las condiciones in vitro, es decir al ambiente normal. Este proceso se denomina **rustificación** o **endurecimiento** y se adelanta normalmente en condiciones de invernadero. Una vez rustificada la planta se prueba la resistencia en condiciones de campo y se seleccionan los individuos que mantengan el carácter evaluado junto con las características fenotípicas del material vegetal de origen.

Si se busca resistencia a agentes abióticos, por ejemplo, heladas, el callo se somete artificialmente a bajas temperaturas por diferentes períodos, condición ambiental que presiona para que vayan generándose individuos potencialmente resistentes a esta condición. Al igual que en el caso anterior, estas plántulas se "endurecen" para complementar la selección en campo por resis-

tencia y fenotipo. En forma semejante, es posible adelantar esquemas de mejoramiento para obtener variedades resistentes a la acidez, salinidad, baja fertilidad y otras condiciones ecológicas adversas.

CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION

Mediante este cultivo se logra al máximo la posibilidad de variación somaclonal, porque cada célula puede ser una variante genética. Para obtener células individualizadas se parte de un callo que sea viable, procediendo de la manera señalada en el caso anterior. Después se siembra en un medio líquido sin hormonas y se somete a agitación continua, con el fin de separar las células; el medio de cultivo que así se obtiene contendrá células individuales en suspensión.

El paso siguiente es determinar la curva de crecimiento celular mediante el procedimiento de contar células presentes en un período. En esta curva se deter-

minan tres fases: en la primera, un número pequeño de células muere; cuando se adaptan las células al medio de cultivo se inicia la fase dos, de crecimiento logarítmico o fase log. para llegar finalmente a la fase tres, donde se produce decrecimiento en el número de células vivas por la disminución de nutrientes en el medio de cultivo o por características intrínsecas del material vegetal.

Todo este trabajo se orienta a determinar el tiempo en que se presenta la fase log. puesto que en ella se encuentran el mayor número de células vivas en crecimiento activo, lo cual significa que está presente el máximo número de variantes genéticas.

A continuación, se sigue selección directa o indirecta. En la primera, las células se someten de una vez al máximo nivel de estrés. Por ejemplo, para producir líneas celulares de papa resistentes a la salinidad, se preparan cuatro concentraciones diferentes de cloruro de sodio

(NaCl) : 10.000, 20.000, 30.000 y 40.000 partes por millón (ppm = miligramo de soluto/litro de solución). Al cultivo de células en suspensión que se encuentra en fase log se le adicionan 40.000 ppm de NaCl, alcanzando el máximo nivel de estrés. Las células que sobrevivan se siembran de nuevo en un medio sin NaCl y luego de un tiempo establecido se someten otra vez al máximo nivel de estrés. Si las células siguen creciendo normalmente significa que se ha obtenido una variación estable que puede originar plantas resistentes a la salinidad. Si mueren, la variación es inestable y no es posible utilizarlas para lograr el objetivo propuesto.

Para la selección indirecta, el cultivo de células en suspensión se pasa por niveles crecientes de estrés, cultivando previamente los sobrevivientes en medios sin estrés. En el caso del ejemplo, primero se someten a 10.000 ppm. Entonces las células sobrevivientes se recuperan en un medio de cultivo sin NaCl y

luego se someten a siguiente nivel de estrés: 20.00 ppm. y así sucesivamente hasta llegar a 40.000 ppm. Al final, los sobrevivientes se siembran en un medio sin NaCl donde crecen normalmente por un tiempo determinado y a continuación se vuelven a someter al máximo nivel de estrés. Si las células crecen normalmente la variación es estable y el proceso resulta exitoso, pero si mueren la variación es inestable y el proceso fracasa.

En ambos casos, con selección directa e indirecta, una vez se obtiene una línea celular resistente se debe lograr la regeneración de una plántula completa. Esta es la principal limitante, porque hasta el momento son pocas las especies vegetales en las que se ha logrado regenerar una planta completa a partir de una célula somática individual. Cuando se logra la regeneración, debe probarse la planta regenerada en condiciones de campo y seleccionar, tanto por el carácter mejorado como por la fidelidad del fenotipo, a la

población original. Con las técnicas del cultivo de células en suspensión es posible obtener organismos resistentes o tolerantes a enfermedades, a condiciones ecológicas adversas y mejorar la calidad nutricional, entre otras posibilidades.

