

# MICROPROPAGACIÓN

## Cultivo de células, tejidos y órganos vegetales “In Vitro”

Por: M. Morán Martín\*, M. Caho Herrero\*.



“La regeneración de una planta entera se puede obtener a partir de un cultivo de sus tejido reproduciendo la morfogénesis natural”

### INTRODUCCIÓN

Durante millares de años el hombre ha observado y explotado la capacidad regenerativa que poseen las plantas superiores. Sin embargo, las técnicas de laboratorio para el cultivo estéril de órganos y tejidos vegetales no fueron establecidas hasta el siglo XX, cuando Haberlandt en 1902 comenzó los primeros experimentos que verdaderamente pueden ser descritos como tales.

A partir de este momento se planteó la necesidad de utilizar tejidos meristemáticos pero no fue posible lograr un cultivo indefinido hasta el descubrimiento de las auxinas, sustancias reguladoras del crecimiento vegetal.

Los primeros cultivos de tejidos vegetales, entendiéndose como “cultivo de tejidos” “...aquel cultivo multicelular en un medio sólido y nutrido con un medio líquido en el que las células están en continuidad protoplasmática” (Street, 1977), fueron obtenidos por Gautheret, Nobecourt y White en 1939 y los medios nutritivos en los que crecían estaban perfectamente formulados. En 1948, Skoog y Tsui, sugirieron que en cultivos de callos podía provocarse la aparición de estructuras morfológica-

mente diferenciadas (tallos y/o raíces), regulando la composición química del medio nutritivo. Estos autores, buscando un factor que estimulase la división celular lo encontraron en preparaciones degradadas de DNA. Este, fue identificado como 6-furfurilaminopurina y recibió el nombre de kinetina. Posteriormente se sintetizó un análogo de este compuesto, la 6-bencilaminopurina, también con propiedades estimuladoras de la división celular. A todos estos compuestos se les dio el nombre genérico de citoquininas.

Skoog y Miller en 1957, propusieron la hipótesis de que la formación de tallos y raíces en cultivos de callos podía ser regulada por auxinas y citoquininas en concentraciones adecuadas.

(\*) Dpto. Biología Vegetal  
 Universidad de Salamanca

Así pues y con las observaciones hechas por estos autores, en cualquier cultivo de tejidos se puede reproducir la morfogénesis natural y de esta manera conseguir la regeneración de una planta, bien por vía organogénica o bien por vía embriogénica. Sin embargo se hacen necesarios una serie de requisitos como son, a) el mantenimiento de condiciones estériles, esenciales para el sucesivo crecimiento, ya que de otra forma podrían desarrollarse microorganismos que ocasionarían la muerte celular; y b) la formulación de un medio nutritivo adecuado que sustituya los aportes que el resto de la planta da a un fragmento vegetal cuando el vegetal está intacto.

### **NECESIDADES NUTRICIONALES Y FACTORES QUE INFLUYEN EN EL ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS "IN VITRO" DE TEJIDOS Y CÉLULAS VEGETALES**

Cualquier vegetal necesita un aporte hídrico, junto con nutrientes minerales; una fuente de carbono en forma oxidada y la energía suficiente para convertirlo en los diferentes compuestos que constituyen la planta. En el caso de los cultivos "in vitro",

los explantos presentan una nutrición heterótrofa durante algún tiempo, no tienen pues, en principio, la posibilidad de sintetizar carbohidratos, compuestos nitrogenados, vitaminas y sustancias reguladoras del crecimiento, por lo que se les ha de suministrar exógenamente sustancias que aporten alimentos y algunos esqueletos carbonados y que por diferentes rutas proporcionen la energía que son incapaces de tomar del sol. Teniendo en cuenta este hecho, se pueden explicar las enormes variaciones que se realizan en la composición del medio nutritivo utilizado para el cultivo y que dependen de la especie utilizada, la parte del vegetal que nos sirva como explanto y del estado fisiológico del mismo (George E. F. 1996).

#### **Nutrientes inorgánicos**

Los mismos elementos inorgánicos que son esenciales para el crecimiento de plantas completas, son necesarios para el crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales cultivados "in vitro" y en éstos, sus deficiencias son más acusadas e incluso letales. Clarkson y Hanson en 1980 clasificaron estos nutrientes inorgánicos en dos grandes grupos: 1) Aquellos elementos (N,P,S) unidos covalentemente a com-

puestos carbonados y que son constituyentes vitales de las macromoléculas DNA, RNA y proteínas y 2) otros elementos (K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, B, Cl) que participan en varias funciones, a menudo solapadas, como pueden ser la regulación de los gradientes eléctricos y osmóticos, conformación de las proteínas y reacciones redox de metaloproteínas.

