

CULTIVO DE TEJIDOS EN LA AGRICULTURA

Nicole Hewstone O.
Ingeniera Agrónoma M. Sc.
nhewston@platina.inia.cl

M. Antonieta Reyes C.
Bióloga

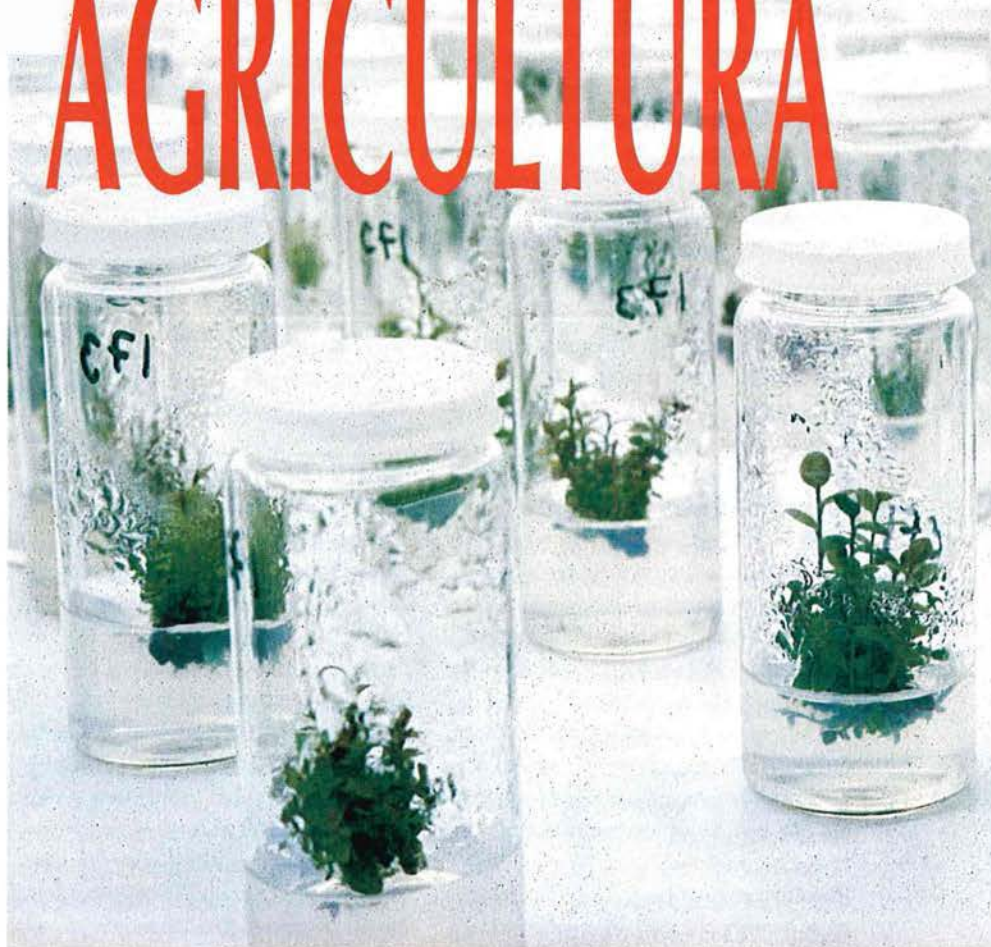
INIA La Platina

El impulso de las exportaciones y los aumentos de las exigencias en el mercado interno implican entregar productos de excelente calidad. Ello origina la necesidad de optimizar procesos de producción con tecnologías de alto nivel, que permitan resolver problemas concretos de propagación y saneamiento de plantas. La biotecnología provee herramientas para enfrentar dicha problemática, siendo el cultivo de tejidos *in vitro* o micropropagación vegetal una de las de mayor desarrollo en la actualidad.

“**I**n vitro” significa, sencillamente, “en vidrio”, porque durante las primeras etapas del proceso las plantas crecen en tubos de ensayo y matraces. Esta técnica se basa en la “totipotencialidad celular”, la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo ciertas condiciones, dadas en el cultivo *in vitro*. Así se logra la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original, a partir de cualquier parte de la planta, ya sea trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas. Al proceso de inducción de formación de órganos (brotes y raíces), en forma directa o indirecta, a partir de una muestra de tejido vivo se lo conoce como or-

ganogénesis. La organogénesis indirecta es la formación de órganos con desarrollo previo de callo, es decir, una población de células en continua proliferación desorganizada, que forma “masas amorfas”. Estas masas deben ser inducidas o estimuladas para dar origen a los órganos. En cambio en la organogénesis directa, las células se organizan para producir nuevos brotes y/o raíces sin pasar por la fase de callo.

