

Capítulo 5

Propagación clonal in vitro

A. D. Krikorian*

Agradecimientos

A través de los años, varios asociados de investigación, asistentes y científicos visitantes han participado en diferentes proyectos de cultivo de tejidos en este laboratorio y, aunque no los menciono por su nombre, merecen un especial reconocimiento. Agradezco especialmente a Robert P. Kann. Quiero reconocer el apoyo financiero suministrado por la NASA durante gran número de años. Finalmente, agradezco a la Cambridge Philosophical Society por permitirme utilizar extractos, algunos modificados, otros no, de Krikorian (1982).

* Department of Biochemistry, State University of New York at Stony Brook (SUNY), Nueva York, E. U.

Origen y Desarrollo del Concepto Clon

Este capítulo está dedicado especialmente a presentar algunas estrategias que se pueden adoptar en la multiplicación clonal. Sin embargo, antes de entrar en el tema sería útil definir algunos conceptos, acerca de los cuales existe confusión, como es el relacionado con la palabra clon¹.

Herbert J. Webber, un fitomejorador del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, introdujo el término 'clon' en 1903, y lo aplicó a las plantas cultivadas que se propagaban vegetativamente. Derivada de una palabra griega (κλών) que significa ramita o vástago, la palabra clon había sido sugerida por el botánico Orator F. Cook. Esta palabra proporcionaba una forma clara de decir que "las plantas cultivadas de tales partes vegetativas no son individuos en el sentido común de la palabra, sino que simplemente son partes trasplantadas del mismo individuo; en términos de herencia, tales plantas son el mismo individuo".

En 1912 el genetista George H. Shull recomendó que se ampliase el término para incluir a los animales que aumentan su número o se multiplican por cualquier método asexual; pidió, además, que se aplicase a todos los grupos de individuos genotípicamente idénticos que se originasen de la reproducción asexual de cualquier tipo, incluyendo la apogamia. Consideró necesario limitar el uso de la palabra clon a la designación de organismos genotípicamente idénticos, con el fin de evitar confusiones en el caso de que se presentasen mutaciones somáticas; por definición, concluía, la propagación de una yema vegetativa representaría el origen de un nuevo clon.

Después de considerar problemas tales como el de saber si dos ramitas del mismo árbol, utilizadas como estacas o acodos, tenían la misma constitución, y el de reconocer, en consecuencia, que no había certeza para afirmar que eran miembros del mismo clon, Shull cambió rápidamente su definición por ésta: "clon es un grupo de individuos que pueden ser rastreados mediante reproducciones asexuales (incluyendo la partenogénesis cuando no está acompañada de una segregación genotípica) hasta un solo cigoto ancestral o perpetuamente asexual."

Quienes se preocupaban por la nomenclatura de las plantas cultivadas se descuidaron en reconocer la naturaleza fundamental de los clones hasta cuando el genetista y fitomejorador Arlow B. Stout instó a que se aceptara

1. En esta sección se han omitido las citas de la literatura por razones de espacio. El lector puede consultar a Krikorian (1982).

el término clon, conceptuándolo simplemente como "la unidad más pequeña y más individual" en la horticultura. Stout no sólo se daba cuenta de que un clon de cualquier planta cultivada es "ante todo una unidad artificial", sino de que para los taxónomos era importante conocer cómo se producía un clon y cuál era su relación con las especies o las variedades que se presentaban en la naturaleza.

Esta campaña fue ardua y dilatada pero finalmente tuvo éxito, y actualmente el código oficial de la nomenclatura de las plantas cultivadas define la palabra clon como: "un conjunto genéticamente uniforme de individuos (que pueden ser de naturaleza quimérica) originalmente derivados de un solo individuo mediante propagación asexual; por ejemplo, por medio de estacas, divisiones, injertos o apomixis obligada. Los individuos propagados a partir de la mutación perceptible de una yema forman un cultivar diferente de la planta progenitora".

Tal vez sea apropiado señalar que la palabra quimera, aplicada por primera vez a las plantas por el botánico alemán Hans Winkler, se refiere a una planta cuyos tejidos o células corresponden a dos o más ideotipos o al total de los determinantes hereditarios, ya sean cromosómicos o extra-cromosómicos; los ideotipos diferentes pueden ser causados por mutación somática, segregación o injerto.

