

Libros de **Cátedra**

Plantas de probeta

Manual para la propagación de plantas
por cultivo de tejidos in vitro

Sandra Sharry, Marina Adema y Walter Abedini (coordinadores)

n
naturales

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

PLANTAS DE PROBETA
MANUAL PARA LA PROPAGACIÓN DE PLANTAS
POR CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO

Sandra Sharry
Marina Adema
Walter Abedini

(coordinadores)

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Índice

INTRODUCCIÓN _____	6
<i>Marianelén Cedres Gazó y Sandra Sharry</i>	
Capítulo 1	
Un poco de historia... _____	13
<i>Sandra Sharry y Walter Abedini</i>	
Capítulo 2	
Desde un área estéril a las biofábricas de producción masiva	
Diseño y organización del laboratorio de cultivo <i>in vitro</i> de plantas _____	22
<i>Jesica Iannicelli y Alejandro Salvio Escandón</i>	
Capítulo 3	
¿Cómo se nutren las plantas de probeta?	
Medios de Cultivo- Reguladores de crecimiento _____	46
<i>Patricia Boeri</i>	
Capítulo 4	
La incubadora	
Condiciones ambientales de cultivo-Asepsia _____	73
<i>Sebastian Pariani</i>	
Capítulo 5	
¿Por dónde empezamos?	
Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> - Plantas madre. Explantes _____	81
<i>Marina Adema</i>	
Capítulo 6	
¿Cómo se forman los nuevos órganos <i>in vitro</i>?	
Morfogénesis <i>in vitro</i> . Organogénesis. Embriogénesis somática _____	92
<i>Blanca Villarreal</i>	
Capítulo 7	
No siempre sale todo bien...	
Problemas de Cultivo de Tejidos Vegetales _____	102
<i>Noelia Nikoloff</i>	
Capítulo 8	
Micropropagación: la técnica de “fotocopiado” de plantas	
Micropropagación-Etapas. Establecimiento de plantas a condiciones de campo _____	112
<i>Valentina Briones</i>	

Capítulo 9	
Una opción para cada necesidad	
Tipos de Cultivos de tejidos <i>in vitro</i> _____	121
<i>Maria de los Angeles Basiglio</i>	
Capítulo 10	
Las plantas como bio-fábricas	
Plantas medicinales. Metabolitos secundarios _____	145
<i>Cecilia Rivas</i>	
Capítulo 11	
Mejoramiento de plantas por cultivo de tejidos. Transformación genética de plantas ____	159
<i>Clara Bisio</i>	
Capítulo 12	
Mejor sanitas...	
Mejoramiento genético por cultivo de tejidos. Plantas libres de virus _____	171
<i>Clara Bisio y M. de los Angeles Basiglio Cordal</i>	
Capítulo 13	
¿Bancos para guardar plantas?	
Conservación de germoplasma _____	178
<i>Fernanda Gugole</i>	
Capítulo 14	
Algunas recetas de “cocina”...	
Protocolos específicos de cultivos de tejidos <i>in vitro</i> (ornamentales, hortícolas, forestales, aromáticas, medicinales, frutales, cereales) _____	194
<i>Pariani Sebastián y Adema Marina (compiladores)</i>	
LOS AUTORES _____	234

CAPÍTULO 7

NO SIEMPRE SALE TODO BIEN...

PROBLEMAS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Noelia Nikoloff

En el cultivo de tejidos *in vitro* pueden presentarse algunos problemas dependiendo del cultivo o de la variedad con la que se trabaje. Uno de los principales problemas cuando se trata de establecer los cultivos es la **contaminación** de los mismos con diversos tipos de microorganismos (Mroginski, y *otros.*, 2010) (Ver capítulo 4). Por definición, un contaminante es cualquier microorganismo introducido en un cultivo o medio de cultivo. Las principales causas de contaminación son: microorganismos presentes en el interior o en el exterior de los explantes y las fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio (Mroginski, y *otros.*, 2010). Se denominan “vitropatogenos” a los contaminantes más frecuentes que aparecen en condiciones *in vitro*. El término “vitropatogeno” es empleado para aquellos organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas a campo, pero sí lo son para las células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*. Estos contaminantes son los responsables de ocasionar la muerte del tejido debido a que pueden modificar el pH, competir por los nutrientes y modificar el medio de cultivo (Cassells, 2012).