El cultivo *in vitro* comienza con el establecimiento de un trozo de tejido previamente desinfectado en un medio nutritivo para las células. Esto se realiza en una “cámara de flujo laminar”, que ofrece condiciones de asepsia. Los medios



al campo, por lo que se acostumbra un período de preaclimatación in vitro y de endurecimiento en invernadero. La técnica puede ser desarrollada en laboratorios pequeños, donde todas las dependencias y materiales usados deben ser constantemente desinfectados. Existen diferentes tipos de cultivos in vitro, dependiendo de los objetivos perseguidos. Las variaciones están sujetas a las condiciones de cultivo y a los explantes (células, tejidos, meristemas, órganos, etc.) inicialmente utilizados, dándose una amplia gama de eventos y posibilidades de uso de técnicas. Algunas de ellas serán brevemente descritas a continuación, para ser explicadas en forma más completa en artículos posteriores.

Micropropagación

Se utiliza para la multiplicación masiva y rápida de plantas de élite, con mínima presencia o libres de virus. Normalmente se usan microestacas que contienen tanto yemas apicales como axilares. De ellas se desarrollan brotes, posteriormente enraizados con fitohormonas exógenas si no hay inducción conjunta de raíces. La ventaja de este tipo de propagación es el alto número de plántulas logradas a partir de poco material inicial. En el Centro Regional de Investigación (CRI) La Platina del INIA se ha utilizado esta técnica para multiplicar distintas variedades de arándanos, frutillas, camote, patrones de frutales, etc. No sólo hay ejemplos de micropropagación en especies hortofrutícolas. También las ornamentales se propagan en

gran escala en laboratorios particulares. Es el caso de especies como *Gerbera*, *Spathiphyllum*, *Lillium*, así como diversos géneros de orquídeas, helechos, variedades de violetas, begonias y *Anturium*. El éxito a nivel comercial se debe a la multiplicación masiva y rápida de plantas uniformes, además de la gran calidad sanitaria.

En el sector agroforestal se utiliza ampliamente la multiplicación masiva de plantas de los géneros *Pinus* y *Eucalyptus*, en países como Brasil, Sudáfrica y Portugal, donde el rubro constituye una importante fuente económica.

Cultivo de ápices meristemáticos

El sistema permite obtener clones sanos a partir de plantas infectadas, pues en la zona apical del meristema no existe desarrollo de haces vasculares, que es por donde se transportan los virus junto con la savia. Los clones estarán libres de patologías, especialmente de tipo viral, y, a diferencia de las plantas afectadas, verán disminuido el riesgo de bajar su productividad.

Esto ha permitido y facilitado el intercambio de material vegetal en condiciones asépticas entre distintas zonas geográficas, lo cual resulta especialmente importante cuando hay restricciones cuarentenarias, a veces largas y costosas. El material vegetal ingresado puede conservarse in vitro durante períodos ilimitados, al igual que el germoplasma élite o en peligro de extinción. Así, grandes colecciones se manejan en espacios reducidos.



Incubación de plantas en cámara de crecimiento.

nutritivos o de cultivo contienen sales minerales y vitaminas, además de sacarosa como fuente energética, fitohormonas y agentes gelificantes como agar. Son ajustados a un pH que será alcalino o ácido según los requerimientos de la planta y luego distribuidos en frascos para esterilizarlos en autoclaves y evitar contaminaciones por hongos o bacterias. Los tejidos vegetales “sembrados” en los medios nutritivos se llevan a cámaras de crecimiento, donde se controla la temperatura, intensidad y tiempo de iluminación requeridos para cada especie vegetal. Después de un tiempo, se obtiene una pequeña plantita o “plántula” que debe ser acondicionada para su traslado



Embriogénesis somática y regeneración de plantas en ajo.

Por ejemplo, en Chile, en los años 80, el INIA y otras instituciones multiplicaron materiales in vitro de arándano internado desde Estados Unidos, los que fueron posteriormente evaluados en el campo, evitándose una larga cuarentena. Su establecimiento a corto plazo permitió al país ocupar un espacio en el mercado internacional.

Además, INIA ha trabajado en la limpieza de los virus endémicos que afectan al ajo, intercambiando germoplasma con otros países. La generación de material inicial (semilla de ajo) libre de patógenos asegurará un mayor rendimiento en el campo.