Las quimeras son un conjunto heterogéneo dentro del individuo, y a veces se llaman mosaicos. La propagación artificial mediante injertos y gemación es un ejemplo extremo de multiplicación asexual o clonal que es al mismo tiempo quimérica; en este caso, el tronco y el cogollo de un vástago o yema son las unidades de crecimiento clonal que se hacen vivir en el sistema radical de otra planta.

Muchos organismos predominantemente unicelulares existen como clones en su estado natural, y en estos casos la reproducción asexual adquiere mayor importancia; una simple célula es el origen del clon y éste es muy conspicuo como unidad natural de vida, ya que es el origen de toda una raza o especie.

A medida que mejoraron las técnicas para el trabajo con cultivo de células de organismos superiores, especialmente de células animales, los investigadores adoptaron la palabra clon para referirse a una población de células derivadas de una sola, mediante mitosis. Generalmente, ya no estaba implicada la identidad o uniformidad genotípica, porque pronto se reveló que durante el cultivo aséptico las células pueden cambiar en forma dramática en términos de su genotipo, o incluso de su complemento cromosómico.

La falta de homogeneidad genotípica absoluta en las poblaciones clonales era un factor que causaba poca preocupación antes de la llegada de las técnicas de cultivo para regenerar plantas superiores completas a partir de células somáticas. En realidad, durante mucho tiempo se ha reconocido que puede haber una variación intraclonal debida a diferentes causas, entre las cuales están las interacciones genotipo-ambiente y un tipo de 'covariación no genética'.

La última derivación celular u origen de una población clonal generada por medios hortícolas o agrícolas tradicionales es de poca importancia, ya que el punto de inicio de la propagación es relativamente grande y crece como una unidad más o menos coordinada. Tiene esa derivación, sin embargo, aplicaciones cruciales en el caso del cultivo de tejidos y de células, sea que las plantas individuales regeneradas en último lugar deriven de una sola célula, de una población de células puras genéticamente idénticas, de una población de células puras genéticamente disímiles, de un grupo genéticamente uniforme de células o de un grupo genéticamente no homogéneo de células (Broertjes et al., 1978).

También tendría consecuencias importantes si se llevasen a cabo procedimientos de ingeniería genética o de ADN recombinante en una población de células puras cultivadas o de sus protoplastos. A menos que los gametos individuales o miembros individuales de un clon sean rastreables hasta las células genéticamente idénticas, la variación en las características heredables —tanto nucleares como citoplasmáticas— de diferentes células produciría un número de subpoblaciones u organismos que, en el sentido estricto, no serían clonales.

Los clones o las poblaciones agregadas que se producen por métodos convencionales no se forman, por lo regular, 'horizontalmente', es decir, durante una generación, sino que lo hacen 'verticalmente' a través del tiempo, generación tras generación; en cambio, las técnicas del cultivo aséptico que incluyen grandes números de propágulos muy pequeños o de células han cambiado dramáticamente el potencial hacia lo 'horizontal'. Todo lo anterior magnifica cualquier falta de fidelidad absoluta en el genotipo o en el fenotipo.

Estrategias para la Propagación Clonal

Existen varias vías generales para realizar la multiplicación clonal; entre ellas están:

- a. La multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales. El punto de inicio en este caso puede estar en los meristemas, las puntas de los brotes, las yemas, los nudos o los brotes de las yemas en raíces.
- b. La organogénesis directa. En este caso la formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el explante de un órgano, o en alguna parte escindida de la planta.
- c. La organogénesis indirecta. La formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en este caso en el callo; es obvio que el callo se deriva inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta.
- d. La embriogénesis somática. Los embriones pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente de las células cultivadas en suspensión o en un medio semisólido.
- e. Los órganos de perennidad, formados en cultivos asépticos.
- f. El microinjerto.
- g. El cultivo de embriones y esporas.

Las Figuras 5.1 y 5.2 ilustran estos puntos, que se discuten más en detalle a continuación.

Cultivos de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares

En los años 60, el desarrollo de procedimientos para multiplicar y mantener plantas en cultivos asépticos recibió un impulso dramático; ello se debió al descubrimiento de la capacidad que tienen las puntas de los brotes y los meristemas de la orquídea *Cymbidium* sp., cortados apropiadamente y sembrados en cultivo aséptico, para producir protuberancias que semejan protocormos normales capaces de crecer y desarrollarse en plántulas (American Orchid Society Bulletin, 1960-1968; Moul, 1974; Arditti, 1977).

