

Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)

Lic. María Eugenia Segretín
 INGEBI-CONICET - Dpto. FBMyc, FCEyN-UBA

El término genérico “cultivo de tejidos vegetales” involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas. También se lo conoce como “cultivo *in vitro* de plantas” por realizarse en recipientes de vidrio (hoy también de otros materiales).

Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales se remontan a 1902, pero recién en 1922 se logró el primer experimento exitoso: la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Luego de la germinación, las plántulas obtenidas se transfirieron a un medio de cultivo en condiciones asépticas, y así se mantuvieron protegidas del ataque de patógenos (hongos, virus y bacterias).

Hoy esta técnica tiene numerosas aplicaciones, algunas de ellas se ilustran en la Figura 1:

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año
- Obtención de plantas libres de virus
- Producción de semillas sintéticas
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal)
- Obtención de metabolitos secundarios
- Producción de nuevos híbridos
- Mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas)
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos diversos.

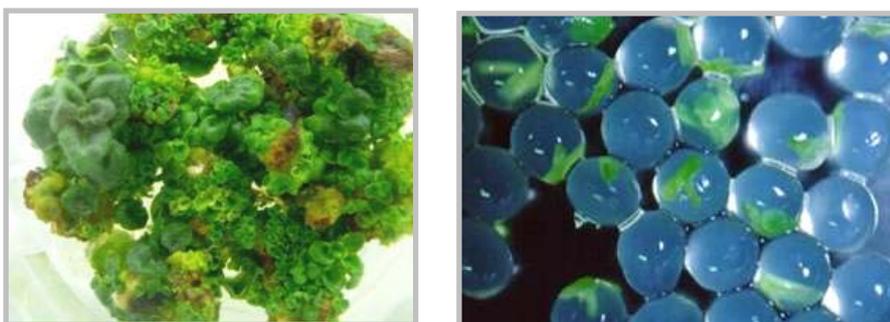


Figura 1. Algunas aplicaciones del cultivo de tejidos en plantas. A la izquierda, micropropagación de violeta africana a partir de trozos de hojas desinfectados e introducidos en condiciones de esterilidad. A la derecha, semillas sintéticas formadas por embriones somáticos obtenidos por cultivo de células, encapsulados en una matriz inerte (como el alginato de calcio). Fotografía tomada de http://www.sp.edu.sg/schools/cls/bioline_08.htm

Las bases biológicas del cultivo de tejidos: la totipotencialidad celular

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que, en general, varias células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametas. Esta capacidad se denomina *totipotencialidad celular*, y es característica de un grupo de células vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en los distintos órganos de la planta. La potencialidad de una célula diferenciada (una célula de conducción, epidérmica, etc.) para

generar tejidos nuevos y eventualmente un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por esa célula, pero puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivo a las que se la someta. Las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

- una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada **callo**, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar **órganos** o **embriones somáticos** (llamados así porque son estructuras similares a un embrión, pero que no se originaron por unión de gametas),
- una respuesta morfogénica por la cual se forman directamente órganos (**organogénesis**) o embriones (**embriones somáticos**).

La primera respuesta se conoce como **organogénesis o embriogénesis indirecta** (mediada por un estado de callo) mientras que la segunda respuesta se considera **organogénesis o embriogénesis directa**.

El cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explanto, como por ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristema, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerarán una o muchas plantas.

La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido desdiferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales.

El éxito en la propagación de una planta dependerá de la posibilidad de expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática. A tal fin, debe inducirse primero la desdiferenciación y luego la rediferenciación celular. Un proceso de este tipo sucede durante la formación de las raíces adventicias en el enraizamiento de estacas, la formación de yemas adventicias, o cuando se busca la propagación de begonias, violeta africana (ver figura 1) o peperonias mediante porciones de hojas. Uno de los factores más importantes a tener en cuenta para lograr la respuesta morfogénica deseada es la composición del medio de cultivo.

No existen dudas que en todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y que está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser modificado por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Estos compuestos se denominan **reguladores del crecimiento**, y se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta.

