

## **Cultivo de tejido vegetal**

*Traducción del trabajo del Dr. W.M. Morgan, del International Plant Laboratories, Baltonsbrough, UK.*

El cultivo de tejido vegetal fue desarrollado a partir de la investigación de botánicos y fisiólogos vegetales desde 1950. Actualmente se ha convertido en una herramienta internacional importante en la selección, cruzamiento, control de enfermedades y producción en masa de cultivos de cosecha e involucra diferentes plantas en agricultura, horticultura, forestales y frutales.

La ciencia del cultivo de tejidos vegetales debe su origen a la investigación sobre hormonas que controlan el crecimiento y desarrollo vegetal. Este conocimiento se combinó con las técnicas básicas de microbiología por las cuales los microorganismos se hacen crecer en medios estériles para la producción de microorganismos e identificación. Desde estas dos fuentes provino la tecnología por la cual las plantas u órganos de plantas se pueden multiplicar en gran número, o su crecimiento individual controlado, haciendo crecer pequeños trozos de tejido vegetal sobre una receta precisa de nutrientes en un recipiente estéril.

A su escala mayor, como ocurre en la industria de la micropropagación, el cultivo de tejido se ha convertido en un proceso de manufactura que puede producir material vegetal libre o saneado de patógenos, de alta calidad, que puede atravesar fronteras internacionales.

Sobre un enfoque más técnico, esta metodología ha provisto a la industria de cruzamiento, de las metodologías apropiadas para generar, almacenar o manipular germoplasma de valor o genéticamente inestable sobre su camino a través del proceso de cruzamiento, donde el vehículo eventual para la propagación será la semilla.

### **Qué es el cultivo de tejido vegetal?**

El punto de partida para el cultivo de tejidos es la iniciación. Este es el proceso por el cual se trae material vegetal *in vivo* en un medio de cultivo estéril. Requiere la disección microscópica de la planta bajo condiciones estrictamente higiénicas con el propósito de transferir su punto de crecimiento o tejido que crece activamente (los tejidos meristemáticos) con seguridad y limpieza dentro de un recipiente estéril sin introducir microorganismos contaminantes. Las células y tejidos que crecerán y se desarrollarán desde este inicio dependerá de los objetivos del cultivo de tejidos. En algunos casos las células conformarán una masa aparentemente desorganizada, conocida como callo, en otros estarán presentes otras estructuras reconocibles como tallos, órganos, raíces, bulbos u otros órganos.

Estos tejidos *in vitro* están ahora dentro de un microcosmos estéril de un recipiente de vidrio o de plástico; y son protegidos del medio exterior no estéril.

Es esencial mantener la esterilidad del medio ambiente confinado en el recipiente, debido a que cualquier microorganismo que se gane la entrada al mismo crecerá oportunísticamente a una velocidad mucho más rápida que los tejidos vegetales y eventualmente colonizarán y matarán a los tejidos.

Con el propósito de sostener el vigor de los tejidos vegetales y permitir que ellos crezcan, se multipliquen y desarrollen, esto es cultivar los tejidos, deben darse además ciertos requerimientos externos. Los tejidos pueden necesitar que se los apoye o sean colocados sobre o en el interior de la superficie de un gel acuoso solidificado con agar o ellos pueden colocarse en un medio líquido. Ellos también necesitarán de un suministro de los elementos minerales nutritivos que son esenciales para el crecimiento vegetal, también posiblemente algunas vitaminas, azúcares como fuente de energía y un cocktail de hormonas vegetales que se conoce que controlan el crecimiento y desarrollo de estos tejidos particulares. Es conveniente preparar este medio ambiente nutricional incorporando estos compuestos químicos dentro del gel o líquido, ajustando el pH alrededor de 6 y esterilizando este medio de cultivo ya sea dentro del recipiente para cultivo o en uno separado.

Para el correcto crecimiento y desarrollo del tejido en cultivo en general es necesario el suministro de luz, pero a intensidades muy bajas, mucho más que la de la luz solar. La acumulación en las plantas de la

energía de los carbohidratos provendrá de los azúcares agregados al medio, más que de la fotosíntesis, de manera que son innecesarios unos altos niveles de luz.

Una temperatura controlada también es necesaria para estabilizar el crecimiento y mejorar la predictibilidad del desarrollo de los tejidos.