Desde entonces se han usado los cultivos de puntas de brotes y de meristemas de muchas otras plantas para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos; de una punta de brote cultivado o de un explante, en algunos casos, se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples (Styer et al., 1983).

En realidad, en cada uno de estos casos se espera a menudo lograr la formación de ramas axilares que puedan separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas

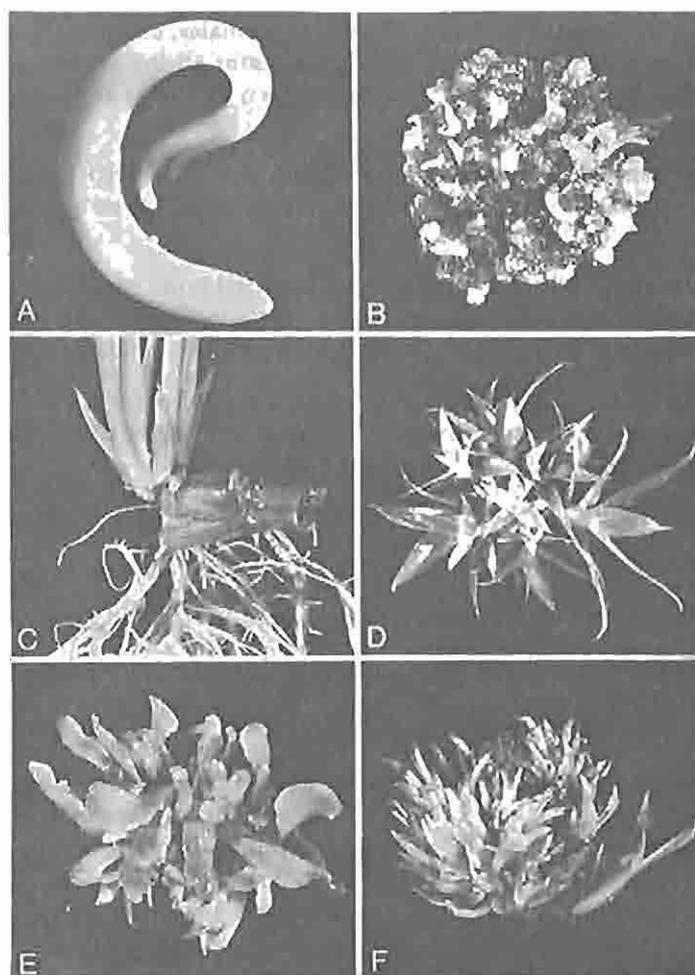


Figura 5.1. Ejemplos de propagación in vitro, usando diferentes estrategias. A) Embrión de *Datura stramonium* escindido de una semilla inmadura en la etapa de corazón y cultivado hasta cuando alcanzó su tamaño normal en el medio de cultivo aséptico (X13.4). B) Masa de protocormos de la orquídea terrestre *Calopogon tuberosus*; esta masa se inició de una semilla germinada asépticamente y estimulada para formar múltiples protocormos (X4.3). C) Multiplicación a partir de brotes explantados de nudos de arroz (*Oryza sativa* IR38); las nuevas macollas derivan de la yema nodal (X4.3). D) Multiplicación en *Aechmea fasciata* mediante la estimulación de yemas axilares (X3). E) Conjunto de brotes del helecho cuerno de venado (*Platyceryum* sp.); éstos, al igual que los de D), requieren ser enraizados (X4). F) Multiplicación de un grupo de brotes iniciados de un meristema vegetativo de banano diploide *Musa* sp. 'AA'; aquí los brotes derivan de la liberación de yemas de oposición foliar al igual que de la formación de yemas adventicias (X1.3).