George y colaboradores en su libro "Plant Culture Media" (1987), recogen los medios más utilizados para el cultivo de células y tejidos vegetales "in vitro", describiendo su formulación y usos. Por lo general los medios están basados en formulaciones ya establecidas, definidas por Heller (1953), Murashige y Skoog (1962), Linsmaier y Skoog (1965), Gamborg (1968), Schenck y Hildebrandt (1972) entre otros y que se muestran en las tablas 1 y 2.

#### **Nutrientes orgánicos**

Existen tres tipos de nutrientes orgánicos requeridos prácticamente por todas las especies de vegetales cultivadas "in vitro", como son carbohidratos, sustancias reguladoras de crecimiento y vitaminas. Además, también se añaden numerosos complejos de extractos naturales y líquidos endospermicos.



**SOLO UNA VEZ EN LA VIDA...**



Tabla 1. Solución nutritiva según el medio de Murashige y Shoog

Constituyentes	Molaridad en el medio	Concentración de la solución stock (mg/litro)	Volumen de la solución stock por litro de medio (ml)	conservación de la solución stock
<b>Macronutrientes inorgánicos</b>			50	+4°C
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.06 x 10 <sup>-2</sup>	3300		
KNO <sub>3</sub>	1.88 x 10 <sup>-3</sup>	38000		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.00 x 10 <sup>-3</sup>	8800		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.50 x 10 <sup>-3</sup>	7400		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25 x 10 <sup>-3</sup>	3400		
<b>Oligoelementos</b>			5	+4°C
KI	5.00 x 10 <sup>-6</sup>	166		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.00 x 10 <sup>-6</sup>	1240		
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	9.99 x 10 <sup>-6</sup>	4460		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.99 x 10 <sup>-5</sup>	1720		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.00 x 10 <sup>-6</sup>	50		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1.00 x 10 <sup>-7</sup>	5		
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.00 x 10 <sup>-7</sup>	5		
<b>Fuente de Hierro</b>			5	+4°C
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.00 x 10 <sup>-4</sup>	5560		
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	1.00 x 10 <sup>-4</sup>	7460		
<b>Compuestos Orgánicos</b>			5	-20 °C (en alicuotas de 5 ml)
Myo-Inositol	4.90 x 10 <sup>-4</sup>	20000		
Ácido Nicotínico	4.66 x 10 <sup>-6</sup>	100		
Piridoxina-HCl	2.40 x 10 <sup>-6</sup>	100		
Tiamina-HCl	3.00 x 10 <sup>-7</sup>	100		
Glicina	3.00 x 10 <sup>-6</sup>	400		
<b>Fuente de carbono</b>				
			Añadida	

Tabla 2. Composición de otros medios usados en el cultivo de células y tejidos vegetales

Constituyentes	Concentración en el medio de cultivo (mg/ litros)				
	White's	Schenk y Hildebrandt	B <sub>5</sub>	Heller's	Lismaier y Skoog
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-	-	-	1650
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	300	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	134	-	-
KNO <sub>3</sub>	81	2500	3000	-	1900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	200	150	75	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	74	400	500	250	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12	-	-	-	170
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	142	-	-	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	-	-	600	-
KCl	65	-	-	750	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	150	125	-
MnSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	10	10	-	-
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	-	0.1	22.3
KI	-	1	0.75	0.01	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	5	3	1	6.2
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	1	2	1	8.6
CuSO <sub>4</sub>	-	0.2	0.025	-	-
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	-	-	-	0.03	0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	0.1	0.25	-	0.25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	0.1	0.025	-	0.025
AlCl <sub>3</sub>	-	-	-	0.03	-
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	-	-	0.03	-
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	-	-	1	-
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	15	-	-	27.86
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2.46	-	-	-	-
Sequestreno 330 Fe	-	-	28	-	-
Na <sub>2</sub> EDTA	-	20	-	-	37.26
Myo-Inositol	-	1000	100	-	100
Ácido Nicotínico	-	5	110	-	0.4
Piridoxina-HCl	-	5	1	-	-
Tiamina-HCl	-	0.5	1	-	-
Extracto de levadura	100	-	-	-	-
Sacarosa	20000	30000	20000	-	30000
pH		5.9	5.5		5.8