### **Facilidades requeridas para el cultivo de tejido**

Ciertas facilidades son requeridas para que el cultivo de tejidos sea efectivo. Están involucradas dos fases de actividad

1. El laboratorio - una habitación limpia conteniendo un número de estaciones de trabajo, cada una proveyendo aire filtrado - gabinetes de flujo de aire laminar estéril- en los cuales el material puede ser manejado sin riesgos de contaminación por el operador y transferido en forma segura a medios nutritivos frescos. Esta transferencia es el paso de manufactura individual en el cual los tejidos que crecieron previamente en medio de cultivo son manipulados y subdivididos con escalpelo y pinzas dentro del medio ambiente estéril del gabinete de flujo laminar, de manera de transferirlos a nuevo medio de cultivo y un nuevo recipiente para posterior crecimiento, multiplicación o desarrollo, y

2. El cuarto de crecimiento - una habitación iluminada, con aire acondicionado y con alto estándar de higiene en el cual los cultivos de tejidos pueden crecer y desarrollarse en forma segura por períodos de semanas o meses. Un régimen de iluminación y temperatura óptimos requiere un suministro de electricidad confiable y adecuado, ya que cada planta producida puede consumir unos 0,5 kW de energía.

### **Propagación de material vegetal por cultivo de tejido**

En los años 60s se reconoció lo que el cultivo de tejido podía ofrecer a la horticultura y la agricultura y esto proveyó un estímulo para la evolución de la tecnología. Particularmente los beneficios aparecían en aquellas especies de cosecha donde existían algunos problemas de propagación. Por ejemplo, donde la producción de semillas es limitada, o las semillas no originan plantas veraces al tipo, o la propagación por medio de bulbos, tubérculos o esquejes es muy baja. La habilidad del cultivo de tejido para acelerar la multiplicación de líneas nuevas obtenidas por cruzamiento acelera su evaluación, y las puede colocar rápidamente en mercado. Este fue un avance radical para los mejoradores de estas cosechas.

Además, donde hay una necesidad por un reemplazo rápido o anual con material sano nuevo en una escala confiable de tiempo.

Hoy día, hay muchas especies donde el cultivo de tejidos se ha vuelto un método regular y establecido de propagación, por ej. para la papa, dátiles, banana, un amplio rango de cultivos para flor cortada y numerosas plantas ornamentales de maceta.

El mayor beneficio del cultivo de tejido en la propagación de plantas es el dramático acortamiento del tiempo de producción. Por ejemplo, la papa se puede multiplicar convencionalmente por medio de tubérculos crecidos a campo en aproximadamente un factor de 10 por año, pero en cultivo de tejido puede hacerlo por un factor de 5 por mes, lo cual equivale a 1/4 de billón por año.

### **Técnicas usadas en la micropropagación**

La estimulación de las yemas axilares o adventicias es el proceso más común que se conoce para la micropropagación de las plantas. Aquí, las citocininas causan una generación continua de estas yemas en la base del cultivo que prolifera. Cada yema desarrolla en un tallo enanizado el cual a su vez puede producir más yemas en su base. Esta proliferación de tallos y yemas continuará siempre que sea mantenido un suministro adecuado de citocinina junto con nutrientes y espacio físico por subdivisión de los cultivos y transferencia de los mismos a medio fresco cuando sea necesario.

Alternativamente, el tallo puede separarse del suministro de esta hormona, la cual tiende a suprimir la formación de raíces, y ser transferido a medio nuevo conteniendo una hormona del grupo de auxinas, la cual estimulará el desarrollo radicular en la base del tallo.

Tales tallos enraizados pueden transferirse luego afuera del ambiente estéril del cultivo de tejido y, con cuidadoso control de humedad y luz, ser aclimatada para volverse una planta que crece convencionalmente en forma dependiente de la fotosíntesis.

La embriogénesis es otro método que puede usarse para propagar las plantas en masa. Como indica su nombre, esta técnica causa que se formen embriones generados desde el tejido en cultivo, proceso que por otra parte sólo ocurre en la formación de una semilla. Bajo el control de ciertas mezclas hormonales se forman los embriones dentro de una masa aparentemente desorganizada de un callo, en el cual nódulos de células comienzan a desarrollarse en forma que recuerda la estructura de un embrión de semilla. Si estos embriones se trasladan a otros medios, desde los callos, medios que están diseñados para permitir que el embrión germine, entonces desarrollará una estructura de planta completa, esto es una plántula, un talluelo enraizado que no difiere mayormente de la obtenida desde semilla. Como las plantas obtenidas por caulogénesis axilar o adventicia, estas plántulas también pueden aclimatarse para transformarse en una planta viable con capacidad de fotosíntesis.

### **El uso de cultivo de tejidos vegetales en la lucha contra enfermedades**

Los virus y otros patógenos que invaden los tejidos vegetales en forma sistemática, pueden ser muy dañinos para la eventual producción o calidad de la cosecha, como ocurre por ejemplo en papas y crisantemos. Las enfermedades virales son difíciles de controlar efectivamente, porque a menudo es difícil diagnosticar que una planta está infectada y la pérdida en la producción puede ser la primera indicación y no hay productos químicos que a campo puedan controlar la infección.