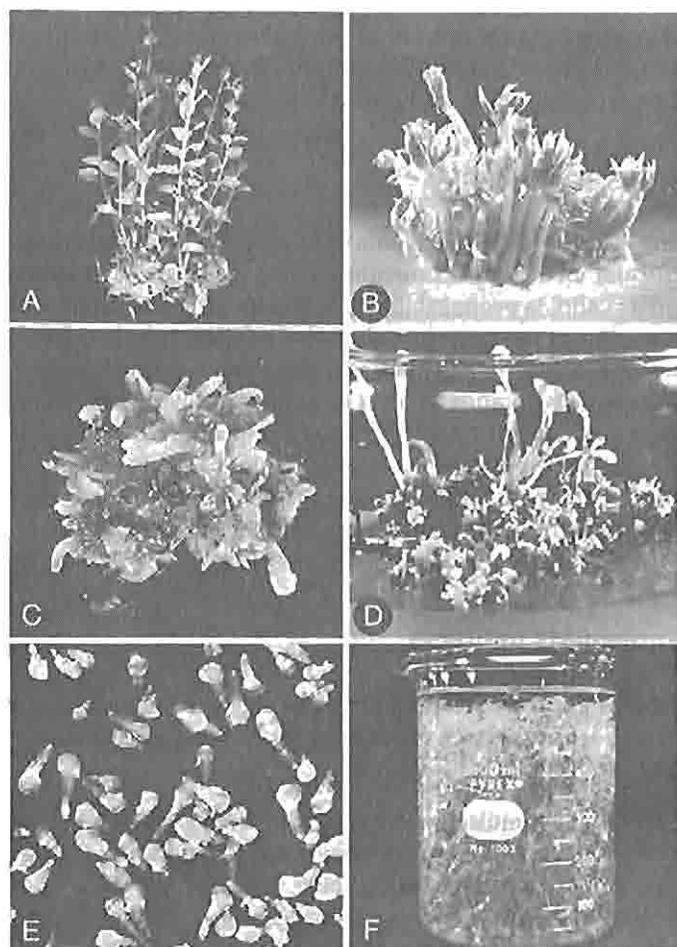


Figura 5.2. Nuevos ejemplos de propagación in vitro empleando diferentes estrategias. A) Grupo de brotes de arándano (*Vaccinium* sp.) obtenidos de un solo brote, con dos hojas totalmente desarrolladas y dos hojas primordiales (X1.7). B) Grupo de brotes del árbol del acebo chino (*Sapium sebiferum*) obtenidos de un explante primario que comprende una sección de tallo y una yema axilar (X2.7). C) Callo derivado de un capullo cerrado de *Tagetes erecta*, la caléndula 'Orange Hawaii', que muestra el desarrollo de brotes adventicios (X5.2). D) Cultivo embriogénico de amapola (*Papaver setigerum*) 'Arya II' que crece en un medio semisólido; observar los diversos niveles de desarrollo de las plántulas (X1.4). E) Estructuras embrionarias de un clon diploide de la azucena amarilla (*Heimerocallis* sp.) 'Autumn Blaze' derivado de un cultivo en suspensión (X5.1). F) Plántulas de azucena amarilla extraídas del cultivo líquido y colocadas en un frasco para la fotografía; estas plántulas derivan de estructuras similares a las que aparecen en E) (X0.6).

axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se subcultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo. Por lo tanto, el método es bueno para obtener una rápida multiplicación clonal, y se ha aplicado a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas.

Organogénesis directa

Durante muchos años se han conocido sistemas mediante los cuales se pueden formar brotes directamente de una parte de la planta, sin la formación de callo; la propagación de la violeta africana *Sainipaulia* sp. a partir de explantes del pecíolo o de la base foliar, o la propagación de ciertas begonias a partir de explantes foliares son ejemplos que se recuerdan fácilmente. Los órganos o partes de plantas que contienen rudimentos de yemas o que tienen un potencial para la producción de meristemas adventicios llevan rápidamente a este enfoque. Las listas de plantas que pueden propagarse por medio de explantes de hojas o de raíces han estado disponibles para quienes trabajan en propagación (Krikorian, 1982; Browse, 1979; Hartmann et al., 1984; Cook, 1984).

Organogénesis indirecta

En términos generales, en los cultivos de callos se inducen proliferaciones más o menos aleatorias, a partir de explantes tomados de varias partes de plantas, para formar brotes y raíces.