La totipotencialidad celular es clave en el desarrollo de plantas genéticamente modificadas o transgénicas. Una vez realizada la transformación, ya sea por *Agrobacterium* o por el método de biobalística, el paso siguiente es el cultivo *in vitro*, con el fin de obtener, a partir del explanto inicial transformado, plántulas que lleven el transgén en todas sus células (Figura 2).



Figura 2. Cultivo de tejidos y transformación vegetal. En la figura se observan explantos que, luego del proceso de selección, han perdido coloración y aquellas células transformadas exitosamente que se han desdiferenciado y rediferenciado para dar origen a un brote.

Pasos necesarios para generar plantas a partir de explantos aislados

En los protocolos utilizados durante el cultivo *in vitro* se pueden distinguir las siguientes etapas (sintetizadas en la Figura 3):

- 1) **Elección** de la planta y/o tejido donante de explantos.
- 2) **Establecimiento**, que consiste en la desinfección de los explantos (generalmente con hipoclorito de sodio) y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir callo, brote, raíz o embrión somático según se desee.

- 3) **Multiplicación**, para generar una masa vegetal suficiente para la regeneración del número de plantas necesarias.
- 4) **Enraizamiento**, en la que se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas.
- 5) **Rusticación**, que es la aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones ambientales *ex vitro* (suelo o algún sustrato inerte)

El éxito de la técnica depende de muchos factores, entre ellos la edad de la planta (a mayor edad, menor potencial de regeneración), el genotipo y las condiciones ambientales.

Entre las ventajas del cultivo *in vitro* de material vegetal, se pueden incluir los tiempos más cortos, y la posibilidad de ocupar un espacio mucho más pequeño que si se desea propagar material en tierra.

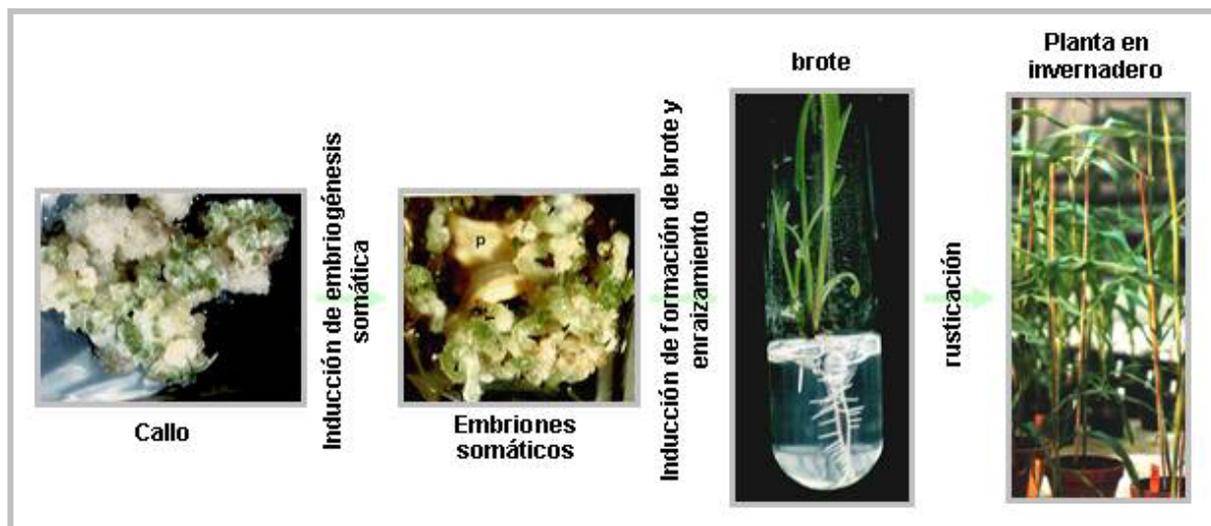


Figura 3. Etapas de la regeneración *in vitro* del maíz. Imágenes tomadas de <http://www.cid.csic.es/departaments/genetica/torne/indexC.html> y http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e28_2/maize.html

Elementos necesarios para el cultivo de tejidos vegetales



Figura 4. Flujo laminar para el cultivo de tejidos. Se observa uno de los modelos de flujo laminar que puede usarse para preservar la esterilidad de las muestras. Imagen tomada de www.jaelsa.com/laboratorio4.html

Para llevar adelante este trabajo, se necesitan equipamientos que generen las condiciones necesarias de esterilidad, como los **flujos laminares**, que son estaciones de trabajo que hacen circular aire filtrado y estéril, protegiendo así a la muestra con la que se desea trabajar (Figura 4).