El cultivo de tejidos ofrece un número de ventajas para la prevención de virus vegetales. El cultivo de los vegetales que es iniciado dentro de cultivo puede ser ensayado por métodos serológicos específicos por la presencia de virus conocidos. Así, la iniciación de plantas libres de virus puede ser asegurada.

Estos cultivos tipificados por ausencia de virus podrán luego propagarse rápidamente en cultivo de tejido por distribución de nuevos stocks sin el temor de propagar virus que podrían haber estado incluidos en las plantas. Durante esta rápida propagación en cultivo no hay riesgo de una reinfección con virus lo cual podría ser posible durante la propagación de nuevos stocks saludables en el campo o en el invernadero.

Si, por otro lado, se encuentra que una planta de valor que no puede reemplazarse contiene virus, el cultivo de tejido ofrece otra solución, la eliminación del virus por cultivo de meristema. El pequeño número de células que rodea el punto de crecimiento o meristema de la planta generalmente crece muy rápido de manera que es poco probable que esté infectada con el virus. Y si una pequeña pieza de tejido conteniendo el meristema es cortada con sumo cuidado y colocada en un medio de cultivo, luego después de algunos meses para la recuperación y crecimiento del tejido, puede aparecer un nuevo cultivo libre de virus.

### **El cultivo de tejido viene a asistir a los mejoradores**

Numerosos procesos y manipulaciones son llevados a cabo sobre las plantas en cultivo de tejido. Están desarrollándose constantemente nuevas técnicas y es definitivamente difícil resumirlas.

La propagación por cultivo de tejidos normalmente intenta preservar y copiar fehacientemente la identidad exacta de una línea varietal de plantas. Sin embargo, ligeras variaciones existen entre la identidad genética de células individuales dentro de los tejidos. Esta variación somaclonal, que siempre está presente y es una amenaza a la estabilidad en la micropropagación, puede ser útil para el mejorador vegetal debido a que puede representar formas latentes y noveles de la planta.

Las modificaciones de los procesos en cultivo de tejidos se han desarrollado para estimular el crecimiento y selección de nuevas líneas de cultivos de tejidos que puedan revelar características mejoradas después de la selección en el campo o invernadero.

El cultivo de protoplastos es otro método desde donde se puede originar variación somaclonal para el desarrollo de nuevos tipos de plantas. Los protoplastos son células vegetales a las cuales se les ha

removido la pared celular rígida. Se han desarrollado técnicas especiales con la finalidad de liberar protoplastos desnudos desde los confines de sus paredes y permitir que cada protoplasto individual pueda regenerar en cultivo de tejido hacia una planta.

La hibridación somática es una técnica que puede permitir que diferentes especies de la misma familia sean cruzadas. Esto es usualmente imposible siguiendo el proceso normal de regeneración sexual de las plantas. Estableciendo cultivos de protoplastos de cada especie, los cultivos pueden ser mezclados y algunos protoplastos de cada especie se fusionarán al azar. Por una cuidadosa selección y cultivo, se podrán regenerar plántulas desde estos protoplastos híbridos y ser ensayados por características deseables *in vivo*.

El rescate de embriones es un proceso de laboratorio por el cual un huevo fertilizado o un embrión puede removerse desde una planta y hacerse crecer y desarrollar en cultivo de tejido estéril hasta que pueda crecer en forma segura o sin ayuda. El huevo fertilizado usualmente proviene de genitores de valor donde el embrión falla en desarrollarse normalmente en la planta. Esto es de ayuda para el mejorador pues lo asiste en las cruza entre subespecies en las cuales pueden haber evolucionado barreras naturales para la cruza. Ha sido particularmente útil para el mejoramiento en azucenas.

Los bancos de germoplasmas pueden ser maneras útiles de almacenar material vegetal, semillas o cultivos de tejidos, los cuales tienen características reconocidas y de valor y por esto merecen un control adecuado y seguridad de mantenimiento. Los biólogos moleculares involucrados en ingeniería genética pueden mantener una colección de plantas en la forma de cultivo de tejidos, los cuales poseen características heredables identificables (genes) que pueden ser de utilidad para insertarlas en los genes de otras plantas. Esto es de utilidad a los mejoradores para lograr nuevas variedades de cultivos.

El cultivo de tejidos es una técnica de un enorme potencial, tanto en investigación como en el desarrollo y en la producción de cosecha. En muchos sentidos aún está operando en manera muy cruda, y cada año encuentra nueva sofisticación y conocimiento aplicado. La principal limitación es nuestro pobre entendimiento de cómo funcionan las hormonas vegetales, las cuales tienen un rol central en esta tecnología, y el alto costo de los procesos que requieren además una cuidadosa y entrenada mano de obra. Estas limitaciones podrán hallar salida en la respuesta que puedan brindar tanto los fisiólogos vegetales que trabajan en el campo hormonal como los ingenieros que trabajan en la mecanización de los procesos.