Este método de estimulación del desarrollo de órganos a partir de callos se basa en el trabajo, actualmente clásico, de Folke Skoog y sus colegas, especialmente Carlos Miller; este trabajo se realizó en los años 50 utilizando la cepa Wisconsin 38 de un cultivar 'Havana' de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Los tejidos fueron expuestos a niveles predeterminados de una o varias clases de sustancias promotoras de la división celular (citocininas) y al AIA o a cualquiera de sus análogos sintéticos, tales como el ANA (Pilet, 1977; Letham et al., 1978; Skoog, 1980; Scott, 1984; MacMillan, 1984).

Nunca se debería dejar de recalcar el ímpetu que el descubrimiento de la primera adenilcitosinina químicamente identificada, la KIN, le dio a la tecnología del cultivo aséptico. Por primera vez los investigadores pudieron añadir al medio de cultivo combinaciones químicas conocidas, las auxinas y las citocininas, que podían estimular la división celular. Además, al manipular los niveles exógenos de KIN y auxina, pudieron fomentar el desarrollo del brote o de la raíz en los cultivos de callos.

Actualmente se conoce un gran número de especies en las cuales se puede fomentar la proliferación aleatoria de callos en los explantes, mediante la adición de una o varias citocininas y auxinas al medio básico; en consecuencia, se puede inducir la formación de brotes y raíces ajustando la relación auxinas:citocininas exógenas. Sin embargo, este procedimiento no es de ninguna manera universalmente efectivo; por ejemplo, en sistemas que normalmente no tienen una capacidad para la formación de yemas, las citocininas no inducen la diferenciación de las yemas y el crecimiento de novo.

En resumen, las citocininas no son morfogénicas respecto al brote en el sentido estricto; en contraposición, parecen tener efecto en la expresión de un compromiso determinado por otros factores, cualesquiera que éstos sean, en aquellos sistemas en que se promueve la formación de yemas adventicias.

En algunos casos el problema de la inducción de la morfogénesis es tal que, a pesar de la adición o manipulación de auxinas, citocininas, u otros componentes del medio de cultivo o del medio ambiente externo, los investigadores son incapaces de estimular la división celular o de obtener un verdadero callo. Sin embargo, en plantas de mayor respuesta, en las cuales no hay problemas para inducir y mantener el crecimiento del callo, se puede tratar de manipular la relación citocininas:auxinas, con lo que frecuentemente se inducen brotes o raíces (tal vez raíces con más frecuencia que brotes). Pero incluso en el tabaco, en el cual se desarrollan ambos órganos, en muy raras ocasiones se obtienen plántulas uniformes ya que generalmente no se forman estructuras bipolares o embrionarias.

Para quienes buscan la multiplicación de plantas de una manera estrictamente clonal, tal vez sea favorable que la ruta de la organogénesis indirecta no se comprenda bien, ya que ciertas evidencias sugieren que la formación de callos en estos sistemas constituye a menudo la base para obtener variación genética e inestabilidad. Muchos investigadores recomiendan por ello que se evite este procedimiento en el clonaje aséptico de plantas. Por otra parte, quienes buscan utilizar la organogénesis indirecta por la vía del callo como un medio para fomentar la variación somaclonal (ver Capítulo 22) y producir así un cambio deseado en el genotipo o el fenotipo (Earle y Demarly, 1983), se encuentran a veces restringidos por falta de conocimientos suficientes sobre la estimulación de la morfogénesis a partir de callos presumiblemente no diferenciados.

En algunos sistemas es posible estimular una modalidad de crecimiento que comprenda la ramificación axilar precoz; por ejemplo, puede ocurrir que el extremo cortado de un brote escindido produzca simultáneamente

una masa de callo con capacidad organogénica y brotes que se pueden remover y enraizar para multiplicar la planta. Si se trata o no de un sistema estrictamente clonal obtenido por ese medio —como lo sería en el caso de un sistema de ramificación axilar precoz que se promueve, extrae y enraiza— depende del sistema en cuestión.

En los casos en que se trabaja con el callo organogénico, el desarrollo de los brotes que emergen del área proliferada (por ejemplo, de la base de un explante de punta de brote) se puede mantener a una tasa constante removiéndolos mediante la excisión; esto se conoce como un sistema 'abierto'. Simplemente se mantiene un equilibrio que favorezca la formación continua de crecimientos que puedan organizarse en cultivos, con o sin un ajuste en el medio. A medida que se remueven estos brotes (con raíces o sin ellas) de la masa proliferante, y se transfieren al medio ambiente o a un medio diferente que conduzca a un nuevo o adicional desarrollo radical, crecen nuevas proliferaciones para remplazarlos.