4.2. VARIACION GAMETOCLONAL

En este tipo de metodología se utilizan explantes que contienen gametos sexuales femeninos (ginogénesis) o gametos sexuales masculinos (androgénesis). Aún cuando la ginogénesis o cultivo de óvulos se ha experimentado, con la androgénesis o cultivo de anteras es con la que se ha logrado mayor éxito.

GINOGENESIS

La ginogénesis es el proceso mediante el cual se producen plantas haploides "in vitro" por inducción de tejidos haploides a partir de gametofitos femeninos.

Este proceso conlleva el uso de medios de cultivo muy refinados y específicos, por lo cual es poco utilizado.

ANDROGENESIS

En la década del 60, se demostró que el cultivo de anteras de varias especies originaban plántulas haploides. Los cultivos se pueden hacer con anteras que tengan granos de polen inmaduros o microesporas previas al desarrollo de los gametofitos masculinos.

El cultivo de anteras se inicia con la determinación del estado de desarrollo del grano de polen y su correlación con el tamaño del botón floral. Para ello, se escogen botones cerrados de diferentes tamaños de los cuales se toman anteras que se maceran ligeramente y se colorean con acetato carmín. Mediante el uso del microscopio se identifica el estado uninuclear tardío, es decir, el momento cuando el núcleo del grano de polen está a

punto de dividirse.

Se ha demostrado experimentalmente que en este estado ocurren las mayores posibilidades de regeneración de plántulas. Cuando se determina el tamaño adecuado del botón floral, se cosechan sólo botones de ese tamaño, de los cuales se toman anteras en condiciones asépticas y se siembran en medios de cultivo de composición conocida. Después de cierto tiempo, se presenta la regeneración de dos tipos de plántulas: diploides, provenientes del tejido de la pared de la antera, y haploides, desarrollados a partir de granos de polen. Se recuerda que, los gametos sexuales contienen un juego sencillo de cromosomas; por tanto, son haploides; cuando se fusionan en la hibridación sexual originan embrión diploide normal, con dos juegos de cromosomas, uno donado por el padre y otro por la madre.

Los haploides son importantes



porque expresan todas las características contenidas en la información genética de una planta, incluso aquellas que pueden no aparecer claramente a causa de condiciones genéticas como la recesividad. Como los haploides son infértiles y débiles, se hace necesario duplicar artificialmente el número de cromosomas de estas plántulas para obtener diploides que se conocen como **dihaploides homocigotos totales**. La duplicación cromosómica se obtiene asperjando las plántulas con soluciones de colchicina, compuesto que inhibe la formación del huso acromático en la división mitótica, evitando la separación de los cromosomas que se han duplicado y produciendo células diploides que construirán organismos diploides.

Mediante la variación gametoclinal es posible obtener líneas puras, con un 100% de homocigosis, en un período inferior

al que transcurre en los procedimientos convencionales. Estas líneas puras son las que finalmente conformarán los materiales híbridos o variedades mejoradas que pueden aprovechar los agricultores.

4.3. HIBRIDACION SOMÁTICA

Consiste esencialmente en inducir la fusión de protoplastos de plantas diferentes para formar células híbridas.

Los protoplastos son células vegetales que carecen de pared celular, es decir, sólo están rodeadas por la membrana plasmática. Distintos tejidos vegetales pueden ser tratados con **enzimas** capaces de digerir la pared celular, liberando así los protoplastos, y en condiciones apropiadas, éstos reconstruirán su pared celular y comenzarán a dividirse.

Las colonias originadas a partir de protoplastos aislados pueden

ser inducidas a regenerar plantas. Es posible lograr la fusión de protoplastos diferentes mediante diversos tratamientos (polietilenglicol, iones calcio, choque eléctrico) y obtener células híbridas con núcleo y citoplasma híbridos.

Frecuentemente, los genomas parentales no se integran por completo y ocurre la pérdida parcial o total de uno de ellos, otras veces ocurre la fusión de citoplasmas pero no de núcleos. Los híbridos somáticos son de gran interés en aquellas especies en donde el mejoramiento tradicional no ha podido ser aplicado, como en el caso del plátano. Aparentemente no existen barreras para la fusión intra o inter específica, o aún intergenérica, de protoplastos; sin embargo, todavía no se ha obtenido un cultivar generado por medio de esta tecnología.

