

Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo

Ing.Agr. Alicia Castillo, MSc
Investigadora, Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas. Haberlandt, un científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. Sin embargo, este investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran los medios de cultivo actuales todavía no habían sido descubiertos. Sería recién en la década del '50 cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad.

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino con solamente una parte del mismo, se utiliza el término explante para indicar la parte del órgano ó tejido vegetal que se cultiva *in vitro*. A la dificultad de reproducir las condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se debe añadir en este caso la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo. En resumen, el cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Conviene, por tanto, conocer cuales son los principales factores que conforman dicho y que deberán ser controlados.

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento,

azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo *in vitro* , incluyendo:

- Ambiente químico
 - Composición del medio de cultivo
 - pH
- Ambiente físico
 - temperatura
 - luz y fotoperíodo
 - humedad

Dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases o etapas:

- 0: Selección y Preparación de la planta madre
- 1: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas
- 2: introducción del material seleccionado *in vitro*
- 3: Multiplicación de brotes
- 4: Enraizamiento
- 5: Aclimatación

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro* ; puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas, pero en términos generales son comunes al proceso de propagación *in vitro* .

FASE 0:

PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

FASE 1:

DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia.

A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluída durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada.

FASE 2:

INTRODUCCIÓN DEL MATERIAL IN VITRO

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

FASE 3:

MULTIPLICACIÓN DE LOS BROTES

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

FASE 4:

ELECCIÓN DE UN MEDIO DE ENRAIZAMIENTO DE LOS EXPLANTOS

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

FASE 5:

ACLIMATACIÓN DE LOS EXPLANTOS ENRAIZADOS

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

La siguiente lista presenta una comparación de las características de una planta en condiciones de laboratorio (*in vitro*) respecto a una planta en condiciones naturales (*in vivo*):

In vitro

- No realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones controladas
- Crecimiento en condiciones de asepsia
- Alta humedad relativa
- Estomas no funcionales
- Ausencia de pelos radiculares
- Ausencia de cera en la cutícula

In vivo

- Realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones no controladas
- Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente
- Humedad relativa variable
- Estomas funcionales
- Presencia de pelos radiculares
- Presencia de cera en la cutícula

Los plantines enraizados, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estos plantines se plantarán en contenedores (almacigueras) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz quemado, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando.

Luego de retirar cuidadosamente el agar de las raíces para evitar dañarlas, los plantines se enjuagan y se colocan en almacigueras con la mezcla de sustratos seleccionada y cubiertos con nylon. Todos los días se debe controlar el nivel de humedad en las almacigueras. Si es necesario, se aplica un riego con una pulverizadora manual, para mantener un ambiente húmedo a nivel del sustrato. A los 15 días del trasplante, se puede comenzar a levantar la cobertura de nylon en las horas de menor calor (temprano en la mañana o en la última hora de la tarde). Al comienzo las plantas se dejan media hora por día destapadas. A la semana siguiente se dejan destapadas durante una hora. Al mes del trasplante, se dejan tapadas durante la noche y si hay crecimiento de nuevas hojas, las plantas pueden permanecer destapadas. Las condiciones del cultivo *in vitro*, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia.

Desde el año 1991, el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Unidad de Biotecnología de INIA, localizado en la Estación Experimental "Las Brujas", ha estado trabajando en el ajuste de sistemas de multiplicación *in vitro* para diversas especies. El objetivo de estos trabajos de investigación es incorporar la micropropagación, como herramienta a los programas de mejora genética de INIA, en diferentes especies para acelerar y optimizar los procesos de evaluación a campo. Las especies vegetales estudiadas han sido: papa, boniato, ajo, frutilla, manzano, ciruelo, duraznero, peral, vid, frambuesa, zarzamora, arándanos, eucaliptos, marcela, especies aromáticas, especies forrajeras y otras.

A través de la propagación *in vitro* se ha podido disponer de material vegetal en diversas especies para su evaluación rápida. En especies como papa y frutilla, esta técnica está incorporada al esquema de selección y propagación del programa nacional de mejoramiento de hortalizas, todos los años se introducen clones de

interés, obtenidos a partir de cruzamientos controlados. La multiplicación *in vitro*, permite la obtención de material con condiciones de sanidad superiores a los obtenidos por vía convencional. Las especies leñosas como los frutales de hoja caduca y especies forestales, en general necesitan medios de cultivo más complejos, la respuesta a las condiciones de cultivo resulta más lenta que en las especies herbáceas. A pesar de las dificultades que plantean, se ha desarrollado y adaptado mucha experiencia para varios materiales, principalmente en portainjertos de diversas especies de frutales.

Desde el año 2001 se están llevando a cabo diversos convenios de vinculación tecnológica con empresas e instituciones que agrupan a productores, obteniéndose resultados experimentales, a escala piloto de producción, muy importantes tanto para el avance de los proyectos de investigación como para el desarrollo de nuevas capacidades productivas, utilizando biotecnologías, en los sectores viveristas y semilleros. A principios del año 2004 se estableció el primer sistema de franquicia para utilizar a escala comercial un protocolo de propagación *in vitro* de plantas de arándanos, como forma de apoyar la transferencia del paquete tecnológico ajustado por INIA hacia los laboratorios comerciales uruguayos. Con este mecanismo se ha buscado armonizar la demanda de plantas por parte de los productores interesados en este nuevo rubro y el interés de laboratorios comerciales y viveristas por ampliar los productos con calidad verificable que son ofrecidos a través de sus procesos de multiplicación de plantas.