Además, se necesita un soporte para el explanto, que puede ser sólido o líquido, y que está conformado por algún agente gelificante inerte (agar, *gelrite*, etc.), macro y micronutrientes esenciales para la supervivencia de la planta, nutrientes (hidratos de carbono, vitaminas), agentes reguladores del crecimiento y hormonas vegetales (ver Tabla 1) que ayudarán a obtener una planta o un órgano en particular, a partir del explanto elegido. Algunos de los elementos mencionados pueden ser reemplazados por mezclas poco definidas en su composición (jugo de tomate, agua de coco, etc.), que pueden dar buenos resultados y generalmente resultan más económicas. La acidez de los medios de cultivo para plantas suele variar entre pH=5 y 6,5. Luego se regulan las condiciones de temperatura y de fotoperíodo (relación de horas luz y horas oscuridad).

Según sea el balance hormonal y otras condiciones de cultivo, se puede propiciar la regeneración de distintos órganos o formaciones vegetales. Por ej., si el balance de citoquininas/auxinas (ver Tabla 1) es mayor que 1, se favorece la generación de brotes; si es menor que 1, la generación de raíces; y si es igual a 1, la formación de callos.

Tabla 1. Composición de medios de cultivo para células vegetales

Componentes	Características y ejemplos
Agua destilada	Representa el 95% del medio nutriente
Fuente de carbono	Generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita porque los explantos no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar <i>in vitro</i>
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada según la planta elegida.
Vitaminas	Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Hormonas y reguladores del crecimiento	Auxinas: promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, inhiben la embriogénesis. Citoquininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales. Otras: giberelinas, ácido abscísico, etileno.
Mezclas de sustancias poco definidas	Extracto de levadura, extractos vegetales.
Materiales inertes	Se usan como soporte: agar, agarosa, otros polisacáridos, lana de vidrio, papel de filtro, arena.

Fuente: Biotecnología, UNQ 2006.

El cultivo *in vitro* y la biotecnología:

- **La micropropagación**

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son realizados por personal especializado en medios específicos (hormonas, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.) y condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luz) (Figura 5). Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a mayor escala de producción.

La micropropagación (propagación clonal por cultivo *in vitro*) constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se la usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales.

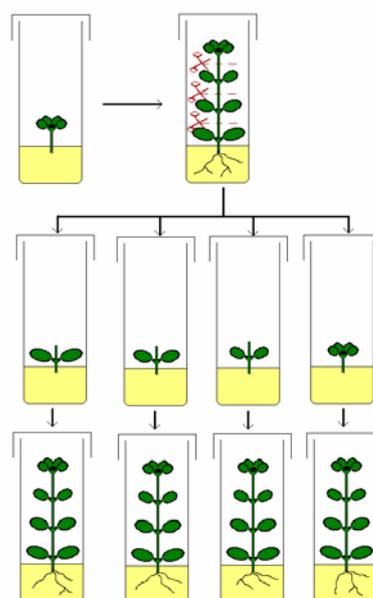


Figura 5. La micropropagación vegetal. A partir de una planta madre se obtienen numerosos explantos que, sujetos a condiciones y medios de cultivo adecuados, darán lugar a nuevas plantas iguales a la planta original, permitiendo su multiplicación.

Entre las ventajas de la micropropagación se pueden mencionar:

- Posibilita incrementar rápidamente nuevos materiales.
- Permite controlar las condiciones ambientales, debido a su independencia de los mismos (luz, temperatura y humedad controlada).
- Permite estudiar diversos procesos fisiológicos.
- Evita el riesgo de contaminación con patógenos, ya que se realiza en medios esterilizados.
- Se pueden obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos.
- Permite la obtención de individuos uniformes.
- Facilita el transporte del material.

• El cultivo de meristemas

En la yema apical se encuentran un grupo de células que conforman el meristema apical (tiene un tamaño entre 0,01 y 0,3 mm), tejido embrionario que tiene la capacidad de formar todos los tejidos de la planta. A partir de ellos se pueden regenerar plantas completas (Figura 6).

