

MICROPROPAGACIÓN VEGETAL

L. MARTÍNEZ NÚÑEZ & J. GAGO MARIÑO

lmartinez@uvigo.es, jmarino@uvigo.es

Alumnos de tercer ciclo, laboratorio de Biotecnología Vexetal (2007-2008).

Universidade de Vigo. Profesor: Pedro Pablo Gallego Veigas.

Resumen: La micropropagación es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, en la cual, a partir de un fragmento (explanto) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. En este trabajo se describe de forma general el proceso de micropropagación, sus diferentes etapas, sus dificultades, sus ventajas y las perspectivas de futuro.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, biotecnología vegetal, propagación, mejora genética.

Resumo: A micropropagación é unha das aplicacións máis xeralizadas do cultivo *in vitro*, na cal, a partir dun fragmento (explanto) dunha planta nai, obtéñese unha descendencia uniforme, con plantas xenéticamente idénticas, denominadas clons. Neste traballo descríbese de forma xeral o proceso de micropropagación, as súas diferentes etapas, as súas dificultades, as súas vantaxes e as perspectivas do futuro.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, biotecnología vexetal, propagación, mellora xenética

INTRODUCCIÓN

Las plantas superiores pueden propagarse o reproducirse de forma sexual y/o asexual, dependiendo de su estado evolutivo. Si se emplea la propagación sexual las nuevas plantas surgen de la fusión de gametos parentales, dando lugar a embriones (semillas) que representan una nueva combinación de genes y por ello diferentes genéticamente de sus progenitores. Por el contrario, la reproducción asexual implica la formación de las nuevas plantas a partir de células somáticas, y por tanto con idéntica composición genética, denominándose clones (Hartman y Kester, 1980), (Fig. 1).

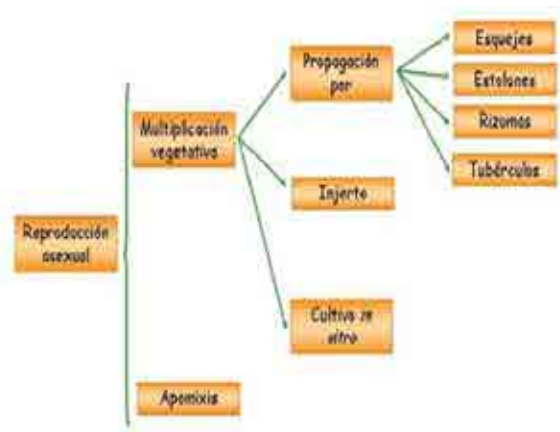


Fig. 1. Esquema que muestra las diferentes formas de la reproducción asexual.

El término clon fue aplicado por primera vez en 1903 por H. J. Webber para definir a las plantas que se propagaban vegetativamente. El código oficial de nomenclatura de las plantas cultivadas define clon como “el conjunto genéticamente uniforme de individuos (que pueden ser de naturaleza quimérica) originalmente derivados de un solo individuo mediante propagación asexual”.

La agricultura actual se basa en el cultivo de un número muy limitado de especies, que

presentan una variación genética reducida en comparación con las especies silvestres de las que proceden. Esto provoca que sean más vulnerables a las enfermedades y limita su potencial de mejora. La biotecnología, y más concretamente la micropropagación, puede ayudar a conseguir una mayor productividad, ya que permite la obtención de plantas resistentes a patógenos, como hongos, virus y artrópodos, que atacan a las cosechas.

CULTIVO IN VITRO

El concepto original de cultivo de tejidos vegetales se ha extendido para abarcar tanto el cultivo aséptico de tejidos como el de células y órganos, dentro de un grupo de técnicas que se fundamentan en varios principios. Entre estos principios, los más importantes son la totipotencialidad celular, propuesta por Haberlandt (1902), “todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas”; y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog et al. (1975), (Fig. 2).

Las técnicas de cultivo *in vitro* han contribui-



Fig. 2. G. Haberlandt y F. Skoog

do a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular y a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas (Debergh y Zimmerman, 1991). Así surgen diferentes

usos de las técnicas de cultivo *in vitro*:

- Micropropagación
- Obtención de plantas libres de virus y patógenos
- Conservación de germoplasma
- Mejora genética

El término micropropagación se definió por primera vez en 1986 como “cualquier proceso aséptico que comprenda la manipulación en las plantas de sus órganos, de sus tejidos o de sus células y que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente”. De una forma más genérica se puede definir como la “propagación de genotipos seleccionados usando técnicas de cultivo *in vitro*”.