...NACE UNA ESTRELLA

### Carbohidratos

Todos los cultivos "in vitro" de células vegetales necesitan la presencia de un azúcar como fuente de carbono y energía. Generalmente se emplea la **sacarosa** a una concentración que varía entre 20 y 45 g/l. Este compuesto participa en la fuerza osmótica del medio además de proporcionar glucosa y fructosa para las diferentes rutas metabólicas (Brown et al., 1976).

### Sustancias reguladoras de crecimiento

La mayoría de los cultivos requieren un aporte exógeno de auxinas y citoquininas naturales o sintéticas, aunque algunos tejidos son capaces de mantener el crecimiento en ausencia de fitohormonas, ya que sus niveles endógenos son suficientes para satisfacer sus propias necesidades.

La auxina natural que más se utiliza es el ácido indolacético (AIA). Dentro de las auxinas sintéticas las más empleadas son el ácido naftalenacético (ANA) y el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Su acción principal es la estimulación de la diferenciación de raíces y la elongación de tallos. El 2,4-D a dosis muy elevadas actúa como herbicida debido probablemente al potencial genotóxico de esta auxina, no obstan-

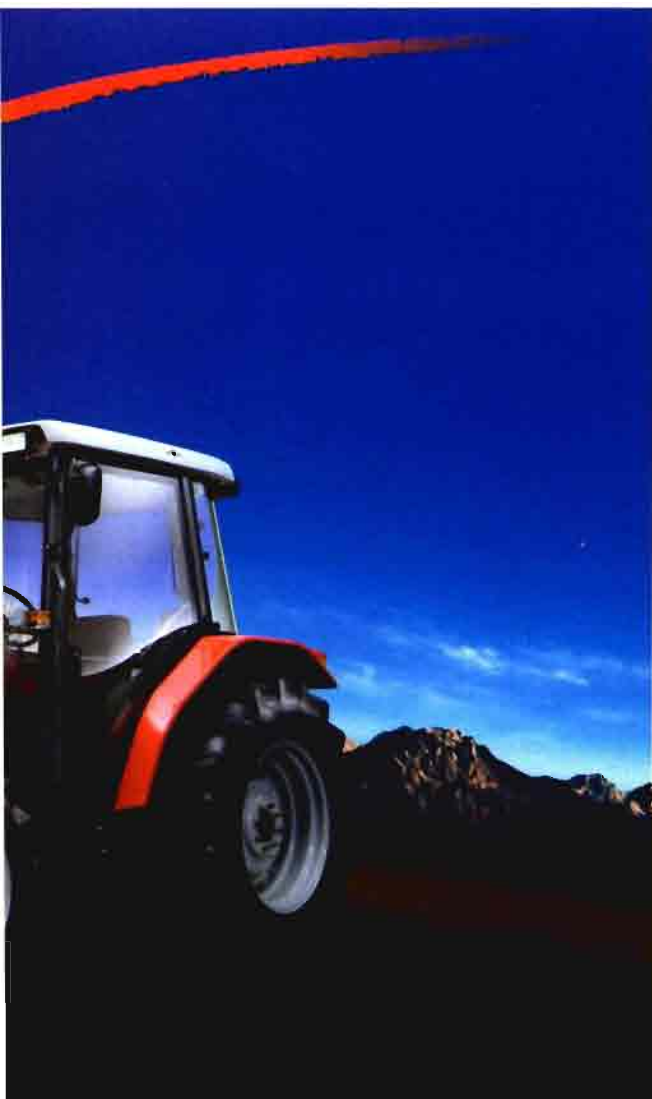


te, suele ser un buen promotor de la formación de callos si se añade al medio en concentración inferior a 1 mg/l, siendo muy efectivo en la inducción de embriogénesis somática, particularmente en gramíneas, aunque el desarrollo posterior de estos embrioides puede ser inhibido por este compuesto. Otras auxinas sintéticas utili-

zadas en cultivos celulares son el ácido 2,4,5,-triclorofenoxiacético (2,4,5,-T) y el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) etc.