En el capítulo 4 hemos explicado los distintos tipos de contaminantes y las diferentes alternativas para evitarlos y/o minimizarlos en los cultivos *in vitro*. Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, otra opción posible para evitar la contaminación se basa en el hecho conocido de que los meristemas vegetales están libres de contaminantes endógenos, por lo tanto, el cultivo de meristemas *in vitro* permite, en gran cantidad de casos, el establecimiento de cultivos libres de patógenos.

Otro problema común en los cultivos *in vitro* es la llamada **Oxidación o Ennegrecimiento** que se manifiesta como un oscurecimiento del tejido vegetal y se puede definir como la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, generando daño, inhibición del crecimiento y en los casos graves incluso la necrosis y muerte del tejido (Amiot y *otros.*, 1996, Bray y *otros.*, 2000). Este problema es común en varias especies, especialmente en las leñosas. La oxidación está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células cultivadas *in vitro* provocando la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos (Azofeifa, 2009). Los estresores en los cultivos *in vitro* se relacionan principalmente con el efecto abrasivo causado por los agentes desinfectantes en la asepsia del explante, los cortes del explante, los cambios en el pH, la composición del medio de cultivo, como así también el volumen y la calidad del frasco de cultivo (Van Staden y *otros.* 2006). En la práctica existen varias estrategias para eludir los procesos de oxidación, cabe aclarar que un único método no siempre es suficiente, todo depende de la complejidad del problema. Entre las mismas podemos enumerar las siguientes: 1) usar explantes en estado juvenil o en crecimiento activo; 2) disminuir la intensidad de la luz de cultivo; 3)

disminuir la temperatura de cultivo; 4) realizar subcultivos con frecuencia; 5) cultivar el explante en medio líquido; 6) agregar antioxidantes al medio de cultivo; 7) disminuir el pH del medio de cultivo; 8) agregar adsorbentes como carbón activado al medio de cultivo; 9) disminuir la duración de la esterilización del explante o cambiar el agente desinfectante; 10) incrementar las sales de calcio; 11) reducir los niveles de nitrato (D'Silva y D'Souza, 1993; George, 1996; Harikrishnan, y otros., 1997; Aliyu, 2005).

La **Vitrificación o Hiperhidricidad** es otro de los inconvenientes con el que nos podemos encontrar cuando realizamos la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*, es el fenómeno por el cual los brotes toman aspecto vítreo y transparente, observándose turgencia y fragilidad en hojas y tallos (George y otros., 1984; Ziv, 1993). Se caracteriza por ser un proceso de morfogénesis anormal con desordenes fisiológicos (mayor absorción de agua, menor contenido de clorofila, menor capacidad fotosintética, hipolignificación), anatómicos (epidermis y cutículas delgadas, grandes espacios intercelulares, menor desarrollo del sistema vascular, estomas anormales y escasos, ausencia de parénquima en empalizada) y morfológicos (entrenudos cortos, color anormal, arrosetamiento, hojas más gruesas elongadas y arrugadas, tallos de mayor diámetro) en condiciones de cultivo *in vitro*. Este fenómeno está regulado principalmente por dos factores que son la humedad relativa y el potencial de agua afectando a la fotosíntesis y a la transpiración (Olmos y otros., 2010). Las causas por las que se produce la vitrificación se deben a las condiciones adversas bajo las cuales se desarrollan los cultivos, ya sea excesiva humedad, factores nutricionales, baja intensidad

lumínica, uso de recipientes herméticos que afectan el intercambio gaseoso, altas concentraciones de citocininas, carbohidratos y minerales. Por otra parte, la consecuencia principal de este fenómeno es la baja supervivencia de las plántulas obtenida durante la aclimatación *ex vitro*. Para superar este problema se han propuesto una serie de posibles soluciones como son: el empleo de frascos con filtro para incrementar el intercambio gaseoso y la aireación evitando contaminaciones secundarias (Maene y Deberg, 1987), la remoción de la fuente de carbohidratos del medio de cultivo, la defoliación de las plántulas para estimular la formación de hojas nuevas y por consiguiente la fotosíntesis y otras actividades metabólicas (Ziv y otros., 1990), el uso de retardantes de crecimiento para estimular la formación de hojas nuevas después del trasplante (Ziv, 1989), el empleo de altos niveles de CO₂ (antagonista del etileno) para estabilizar la vía de lignificación y prevenir la vitrificación por medio de la inhibición de la formación de aerénquima y de la hiperhidratación (Kozai y otros., 1987). Todas estas soluciones aportan mejoras y ventajas que permiten a las plantas propagadas *in vitro* atravesar las distintas etapas del cultivo en las mejores condiciones morfológicas, fisiológicas y funcionales posibles.