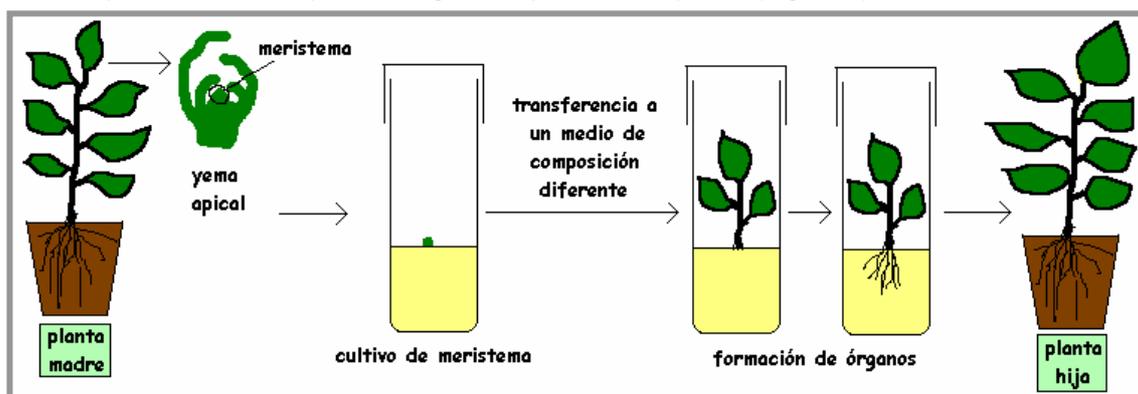


Figura 6. Cultivo de meristemas. A partir de un meristema aislado se puede obtener una planta completa. Adaptado de Biotecnología, UNQ 2006.

El cultivo de meristemas tiene numerosas aplicaciones. Una de las más importantes es la obtención de plantas libres de virus, ya que esta pequeña zona de tejido generalmente no es afectada por estos patógenos vegetales. Otra muy importante es la multiplicación vegetal. La potencialidad de la técnica se demuestra con un ejemplo: a partir de una yema apical, se pueden obtener 4.000.000 de claveles en un año. La técnica permite también multiplicar especies de plantas con reproducción lenta o dificultosa (como las orquídeas), o acelerar la producción de plantas bianuales.

• Cultivo de células y órganos vegetales en biorreactores

Una vez obtenidos los callos a partir de algún explanto, los mismos pueden disgregarse para obtener una suspensión de células. Esta suspensión puede utilizarse para generar embriones somáticos (la base de las semillas sintéticas), o puede directamente cultivarse para producir metabolitos secundarios, que son compuestos químicos sintetizados por las células vegetales en determinadas condiciones, con gran utilidad para las industrias farmacéutica y alimenticia, entre otras. Por ejemplo, son metabolitos secundarios el mentol y las drogas anticancerígenas vincristina y taxol, y algunos edulcorantes. Los cultivos celulares se llevan a cabo en biorreactores, que son recipientes de distinta capacidad (de unos pocos a miles de litros), diseñados para propiciar el crecimiento y/o la multiplicación de distintos tipos de células y/o órganos (Figura 7).

Las raíces vegetales también pueden ser cultivadas en biorreactores, especialmente aquellas transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*, que produce un aumento abrupto en el tamaño y ramificación de la raíz, aumentando así la biomasa, y por ende la cantidad del producto deseado. Un ejemplo de compuesto farmacológico producido por cultivo de raíces es el paclitaxel, o taxol, que es utilizado como anticancerígeno.