Las citoquininas regulan la división celular y en los cultivos celulares suelen favorecer la diferenciación de tallos. Se emplean normalmente las citoquininas sintéticas kinetina (Kin) y la 6-bencil-aminopurina (BA) y la natural zeatina. Estas sustancias que se añaden exógenamente, no son esenciales, ya que algunos tejidos crecen indefinidamente sólo con auxinas.

Además de los compuestos mencionados existen otras sustancias reguladoras de crecimiento que pueden ejercer algún control en la morfogénesis como son, las giberelinas, el ácido abscísico (ABA) y el etileno. Así el ABA generalmente es un inhibidor natural del crecimiento y a menudo tiene una influencia positiva en la maduración de embrioides somáticos, reduciendo las anomalías frecuentemente observadas en su desarrollo. La acción más normal de las giberelinas es la estimulación de la elongación de los tallos. El etileno al tratarse de un gas, ha sido ignorado durante mucho tiempo en cultivos de tejidos vegetales, sin embargo existen estudios sobre la influencia de este compuesto en la orga-



Ahora, las formas de la Agricultura están cambiando. Ahora, hay una nueva generación de agricultores muy especializados. Y para ellos ha nacido una nueva estrella, para satisfacer sin límite todas sus necesidades.

Una nueva estrella diferente, con la posibilidad de tres nuevos tipos de tractor: Standard, Alta Visibilidad o Perfil inclinado.

Una nueva estrella que es muy potente, que monta motores de nuevo diseño y un nuevo elevador por caudal y presión. La transmisión puede ser elegida entre una gama amplísima, siempre con una sola palanca de accionamiento, e incluso con inversor para reducir los ciclos de trabajo. La relación peso-potencia y el increíble radio mínimo de giro son dos características particulares de esta nueva estrella. Y toda ella arropada con unas novísimas, confortables, y más que nunca espaciosas cabinas de seguridad.

Y en cualquier caso, ofreciendo un gran rendimiento y unos altísimos niveles de productividad.

La Serie MF 4200 está formada por una galaxia de estrellas. Sin límites, porque ofrecen al agricultor todo lo que necesita para su explotación: una calidad de muchas estrellas.

**4200**  
50-110 DIN HP



MASSEY FERGUSON

**SIN LÍMITES**



## SEMILLAS • TÉCNICAS DE CULTIVO

nogénesis y la citodiferenciación Huxter et al. (1981), y se ha comprobado que en algunas especies inhibe el desarrollo de los embrioides.

Así pues, aunque una de las hipótesis más aceptada sea que la organogénesis está regulada por cambios cuantitativos en el balance entre ciertos constituyentes del medio nutritivo (Sánchez-Grás M.C. and Calvo M.C. 1996) y del balance auxina/citocinina. Dependiendo del nivel endógeno de ambos compuestos en el tejido, la adición de sustancias reguladoras del crecimiento provocan resultados contradictorios en muchas especies cultivadas "in vitro".

### Vitaminas

Las vitaminas ejercen funciones catalíticas en los sistemas enzimáticos y se requieren únicamente en cantidades mínimas. Aunque el mioinositol es un carbohidrato, normalmente se considera junto a las vitaminas, pues no es adecuado como fuente de carbono. Este compuesto rara vez es esencial aunque su efecto beneficioso ha sido probado en numerosos casos.

Algunos autores piensan que la única vitamina requerida en cultivos celulares es



la tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), mientras que el ácido nicotínico (niacina) y la piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) pueden estimular el crecimiento. En casos determinados otras vitaminas pueden ejercer un efecto estimulante como por ejemplo el ácido fólico y la biotina. Kao y Michayluk en 1975, incluyeron numerosas vitaminas adicionales en cultivos de *Vicia hajastana* pero no ha sido

posible demostrar los requerimientos específicos de la mayoría de las sustancias incluidas.

### Aminoácidos y suplementos orgánicos complejos

Generalmente los aminoácidos no se incluyen en los medios de cultivo a excepción de la glicina. Ahora bien, en algunos casos es necesario suplementar el medio nutritivo con compuestos orgánicos que sirvan como fuente de nitrógeno reducido, para ello se añade una gran variedad de extractos complejos naturales como pueden ser, leche de coco, hidrolizado de caseína o extracto de malta. No obstante, y siempre que sea posible, es conveniente eliminar de los medios nutritivos el empleo de extractos naturales complejos debido al desconocimiento que existe normalmente de su composición química y de su modo de acción a nivel molecular.