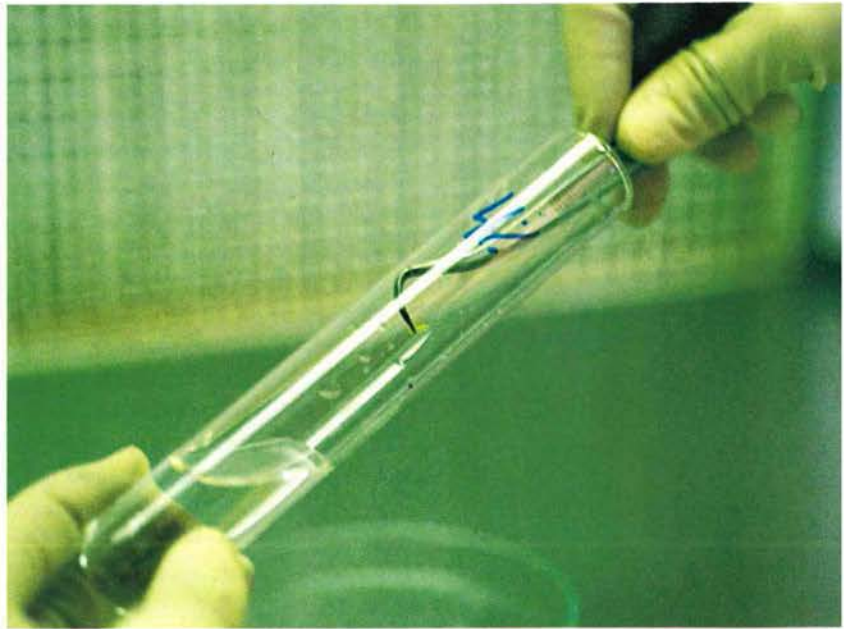
Microinjertación

Es otra forma de obtener plantas libres de virus, viroides y micoplasmas. Consiste en colocar en condiciones asépticas un ápice meristemático en la base de una escisión en "T" invertida, de una plántula sana decapitada ("epicotilo") establecida in vitro. La microinjertación ha sido muy utilizada en cítricos para sanearlos del virus de la tristeza, psoriasis y de viroides como xyloporosis y exocortis. El método se emplea con gran éxito en Brasil, que es el segundo productor mundial de cítricos y el mayor exportador de jugo concentrado.

Embriogénesis somática

Consiste en la formación de embriones a partir de células o tejidos "somáticos", es decir, de cualquier célula de la planta, sin tener que pasar obligadamente por la unión de las células gaméticas (sexuales) para la formación de los embriones. Es una eficiente forma de multiplicación clonal, de alto rendimiento en especies como zanahoria, apio, comino, espárrago, ajo y cítricos. Usando esta técnica se ha producido una palmera de aceite que mantiene su estabilidad genética. En las especies forestales se ha ocupado para resolver problemas de juvenilidad, ocasionados por otros sistemas de cultivo in vitro. Actualmente, se utiliza en la producción de semillas sintéticas o artificiales que permiten la siembra directa en el campo de embriones encapsulados o recubiertos en geles.

La embriogénesis somática puede esta-



Siembra de explantes in vitro.

blecerse directamente a partir de células o indirectamente a través de la formación de callos. Sin embargo, este último es un proceso más lento y aumenta la probabilidad de variación somaclonal, o sea la variación genética por mutaciones en células distintas a las células generativas inducidas durante la formación del callo y el proceso de crecimiento en el cultivo in vitro. Las células cambiadas o mutadas son capaces de participar en la regeneración de nuevos individuos, lo que se puede traducir en individuos diferentes a la planta madre, obligando a seleccionar por características fenotípicas en terreno.

La variación somaclonal ha sido usada como una herramienta útil para la obtención de individuos genéticamente mejorados. Ejemplos de cultivares que se generaron a través del cultivo de tejidos por variación somaclonal, incluyen al tomate "DNAP9" (1987), con un alto contenido de sólidos solubles, y al pimentón "Bell Sweet" (1988), que presenta un reducido número de semillas por fruto.

Ambos cultivares fueron lanzados comercialmente en Estados Unidos.

Cultivo y fusión de protoplastos

Los protoplastos son células vegetales a las cuales se les ha eliminado la pared celular mediante degradación enzimática. Estas células son más manejables en

cultivo, ya que se facilita el traspaso de sustancias a través de la membrana o de poros que se inducen en ella. El cultivo de protoplastos se usa para obtener híbridos: la ausencia de pared celular simplifica la unión de células de la misma o distintas especies, las que, al fusionarse, se transfieren material genético, aumentando la variabilidad genética.

Las fusiones de protoplastos intra o interespecíficas permiten lograr nuevas variedades/especies que no se conseguirían con métodos tradicionales. Ejemplos son los limones triploides sin semillas, tomates resistentes a nemátodos, papas resistentes a virus del enrollamiento de la hoja (PLRV) y a tizón tardío (*Phytophthora infestans*).

Además, los protoplastos permiten la internación directa de genes a través de la técnica de electroporación: se da un impulso eléctrico a las células "desnudas" para producirles pequeñas perforaciones por donde se puede introducir un ADN extraño.