Las técnicas de cultivo *in vitro* que teóricamente se pueden emplear en la micropropagación se dividen en:

- Micropropagación axilar: a partir de yemas axilares se forman directamente vástagos.
- Micropropagación adventicia: mediante la formación de vástagos adventicios y/o de embriones somáticos. Este tipo de micropropagación se puede dividir en:

Directa: multiplicación a partir de piezas de tejidos u órganos (explantos) obtenidos directamente de la planta madre, es decir, en ausencia de proliferación de callo (masa celular sin diferenciación aparente).

Indirecta: en la que la formación de callo es un paso previo al desarrollo de estructuras organizadas: vástagos y/o embriones.

ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN.

En la actualidad se sugieren cinco etapas que se numeran desde la etapa 0 hasta la IV, en cada una de ellas los objetivos están per-

fectamente definidos.

Etapa 0. Selección del material vegetal.

En esta fase se incluyen los tratamientos, preparación y selección de las plantas madre a partir de las cuales se inicia la micropropagación, siendo imprescindible comprobar la identidad (especie, variedad o cultivar) y su estado de salubridad (libre de patógenos, deficiencias o estrés).

Etapa I. Iniciación del cultivo.

Una vez seleccionadas las plantas (aquellas que posean unas características fenotípicas deseadas) se requiere desinfectar superficialmente el material escogido para evitar que en el medio de cultivo crezcan microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explanto (Fig. 3).

La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan inicialmente por las características del explanto; en la práctica tienen que ser establecidas de forma exacta mediante el método de ensayo y error.

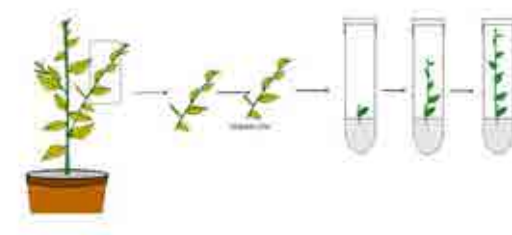


Fig. 3. Etapa I de la micropropagación.

Etapa II. Multiplicación.

El objetivo de esta fase es inducir la multiplicación de los explantos mediante la formación de nuevas estructuras a través de la vía elegida (axilar o adventicia, embriogenética, etc.). En esta fase se producen nuevos brotes o propágulos que cuando son separados del

cultivo son capaces de formar una planta, pudiendo usarse como el inicio de otro ciclo de multiplicación con el fin de aumentar su número (Fig. 4).

Etapa III. Inducción y desarrollo de raíces

En esta fase se produce la formación de raíces adventicias. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso se transfieren los brotes obtenidos en la etapa anterior a un medio libre de reguladores de crecimiento o que sólo

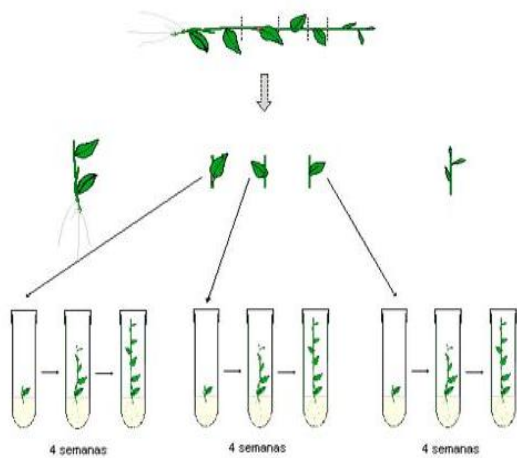


Fig. 4. Etapa II de la micropropagación.

contenga auxinas. Esta operación se realiza en condiciones de esterilidad (en cabina de flujo). En el segundo caso los brotes se sumergen en una solución concentrada de auxinas y se transfieren a un sustrato limpio, no necesariamente estéril, que puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita. Los brotes que se utilicen en el enraizamiento *ex vitro* deben ser vigorosos y poseer hojas bien desarrolladas, ya que las plantas deben realizar la fotosíntesis para obtener la energía necesaria para desarrollarse y formar las raíces.

El enraizamiento *ex vitro* permite que la fase de enraizamiento y la fase de aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base alta de los explantos,

asegurando así una conexión vascular, continua entre el vástago y la raíz. En la actualidad esta técnica permite reducir entre un 35 y 75% los costes totales de la micropropagación (Kane, 2005), lo que la convierte en altamente deseable para la industria dedicada a la producción de plantas.