Otro de los problemas comunes es la **Falta de Respuesta** del cultivo. Existen diversos factores que influyen en este tipo de inconveniente como son: a) el genotipo de la célula, el cual es conservado fielmente, pero hay mecanismos reguladores de la información genética que causan que la morfogénesis sea inactiva y se pierda por completo durante el subcultivo, esto genera diferencias en la regeneración de plantas. A su vez, esta diversidad de respuesta entre los

distintos taxa pueden reflejarse en los requerimientos nutricionales y hormonales necesarios para la diferenciación; b) los efectos en la posición y la competencia, ya que existen fuertes diferencias entre célula y célula y entre diferentes tipos de órganos en cuanto a capacidad de regeneración en cultivo de tejidos *in vitro*; c) la polaridad del explante relacionado a la proliferación celular y/o morfogénesis; d) las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad y fase gaseosa). Una alternativa para prevenir y/o solucionar este problema es considerar las condiciones bajo las cuales se desarrolla el cultivo, como la temperatura, humedad, intensidad y calidad de luz, el tipo y forma del frasco de cultivo y la densidad de explantes. Por otra parte, otro tipo de falta de respuesta está relacionada con el fenómeno de habituación, se denomina así a la habilidad adquirida después de varios subcultivos por una población de células para crecer y dividirse, independientemente del agregado exógeno de reguladores de crecimiento que en un principio eran de uso obligatorio, por consiguiente, estas células son denominadas autónomas.

La **Variabilidad**, es la presencia de plantas anormales provenientes de cultivo de tejido *in vitro*. Algunos autores opinan que este fenómeno puede ser consecuencia de la alta frecuencia de división celular que tiene lugar en los cultivos *in vitro*, mientras que otros la asocian a causas de estrés (Calva Calva y Pérez Vargas, 2005). La identificación de los factores de estrés asociados a la aparición de plantas fuera de tipo es entonces fundamental para identificar en forma temprana estos tejidos en el laboratorio y eliminarlos, de manera que se

reduzca la presencia de plantas indeseables en las fases de aclimatación y rusticación.

Teniendo en cuenta los aspectos planteados de los diferentes problemas que podemos encontrar al practicar técnicas de cultivo de tejido *in vitro* debemos destacar que lamentablemente no son los únicos. Existen **Otro tipo de problemas** que no están específicamente caracterizados y no por ello son de índole menor. Las técnicas de cultivo de tejido *in vitro* implican una gran cantidad de variables, algunas de las cuales son aún desconocidas y es por eso que a veces los resultados que fueron alcanzados fácilmente en un laboratorio, no son reproducibles en otro. La falta de reproducibilidad de los protocolos descritos en la literatura es uno de los problemas más comunes encontrados en la práctica, ya que dependen de las condiciones locales de cada laboratorio. Más aún, las rutinas establecidas a pequeña escala en general son modificadas para conseguir resultados exitosos a gran escala, pero estos cambios, por ejemplo en métodos de preparación de medios de cultivo, uso de diferentes tipos de envases y de diferentes cámaras de cultivo, entre otros, quizá afecten significativamente la técnica dando resultados negativos.

La siguiente tabla resume problemas comúnmente encontrados en la práctica, sus posibles causas y soluciones:

SÍNTOMA	POSIBLES CAUSAS	POSIBLES RESPUESTAS
Muerte del explante	Desinfección fuerte Medio de cultivo muy fuerte Equivocado estado de desarrollo	Ajustar los tiempos y concentraciones Utilizar a ½ o ¼ Obtener explantos a diferentes estados de desarrollo
Necrosis	Contaminación Exudado "Bleeding" Problemas con el agar Problemas con el	Descartar con cuidado. Revisar la técnica de esterilización Transferir inmediatamente. Subcultivar más