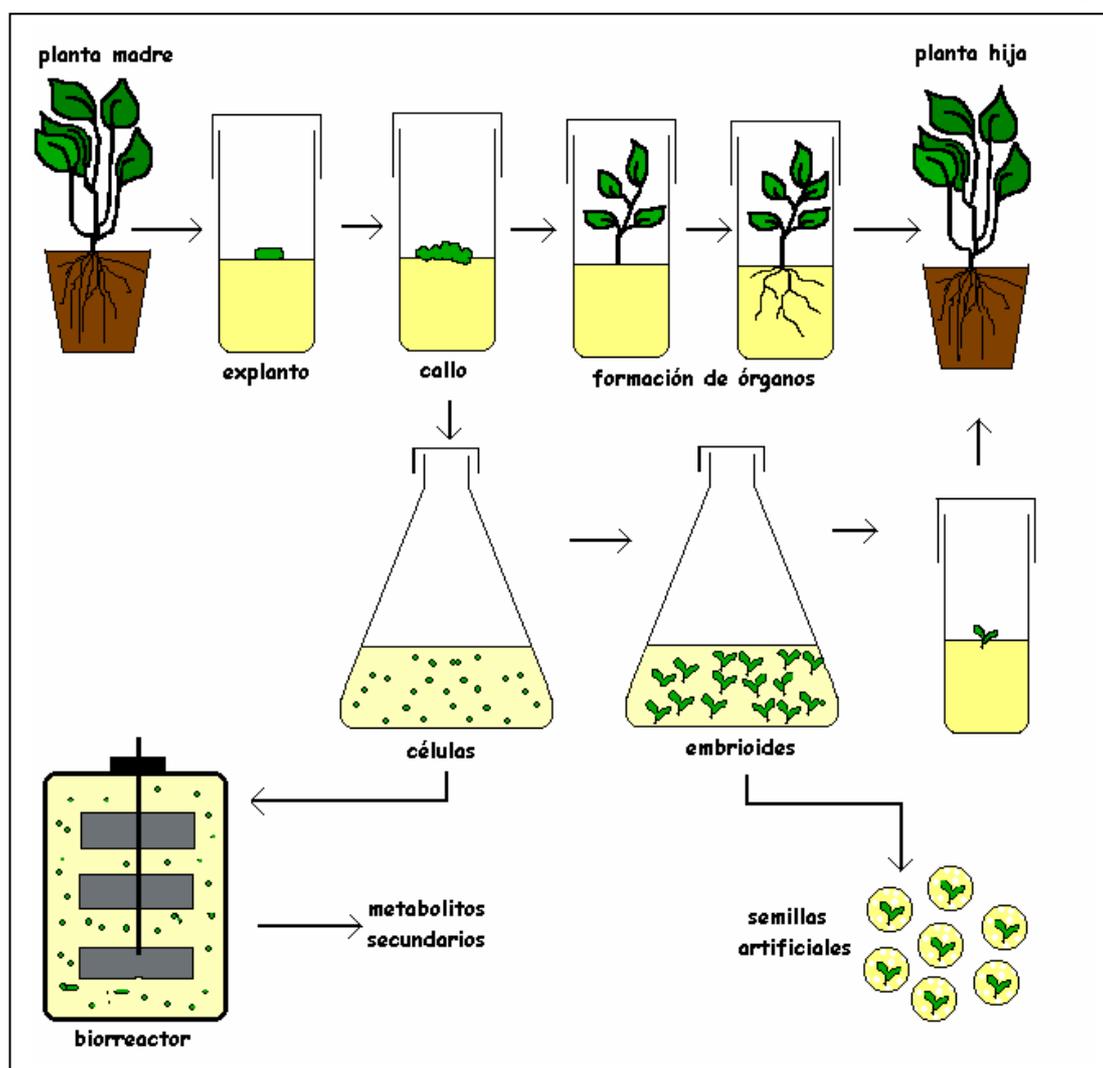


Figura 7. Cultivo de células y órganos vegetales. A partir de un explanto se pueden establecer cultivos de células para producir compuestos de interés, o para obtener embriones somáticos y semillas artificiales, entre otras aplicaciones. Adaptado de "Biotecnología", UNQ 2006

Fuentes consultadas

- Muñoz de Malajovich, M. A. (2006) Biotecnología. Editorial Universidad Nacional de Quilmes
- Barceló et al. (1980) Fisiología vegetal. Editorial Pirámide
- Barthelemy R, Dawson J, Lee A (1977) Técnicas para el laboratorio de biología. Compañía Editorial Continental
- Devlin, R. (1976) Fisiología vegetal. Editorial Omega.
- Pierik, R.L.M. (1987) *In vitro* culture of higher plants. Editorial Martinus Nijhoff Publishers
- Strasburger, E. (1981) Tratado de Botánica. Editorial Marín