Etapa IV. Aclimatación.

Las plantas cultivadas en condiciones *in vitro* poseen habitualmente estomas no funcionales y cutículas poco desarrolladas debido a la alta humedad relativa en el interior del frasco de cultivo y a la escasa realización de la fotosíntesis. Bajo las condiciones de cultivo *in vitro* los explantos son mixotróficos, casi no fotosintetizan y su necesidad de carbono orgánico lo suplen con los azúcares añadidos al medio. Por tanto, antes de transferirlas a las condiciones externas deben sufrir un proceso de acondicionamiento gradual: protección a la luz y control de la transpiración estomática y cuticular (Fig. 5).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN.

Existen diferentes factores que determinan el éxito en la micropropagación, los más importantes son los siguientes:

Planta que dona el explanto.

El estado fisiológico de la planta madre influ-

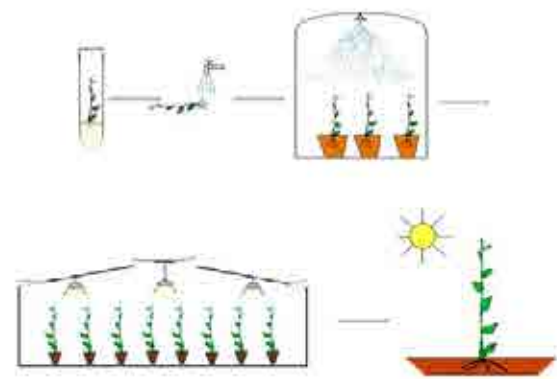


Fig. 5. Etapa IV de la micropropagación y transferencia a campo.

ye significativamente en la capacidad morfo-genética del explanto. Asimismo, se ha observado que la edad fisiológica del explanto tiene gran influencia en la morfogénesis, cuanto más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro*. La posición relativa de las yemas es otro factor importante. Se ha observado en algunas especies que las yemas axilares obtenidas de la parte media del tallo se desarrollan más rápidamente que aquellas obtenidas de la base o de la porción apical. Sin embargo, en otras especies las yemas apicales son las únicas que producen plantas *in vitro*.

El explanto.

Generalmente, la selección del explanto se hace teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta. Así, si las plantas que se van a micropropagar se reproducen por semilla, las partes embrionarias son las fuentes más comunes de explantos; las semillas pueden ser desinfectadas superficialmente y germinar en condiciones de asepsia. Este método se usa en coníferas y otras especies maderables. En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos son, generalmente, la fuente de los explantos (Roca y Mroginski, 1991).

Factores físicos.

La temperatura a la que está expuesto el explanto cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar. En general, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. Este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que procede el explanto, del fotoperiodo, etc. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría

de las familias fluctúa entre los 24 y 28°C.

El control de la temperatura no es solamente importante porque pueda afectar al crecimiento del cultivo sino también porque puede ser un factor que induzca determinados procesos fisiológicos. Así, temperaturas bajas (del orden de 4-5°C) permiten superar los periodos de dormición de algunas leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos *in vitro*; mientras que una temperatura constante de 20°C induce la formación de raíces en la mayoría de coníferas.

La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*. Se asume que las necesidades de luz en cultivo *in vitro* son inferiores de las plantas *in vivo*, dado que las plantas *in vitro* sólo son parcialmente autótrofas (utilizan como fuente de carbono los azúcares añadidos al medio, realizando por tanto una fotosíntesis muy reducida).

Medio de cultivo.

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua (Tabla 1, Fig. 6). A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y con otras sustancias. Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y de la respuesta que se desea obtener. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones diferentes para los medios de cultivo.

El control del pH inicial del medio y de su dinámica durante el cultivo tiene una gran importancia, ya que su valor puede afectar a

la absorción de determinados nutrientes por parte del explanto y puede afectar al pH del citoplasma, y como consecuencia a la actividad de muchos enzimas.

INCONVENIENTES Y VENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN.

Las desventajas de la micropropagación son

Sustancias orgánicas	Macro	Micro
	elementos	
Azúcares Aminoácidos Auxinas Citoquininas Giberelinas Acido abscísico	N P K Ca Mg S	Fe Zn B Mn Cu Ni Co Al Mo I
Mezclas de sustancias poco definidas: Extracto de levadura Leche de coco Extractos vegetales Hidrolizados de caseína Peptona y triptona.		