Melcher y colaboradores, citado por Szabados, realizaron una especie de experimentos de fusión de protoplastos mediante

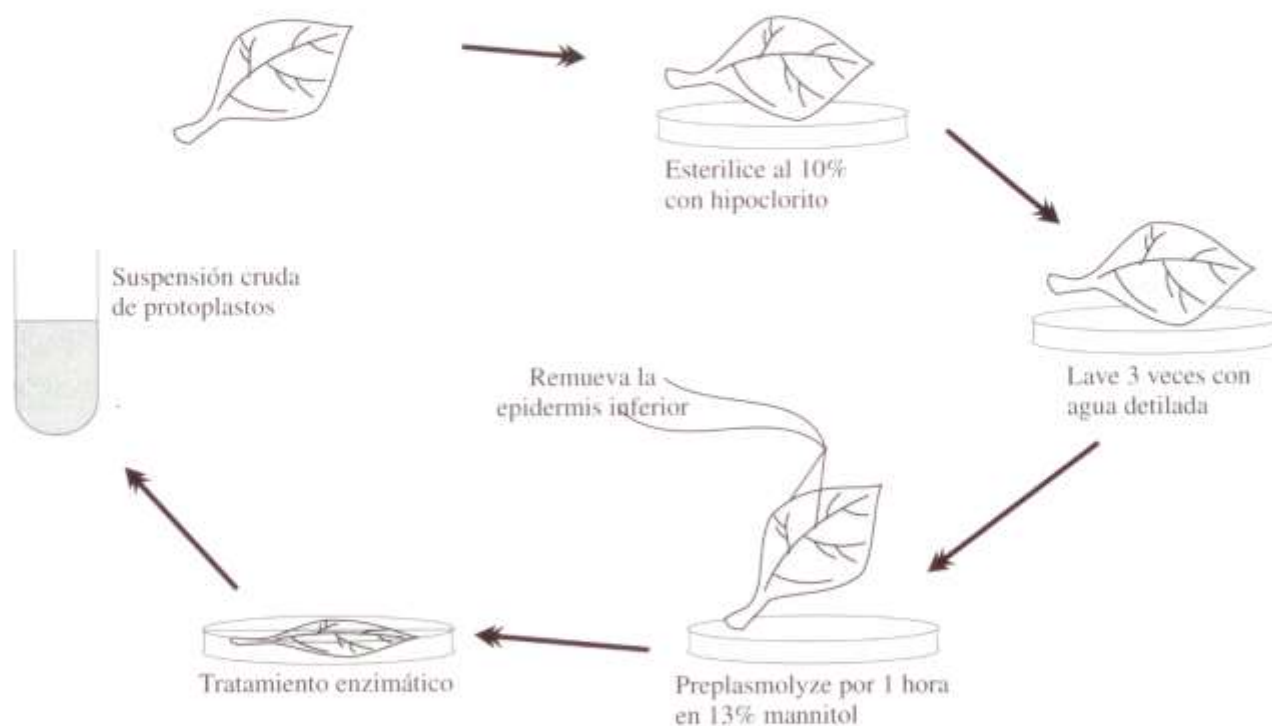
la hibridación del tomate y la papa, con lo cual lograron regenerar híbridos anfidiplóides y aneuploides. Estos fueron los primeros híbridos somáticos

plásmicos. Este mecanismo puede ser potencialmente útil para la transferencia de genes citoplásmicos, ejemplo, tolerancia de herbicidas, resistencia a

sexual en el uso de esta técnica es la dificultad de regeneración de plantas a partir de las células híbridas. Por esta vía se está trabajando en la fusión de célu

Figura No. 3

Técnica básica para el aislamiento de protoplastos del tejido epidermal de la hoja.



producidos, imposible de lograrlos por vía sexual. No obstante, su interés era todavía académico.

La fusión de citoplasmas lleva a la formación de híbridos cito-

enfermedades y esterilidad masculina, las que difícilmente pueden ser transferidas mediante la hibridación sexual convencional.

Una importante limitación

las de nódulos de leguminosas con células de cereales para buscar la fijación simbiótica del nitrógeno en especies como el trigo, la cebada y el maíz.

4.4. EMBRIOGENESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática o asexual es el desarrollo de embriones a partir de células que no son producto de fusión de gametos. También se le conoce con el nombre de apomixis.

Los primeros trabajos de embriogénesis somática fueron efectuados en cultivos de zanahoria, y en numerosas investigaciones actuales se utiliza esta planta.