Rescate de embriones

El rescate de embriones inmaduros posibilita combinar la variabilidad genética, o crearla en el caso de no existir, rompiendo barreras naturales entre especies y favoreciendo el flujo de genes entre ellas o entre variedades. Se asegura así la sobrevivencia de embriones recién formados al colocarlos en condiciones

óptimas nutritivas y hormonales in vitro. En Chile, el INIA está creando variedades de uva de mesa sin semilla. Se fertilizan las flores de una variedad que no produce semillas y el embrión se rescata antes de ser abortado, lográndose plantas provenientes de cruzamientos imposibles en forma natural.

Otro uso del rescate de embriones ha sido para inducir la formación de plantas haploides. Estas plantas quedan dotadas de la mitad de sus cromosomas por la eliminación de los cromosomas de uno de los padres después del cruzamiento, pero se induce el desarrollo del embrión que se rescata y se forma la planta in vitro. Una vez duplicada la dotación cromosómica de las plantas haploides, éstas quedan fértiles y útiles para programas de mejoramiento genético, ya que son completamente homocigotas (líneas puras).

Cultivo de anteras

Una alternativa para conseguir haploides en el desarrollo de líneas puras ha sido el cultivo de anteras u ovarios, donde se forman plantas a partir de los gametos inmaduros y, por lo tanto, haploides. Las anteras son el tejido masculino de la flor, en el cual se desarrolla el polen. También se puede cultivar directamente polen y óvulos aislados in vitro. Una vez logradas las plantas haploides, sus cromosomas se duplican en forma natural o artificial, usando colchicina. La técnica

permite desarrollar plantas fértiles, completamente homocigotas, cuyas características recesivas tienen una alta probabilidad de expresión fenotípica, pues desaparecen los genes dominantes que las enmascaraban. Igualmente, es posible disminuir el tiempo de obtención de variedades nuevas en especies de autopolinización, o la producción de híbridos a partir de líneas puras. En cereales se consigue reducir el período a una generación de autocruzamientos, en lugar de 5 ó 6. Así, se han generado variedades de arroz, trigo, raps y cebada seleccionadas para ofrecer características como calidad de granos, tolerancia a climas, suelos, enfermedades, etc. Esta técnica ha sido muy útil en estudios genéticos, especialmente en el de plantas mutadas y transgénicas, pues los genes mutados o introducidos pueden ser expresados con mayor facilidad.

Plantas transgénicas

Son plantas a las cuales se les ha introducido genes de otras especies, incluso genes de organismos de distintos reinos, como virus, animales, insectos, con el fin de mejorarlas en una cualidad específica. En Chile, se han introducido genes de pollo, insectos y otros sintéticos en papas, para inducir resistencia a la pudrición blanda, producida por la bacteria *Erwinia carotovora*. Actualmente el INIA realiza los ensayos agronómicos de

dichas plantas transgénicas. También se han "vacunado" plantas de papa y melón, introduciéndoles genes de los propios virus que causan la enfermedad. De igual forma se ha mejorado la calidad de productos como el tomate, retardando su madurez, se ha obtenido resistencia a herbicidas e insectos en algunas especies, o se ha mejorando el contenido y calidad de proteínas y aminoácidos, etc.

Proyecciones del cultivo de tejidos

El desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos conlleva una alta inversión en instalaciones, equipamientos, materiales de vidrio y reactivos. Además, se requiere un grado de especialización para las operaciones en las cámaras de flujo laminar y preparación de medios de cultivo. No obstante el costo, su proyección es enorme.

Los viveros se han visto muy beneficiados con la producción de plantas libres de patógenos y de alta calidad. Se pueden recuperar especies en peligro de extinción, multiplicarlas, mejorarlas y devolverlas a su hábitat natural.

En las ciencias puras, permite investigaciones básicas de los productos secundarios, de la regulación metabólica y génica, de flujo de sustancias orgánicas e inorgánicas, estudios fisiológicos de los mecanismos de resistencia a toxicidad, a metales, metabolitos, pesticidas, estrés hídrico, salino y calórico, etc.

Por su parte, el mejoramiento de plantas tiene una gran proyección con el uso de la biología molecular, que permite la manipulación de genes. Esta ciencia necesita el complemento del cultivo de tejidos para la introducción de genes de interés, y que éstos se expresen en los ensayos de campo. La inserción de genes en las plantas tiene utilización incluso en procesos industriales, cosmetológicos y farmacéuticos, seleccionando y micropropagando plantas sobreproductoras de metabolitos. Es así como existen vacunas que se están desarrollando en forma masiva en plantas, cuya producción resulta más barata. Yendo un poco a la ciencia ficción cercana, pronto bastará con comer un fruto o una verdura para quedar vacunado contra alguna enfermedad de importancia. ▲



Cultivo de meristemas para limpieza de virus en ajos.