	agua Formula equivocada	frecuentemente Probar diferentes fuentes de agar, o gelificantes. Controlar la pureza del agua. Probar diferentes fórmulas
Brotes muy largos y baja tasa de multiplicación	Poca concentración de citocininas	Aumentar concentración de citocininas Utilizar la grilla citocinas/auxinas
Brotes demasiado cortos	¹ PGR muy fuertes	Disminuir u omitir los ¹ PGR
No multiplicación	Baja concentración de citocininas Necesita vernalización Mucho frío Requiere período de dormancia	Aumentar la concentración de citocininas Almacenar a baja temperatura por 4-8 semanas Utilizar la grilla cit/aux Aumentar la temperatura Tratamiento con frío 3-4 semanas
Tallos gruesos, hojas pequeñas, pálidas	Demasiada citocinina	Disminuir las citocininas
Formación de callo no buscada	¹ PGR equivocados Exceso de auxinas	Disminuir u omitir los ¹ PGR Utilizar la grilla cit/aux
Hojas cloróticas	Contaminantes endógenos Alta temperatura Fórmula equivocada	Index para contaminación Disminuir temperatura Probar diferentes medios
Vitrificación, hojas suculentas	Potencial osmótico desordenado Alta concentración de citocininas Agar equivocado Cultivos muy	Disminuir la temperatura Aumentar la concentración de agar Disminuir los ¹ PGR Probar otro agente gelificante Subcultivar más

	viejos	seguido
Enraizamiento prematuro	Balance de ¹ PGR equivocado	Utilizar la grilla cit/aux Subcultivar Aumentar las citocininas y disminuir las auxinas
Tallos rojos	Estrés Demasiada azúcar No demasiado NO ₃ Cultivo muy viejo	Cambiar la intensidad de luz o modificar la temperatura Disminuir el contenido de azúcar Aumentar el nitrato Subcultivar más frecuentemente

¹PGR: Hormonas vegetales y reguladores de crecimiento: son compuestos orgánicos, no nutrientes, sintetizados por la planta, que actúan en muy baja concentración y que desencadenan diversas respuestas fisiológicas. Existen sustancias sintéticas, con similares características, a las que se denominan reguladores de crecimiento. Los reguladores vegetales de crecimiento son utilizados en concentraciones del orden de partes por millón

Bibliografía

- Aliyu, O. 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. African Journal of Biotechnology 4: 1485-1489.
- Amiot, M; Forget, F; Goupy, P. 1996. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. Herba-Polonica 42: 237-247.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía mesoamericana 20(1): 153-175.
- Bray, E; Bailey-Serres, J; Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and

- molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. pp. 1158-1203.
- Calva Calva, G; Pérez Vargas, J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria, 6: 1067-6079.
 - Cassells, A C. 2012. Pathogen and Biological Contamination Management in Plant Tissue Culture: Phytopathogens, Vitro Pathogens, and Vitro Pests. Plant Cell Culture Protocols Methods in Molecular Biology 877: 57-80.
 - D'Silva, I; D'Souza, L. 1993. Controlling contamination and browning of *in vitro* cultures of cashew. Journal of Plantation Crops 21: 22-29.
 - De Bartolini, B C; Lallana, V H. 1995. Términos comúnmente usados en cultivo de tejidos. Oro Verde, Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos, pp. 23.
 - George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England, pp. 1361.
 - George, E. y Sherrington, P D. 1984. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics, Basingstoke, pp. 709.
 - Harikrishnan, K; Martin, K; Anand, P; Hariharan, M. 1997. Micropropagation of sweet flag (*Acorus calamus*) a medicinal plant. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 19: 427-429.
 - Kozai, T; Iwanami, Y y Fujiwara, K. 1987. Effect of CO₂ enrichment on the plantlet growth during the multiplication stage. Plant Tissue Culture Letters 4:22-26.
 - Maene, L y Debergh, P. 1987. Optimalisation of the transfer of tissue cultured shoots to *in vivo* conditions. Acta Horticulturae 212:335-348.
 - Mroginski, L; Sansberro, P y Flaschland, E. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Parte I: Herramientas Básicas. Capítulo 1 Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Buenos Aires, Argentina, pp. 17-25.

- Olmos, S; Luciani G y Galdeano, E. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Capítulo 1 Micropropagación. Buenos Aires, Argentina, pp. 353-362.
- Van Staden, J; Fennell, C; Taylor, N. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-62.
- Ziv M. 1989. Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17: 101-110.
- Ziv, M, Lilien-Kipnis, H. 1990. Gladiolus. In: Ammirato, P.V., Evan, D.A., Sharp, W.R., Bajaj, Y.P.S. (Eds.), *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 5. McGraw-Hill, New York, pp. 461–478.
- Ziv M, 1993. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En *Micropropagation*. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 45-92.