Es obvio que si el sistema no se puede mantener abierto, se presenta un efecto de determinación y se forma un número finito de plantas. Aunque esto puede ser un obstáculo, la adopción de esta ruta de multiplicación sería perfectamente razonable en los casos en que sólo se desea obtener un número relativamente pequeño de plántulas clonales.

Embriogénesis somática

En el período comprendido entre mediados de los años 50 y finales de esa década fue posible obtener, mantener y hacer crecer células aisladas de plantas. A finales de los años 50 y a principios de los 60, un estudio adicional sobre el cultivo de estas células en suspensión en medio líquido mostró que, en algunos casos, tales células podían formar embriones somáticos capaces de desarrollarse en plantas, y que en este sentido se comportaban como embriones cigóticos. Los procedimientos permitieron desviarse de los procesos sexuales normales y produjeron posteriormente una población de plantas con las características de la planta original de la cual derivaba el explante primario.

El nivel de precisión con que el proceso de embriogénesis somática simula la embriogénesis cigótica puede variar considerablemente pero, en general, la simulación es considerable. La gran mayoría de los sistemas que forman embriones somáticos lo hacen mediante la llamada ruta indirecta. En las dicotiledóneas, por ejemplo, las células totipotentes siguen patrones de división que dan origen a proembriones, los cuales a su vez dan origen a

las etapas sucesivas de corazón, torpedo y cotiledonar; en las monocotiledóneas, en cambio, el curso de desarrollo progresa según el patrón cigótico normal, con la formación de un solo cotiledón.

La embriogénesis somática puede ocurrir por medio de la llamada ruta directa, pero con menor frecuencia que por la ruta indirecta; en el primer caso, las células del explante primario son la fuente de los embriones somáticos sin que haya una etapa de callo. Este hecho se podría describir mejor como una formación accidental del embrión, ya que evoca situaciones similares que ocurren en el cuerpo intacto de la planta in situ, como es el caso de la formación de un embrión nucelar en los cítricos.

En ciertos casos los embriones somáticos que se forman, ya sea directa o indirectamente, pueden seguir una modalidad de crecimiento que se describe mejor como gemación; en ella, los nuevos embriones somáticos se originan directamente de embriones somáticos preexistentes sin que intervenga una etapa de callo.

En diferentes especies vegetales ha sido posible obtener, a través de los años, el crecimiento exitoso de embriones somáticos hasta plantas enteras, como un procedimiento de laboratorio. Sin embargo, hasta el momento el número de especies así cultivadas ha sido relativamente bajo y sólo recientemente se han empezado a suministrar los medios que permitan competir con los métodos convencionales de propagación vegetativa.

Los procedimientos de embriogénesis somática no sólo son útiles para alcanzar una multiplicación práctica, sino que suministran posibilidades únicas para investigar: a) el estímulo que libera la totipotencialidad —que de otra manera estaría bloqueada— de las células maduras quiescentes según existan en el cuerpo de la planta intacta; y b) los factores que controlan la dirección y el ritmo del desarrollo posterior de la misma (Figuras 5.3 y 5.4).

Un objetivo permanente es aprender a controlar el desarrollo de las células somáticas que crecen aisladas del cuerpo de la planta, para que emulen perfectamente el comportamiento de los cigotos. Si esto fuese factible, no sólo se mejoraría el conocimiento sobre el desarrollo sino que se obtendrían los medios tan buscados para una propagación clonal masal en especies de plantas que generalmente no permiten este tipo de propagación. Ya que por definición los embriones se originan en células únicas, la clave para hacer realidad una verdadera ingeniería genética de plantas está casi por completo en aprender a manejar las células únicas, totipotentes, y los sistemas embriogénicos (Figura 5.5).