Tabla 1. Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales.

las mismas que las derivadas de la tecnología del cultivo *in vitro*, de las que se pueden destacar la necesidad de personal especializado, la construcción y mantenimiento de costosas instalaciones especializadas, y los cuidados rigurosos para evitar riesgos de contaminación. A esto se une también la ausencia de

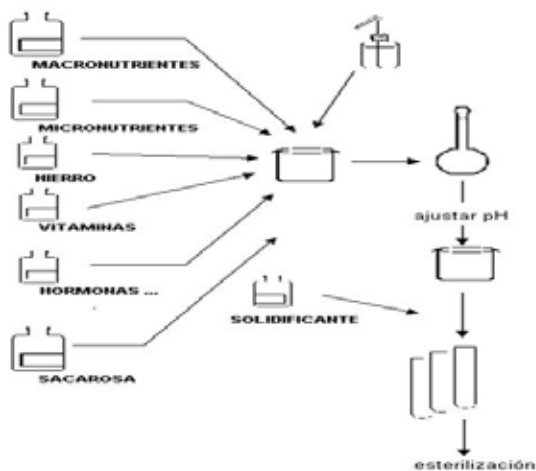


Fig. 6. Diagrama que muestra la preparación de un medio de cultivo a partir de soluciones stock.

protocolos de micropropagación universales y por tanto es necesario definir protocolos para cada especie y cultivar. Por otro lado, los microtallos originados del cultivo *in vitro* pueden mostrar morfologías o fisiologías extrañas denominadas con el término “vitrificación”.

La micropropagación presenta una serie de ventajas con respecto a los métodos tradicionales. Se necesita solamente la utilización de explantos de pequeño tamaño para iniciar y mantener el cultivo; se pueden crear y seleccionar nuevas variedades; la técnica permite una rápida multiplicación del cultivar seleccionado, con ahorro en tiempo y costes respecto a los métodos convencionales de macropropagación. Además, la producción de plantas es continua a lo largo de todo el año permitiendo ajustar los factores que influyen en la regeneración vegetativa, como los niveles de nutrientes y de reguladores del crecimiento, así como la luz y la temperatura (Krikorian, 1991).

Asimismo, estos métodos de cultivo sirven como base para la aplicación de técnicas de mejora genética con el objetivo de introducir nuevas características que permitan una mejor adaptación a las condiciones de cultivo y/o aumento de la producción. En el caso de existir algún tipo de enfermedad que afecte al cultivo permite también el saneamiento de plantas por la eliminación de enfermedades, en particular víricas.

FUTURO Y PERSPECTIVAS DE LA MICROPROPAGACIÓN.

Se estima que la población mundial superará los ocho mil millones de personas en el año 2030. En un mundo donde la superficie cultivable ha llegado al máximo posible y dónde la producción y la distribución de los alimentos

son un problema universal, se deben mejorar todas las condiciones relacionadas con la productividad de los cultivos (Vega y col., 2004). El incremento de la población superará el incremento de la producción agrícola; en este contexto, la mejora a través de la biotecnología vegetal es una necesidad. La biotecnología, y más concretamente la micropropagación, puede ayudar a conseguir una mayor productividad, permitiendo mejorar en diversos aspectos el rendimiento agrícola.

BIBLIOGRAFÍA

DEBERGH P. C. & ZIMMERMAN R. H. (1991). *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London.

HARTMANN H. T. & KESTER D. E. (1980). *Propagación de plantas: principios y prácticas*. Ed. Compañía editorial continental S.A., de C.V. México.

KANE M. E. (2005). *Shoot Culture Procedures*. En: R. N. Trigiano y D. J. Gray (eds), *Plant Development and Biotechnology*.

CRC press, Florida, p. 145- 158

KRIKORIAN, A. D. (1991). *Propagación clonal in vitro*. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical 6: 127-143.

PÉREZ DE LA VEGA, M., NUEZ, F., CARRILLO, J. M. (2004). *Resistencia genética a patógenos vegetales*. En: *La resistencia genética a patógenos vegetales y la mejora vegetal*. Soc. Española de Ciencias Hortícolas. Soc. Española de Genética. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. 1:3-39.

ROCA W. M., MROGINSKI L. A. 1991, *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.

WEBBER H. J. (1903). *New horticultural and agricultural terms*. Science 28: 501-503.

Imágenes obtenidas de: ANA MARÍA PELACHO AJA & LLUÍS MARTÍN CLOSAS, 2008. El libro electrónico del Cultivo in vitro.