En algunas plantas, **Citrus**, los embriones se origina de una célula o de un grupo de células, bien sea de la nucela (usualmente) o de los tegumentos. Estos embriones se desarrollan fuera del saco embrionario y en adición al embrión sexual y si se cultivan en un medio apropiado regeneran una planta completa similar a la obtenida con hembriones cigóticos

4.5. RESCATE DE EMBRIONES

El cultivo in vitro se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado y de rutina para el "rescate" de aquellos embriones que en condiciones naturales no habrían podido germinar y desarrollarse en ciertas especies vegetales.

En un sentido estricto, el material no se está multiplicando clonalmente, pero si se está multiplicando el germoplasma que de otra manera se perdería. Por ejemplo, las semillas de las orquídeas tienen un diminuto embrión que sólo incluye una masa sencilla de algunos cientos de células; para germinar este embrión depende totalmente de azúcar exógeno, el cual es suministrado en la naturaleza por una relación simbiótica con micorrizas. Estos embriones se han colocado en cultivo aséptico lográndose su crecimiento normal

Otro caso se presenta cuando se forman sustancias inhibitoras en la semilla y los embriones sólo germinan después de un período de latencia. En algunas plantas como el lirio (**Iris spp**) es posible eliminar tanto el efecto de latencia como el de sustancias inhibitoras de la germinación separando el embrión y cultivándolo en un medio aséptico.

Una situación similar ocurre cuando se realizan cruces interespecíficos que pueden resultar en aborto del embrión; para evitar esa pérdida se recurre al cultivo in vitro.

Una vez realizado el cruce entre dos especies diferentes, se espera que se desarrolle el embrión. A continuación, éste se disecta en condiciones asépticas y se siembra en un medio de cultivo de composición determinada, según la especie. Cuando se regenera la plántula, se procede a rustificarla y probarla en

condiciones de campo, obteniéndose por esta vía un híbrido inter-específico, resultado de unir las tecnologías convencionales con los métodos biotecnológicos.

5. CONSERVACION E INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA

La demanda de alimentos hace que los fitomejoradores se dediquen a obtener plantas altamente productivas, libres y resistentes a factores climáticos adversos.

Mediante el cultivo de tejidos *in vitro* se facilita la conversación de estos genotipos selectivos en condiciones controladas de laboratorio y con asepsia total, sin que se presenten las dificultades y riesgos propios de cultivar las plantas en el campo.

Por otra parte, la técnica *in vitro* permite intercambiar germoplasma entre países o regiones de un mismo país, sin los requerimientos de cuarentenas y restricciones aduaneras, necesarias en el transporte de plantas adultas.

Así, el Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, ha incrementado el banco de germoplasma de yuca en Palmira; el Centro Internacional de Papa en Lima, posee un gran núcleo de clones o cultivares de papa y en la Universidad Nacional se ha iniciado un banco de germoplasma de plátanos y bananos. Estas plántulas pueden conservarse por varios años en condiciones de crecimiento lento y en espacios reducidos, para luego ser seleccionadas y multiplicadas según las necesidades.

BIBLIOGRAFIA

- ◆ANGARITA, Antonio. Cultivo de tejidos vegetales "in vitro". Colombia: Ciencia y Tecnología, 1984; 2 (3): 26-27.
- ◆ROCA, William. Clonaje de células vegetales "in vitro". Colombia: Ciencia y Tecnología, 1986; 4(1): 14-15.
- ◆Enciclopedia Agropecuaria. Mejoramiento Genético, 1995. Terranova editores- Bogotá. Tomo 2 P. 21-45.
- ◆SANCHEZ DAZA, José Iván. Manual de cultivo de tejidos vegetales y la micropropagación. 1990. Bogotá p. 75.
- ◆HARTMAN , Hudson y KESTER, Dale E., Propagación de plantas. 1980, CECSA, México, P. 638-663.
- ◆SZABADOS, Lasalo. La fusión de protoplastos y el mejoramiento de plantas de interés agronómico. Colombia: Ciencia y Tecnología, 1986; 4(2) : 30-31.
- ◆PACHON, German y QUINTERO, Uver. El cultivo de tejidos "in vitro" en la producción de maderas. Colombia: Ciencia y Tecnología, 1987; 5(2): 8-9.
- ◆VILLEE, Claude; Eldra P. Solomon et al. Biología 2^{da} de 1992. Interamericana, México, P. 700-701.