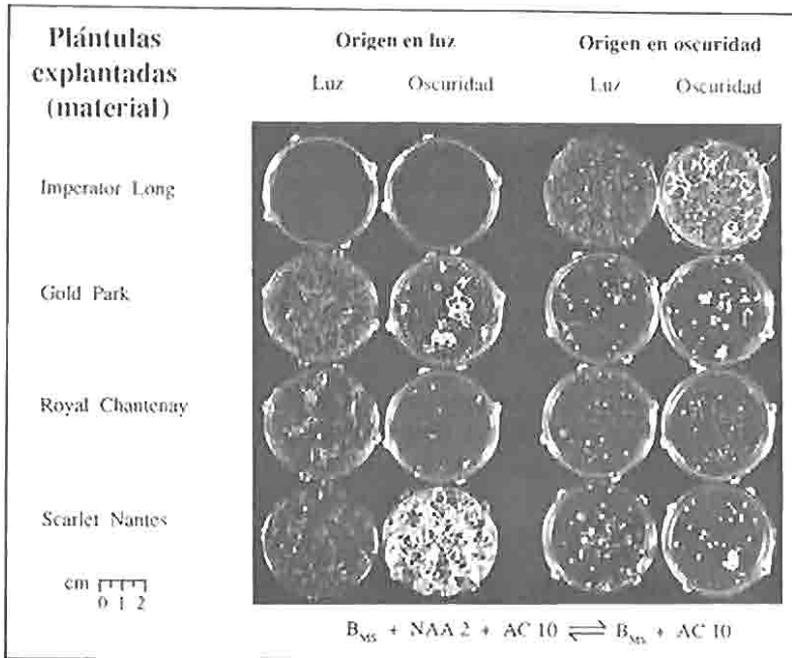


Figura 5.3. Variaciones encontradas en la sensibilidad morfogénica de grupos embriónicos de zanahoria (*Daucus carota*).

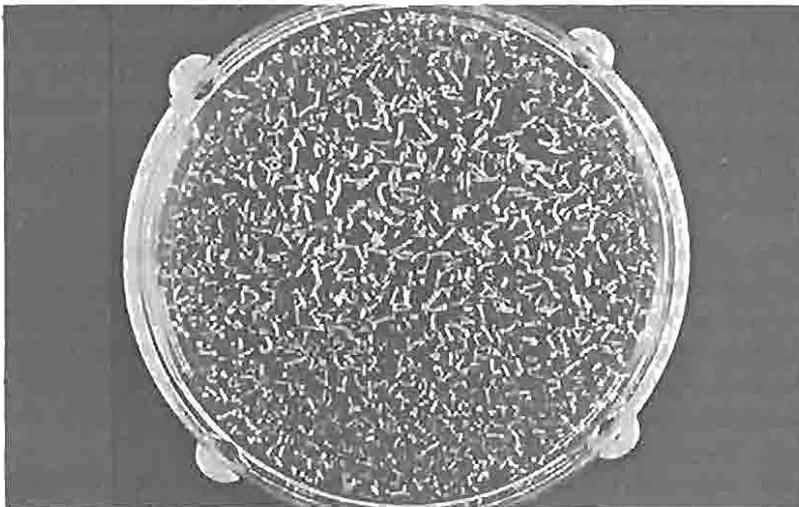


Figura 5.4. Detalle de la placa de la Figura 5.3 correspondiente a la variedad Scarlet Nantes.