AR-VITRO®: desarrollo de un sistema de multiplicación *in vitro* y aclimatación de arándanos.

Como se expresó anteriormente, INIA tiene entre sus objetivos programáticos impulsar la aplicación de tecnologías para la propagación de variedades de importancia económica para el sector horti-frutícola, en cumplimiento de su misión de contribuir al sector agropecuario uruguayo mediante la generación, incorporación y adaptación de conocimiento y tecnología. El arándano es una especie de potencial exportador que se perfila como una alternativa viable de producción no tradicional en Uruguay. Sin embargo, de esta especie apenas existían unos pocos ejemplares cultivados en Uruguay, representando un pequeño número de variedades. A partir de las colecciones introducidas desde Chile y EEUU, se desarrolló un sistema de multiplicación *in vitro* para obtener un número de plantas que permitiera la evaluación de las variedades en las condiciones de suelo y clima de Uruguay.

Como respuesta tecnológica se ha evaluado diferentes alternativas para aumentar la disponibilidad de plantas a muy corto plazo, lo que es imposible de obtener en nuestro medio con métodos convencionales (propagación por estacas), pero sí es posible mediante el cultivo "*in vitro*". Respondiendo a la creciente demanda de plantas por parte de viveristas y productores, se impulsó la transferencia de tecnología a través de una modalidad de franquicia, basada en el sistema AR-VITRO®, cuyo objetivo es contribuir a difundir una herramienta aplicable en forma eficiente a la propagación de variedades de arándano, en apoyo al desarrollo de la tecnología de micropropagación *in vitro* a escala comercial.

La disponibilidad de materiales madre de las variedades disponibles a través del sistema AR-VITRO® se basa en la utilización de tecnología de conservación de germoplasma *in vitro*, asegurando el origen genético y adaptación al cultivo *in vitro* de cada variedad. Los componentes de AR-VITRO® han sido ajustados y evaluados extensamente a través de varios años de investigación a nivel de laboratorio y de trabajo de campo, ofreciendo un sistema de apoyo a la propagación de plantas de arándano que puede adaptarse a diferentes escalas de producción. Actualmente, el sistema AR-VITRO® comprende: un stock de material *in vitro* y un conjunto de Protocolos del Sistema© de propagación para continuar con el proceso de multiplicación *in vitro*, conteniendo toda la información necesaria para poder aplicar la tecnología ajustada por INIA. Además se cuenta con el apoyo y seguimiento técnico de los investigadores que han desarrollado y evaluado los protocolos para llevar adelante todas las etapas del ciclo de propagación. Las plantas obtenidas a través de este sistema se identificarán con una etiqueta AR-VITRO®, asegurando que la multiplicación y el manejo de las plantas micropropagadas han sido realizados de acuerdo al protocolo entregado a los laboratorios franquiciados.

La tecnología de cultivo *in vitro* permite mejorar el acceso a una gran cantidad de plantas a partir de cantidades mínimas de material vegetal, y su desarrollo productivo representa una oportunidad de crecimiento y diversificación a nivel del sector hortifrutícola de nuestro país. En esta primera etapa, se cuenta con dos variedades O'Neal y Georgia Gem, y los laboratorios que en el año 2004 han contratado franquicias con INIA Biotec® para utilización del sistema AR-VITRO® son: **AGROTEC Ltda.** (Paysandú, telef. (072)28719 - 099721032, agrotec@agrotec.com.uy, www.agrotec.com.uy), **BIOSUR Ltda.** (Ruta 5 Km. 50, Canelón Grande, Canelones, telef. 0332 3707 480 2482 - 099 171 888, Fax 487 1161, dfsgblo@adinet.com.uy), y **Semillas Santa Rosa S.A. - SESAR** (Ruta 11 Km. 118,5, Santa Rosa, Canelones, telef. 0313 2025 - 099 644 179 Fax 02 7080461, sesar@adinet.com.uy). La convocatoria a laboratorios de propagación interesados en utilizar este sistema continúa abierta para todas las empresas agrobiotecnológicas existentes y a aquellas que puedan instalarse próximamente en Uruguay; además se encuentran en desarrollo un conjunto de sistemas similares aplicables a otras especies vegetales de interés productivo.

Referencias:

Respuesta de dos clones de *Pyrus calleryana* a distintos medios de cultivo, setiembre 1992. Castillo A; Capdevielle, F.

La Biotecnología Aplicada a la Producción de Ajo Semilla
Castillo A, Dalla Rizza M. Revista Oficial de INASE, N° 3, Mayo 1999

Ajuste de un sistema de multiplicación *in vitro* para la especie nativa *Aloysia chamaedrifolia* (Verbenacea), 1999. Castillo A., Davies P., Ceppa M., Del Pino G., Bonilla B.

Introducción al cultivo de especies aromáticas nativas de interés comercial, Tesis de Maestría, julio 2000. Director Dr: Victoriano Valpuesta, Tutor: Dr. Marco Dalla Rizza.

Avances de Investigación en Frutales de Carozo y Arándanos. Serie Actividades de Difusión N° 237, Soria J.; Cabrera D.; Pisano J.;Castillo A. 11 de octubre de 2000.

Avances en experimentación de frutales alternativos: arándanos y otros berries. Serie Técnica N° 286, 14 de mayo 2002

Presentación de resultados experimentales de arándano, Jornada de divulgación 20 de febrero de 2004, Paysandú Uruguay

AR-VITRO®: un sistema de apoyo para el sector agrobiotecnológico de Uruguay, junio 2004, Capdevielle, F.; Castillo, A. I Seminario de Arándanos y Frambuesas, Uruguay