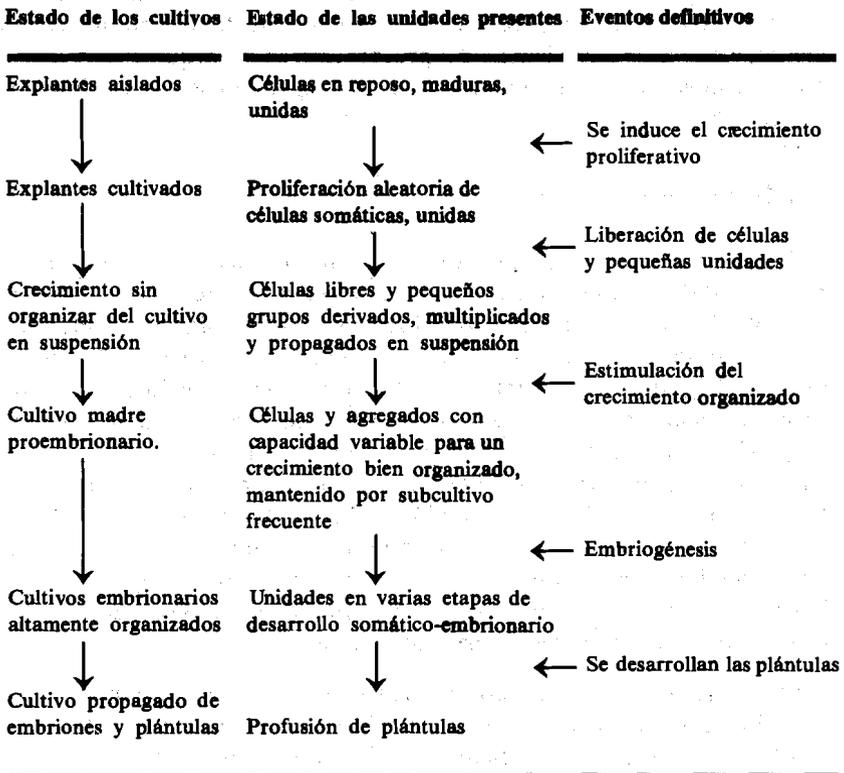


Figura 5.5. Esquema de regeneración de plantas a partir de células cultivadas asepticamente, en que aparecen secuencias del tipo de explante, del estado del cultivo, y del resultado del proceso.

Organos de perennidad formados en cultivos asepticos

Algunas especies producen órganos de perennidad in vitro y cuando esto ocurre, se cuenta con los medios para una multiplicación clonal a otro nivel; si esa característica es controlable, es posible realizar por este medio la siembra directa o el almacenamiento de germoplasma de ciertas plantas. Las papas pueden formar tubérculos en miniatura; los gladiolos pueden formar tallos bulbosos; en ciertos lirios, cebollas, narcisos, jacintos, en *Dioscorea*, etc. se han encontrado bulbillos; y, por supuesto, las orquídeas han producido protocormos.

Según los conocimientos del autor, ninguno de estos medios es tan controlable para ser adoptado seriamente como medio de multiplicación clonal, a diferencia del sistema del protocormo en las orquídeas. Aun así, esos órganos pueden suministrar otra estrategia en casos seleccionados (Cuadro 5.1).

Microinjertos

Existen muy pocos ejemplos sobre injertos de ápices de retoños que se hayan podido realizar con éxito, aunque seguramente en un futuro se presentarán más casos; en *Citrus*, los métodos de cultivo de ápices de retoños no han sido promisorios hasta el momento. Ya que la producción in vitro de embriones somáticos de tejido nucelar es análoga a lo que sucede en la naturaleza, se plantea otro problema principalmente porque las plántulas nucleares tienen una fase juvenil muy larga (10-15 años). Sin embargo, los procedimientos que involucra la utilización de injertos han sido muy útiles (ver Capítulos 8 y 9). La Figura 5.3 es un ejemplo de un 'experimento en placa' típico, donde se ensaya el potencial de organización que tienen los proembriones de los cultivares Emperor Long, Gold Pak, Royal Chantenay y Scarlet Nantes de zanahoria, los cuales se mantuvieron bajo condiciones variables de luz u oscuridad.

El experimento se inició con suspensiones celulares de explantes de plántulas cultivadas en un medio líquido (medio basal MS + AC 10% + ANA 2 mg/litro) bajo condiciones de luz y de oscuridad ('origen en luz' y 'origen en oscuridad', en la Figura 5.3). Los proembriones resultantes se colocaron en un medio semisólido (MS + AC 10%) y se dejaron desarrollar ya sea en la oscuridad o ya con luz.

El inóculo inicial está esparcido; en la Figura 5.3 se puede ver que el cultivar Emperor Long virtualmente no mostró proliferación bajo estas condiciones, mientras Scarlet Nantes presentó un fuerte potencial embrionario en la oscuridad, siempre y cuando los glóbulos proembrionarios se hubieran cultivado inicialmente con luz. Aunque estas placas muestran un experimento terminado a los 49 días, Scarlet Nantes desarrolló un gran número de embriones jóvenes después de un período de sólo 19 días en la oscuridad, como se observa en la Figura 5.4.

El hecho anterior recalca que las respuestas no son uniformes, incluso en el caso clásico de cultivos embriogénicos de zanahoria; sin embargo, el conocimiento previo a la selección permite averiguar si un sistema dado responderá o no, y determinar qué se puede utilizar como explante primario en la 'etapa 0'.