### FACTORES FÍSICOS

Las condiciones físicas en las que se mantienen los cultivos de tejidos vegetales "in vitro" pueden afectar el crecimiento y desarrollo de los mismos, entre estos factores pueden destacarse:

# NUEVA SERIE 4200 LA GAMA MÁS LÓGICA

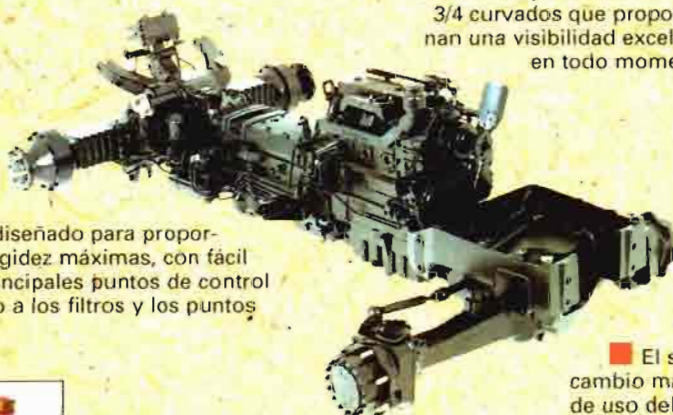


■ Nuevos motores Perkins, que utilizan la tecnología más reciente, y alcanzan unas prestaciones y una economía imbatibles.

■ Magnífica nueva cabina y controles que dan un confort y una facilidad de uso extraordinarios. Gran zona acristalada y cristales traseros 3/4 curvados que proporcionan una visibilidad excelente en todo momento.

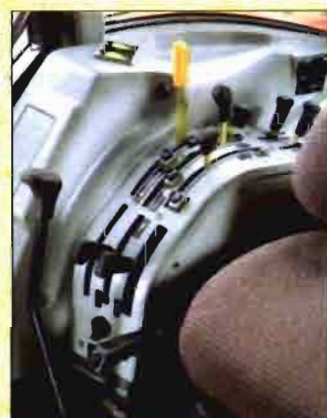


■ El bastidor se ha diseñado para proporcionar resistencia y rigidez máximas, con fácil accesibilidad a los principales puntos de control y facilitando el acceso a los filtros y los puntos de llenado y vaciado



■ Alta capacidad del elevador "Ferguson", el mejor sistema de control del mundo, con dos bombas hidráulicas independientes.

■ El sistema de cambio más sencillo de uso del mercado. Los controles, simples y eficientes, están agrupados a la derecha del conductor.



MASSEY FERGUSON

AGCO Iberia, S. A.

Vía de las Dos Castillas 33, Atica 7 · (Edificio 6)  
28224 Pozuelo de Alarcón (Madrid)

### El método de esterilización

El medio de cultivo de tejidos vegetales puede ser esterilizado mediante autoclave o bien por filtración, siendo más utilizado el primer procedimiento, aunque numerosos componentes del medio pueden descomponerse, alterarse o bien reaccionar con otras sustancias al ser expuestos a altas temperaturas. Así por ejemplo la sacarosa en combinación con otros compuestos puede caramelizarse pudiendo ser tóxica para los cultivos celulares.

Un gran número de aminoácidos y sustancias reguladoras de crecimiento son lábiles a altas temperaturas, por ejemplo la glutamina, el ácido indolacético, el ácido giberélico y la 6-bencil-aminopurina. También la tiamina puede ser degradada en parte, al ser sometida a altas temperaturas, poniéndose de manifiesto sobre todo cuando los niveles de este aminoácido son limitantes (Linsmaier y Skoog, 1965). En estos casos se hace necesaria la esterilización por filtración.

### El pH del medio

Por lo general el pH de los medios de cultivo se ajusta entre 5 y 6 antes de esterilizar y añadir el agar. Algunos investigadores han variado significativamente estos valores del pH, obteniendo resultados interesantes.

La mayoría de los medios de cultivo están pobremente tamponados y las fluctuaciones de pH que ocurren pueden ser perjudiciales para la supervivencia y crecimiento de las células, en estos casos se hace necesario añadir al medio sustancias tamponadoras, por ejemplo MES, para que el crecimiento celular sea posible.

### La luz

Los cultivos de tejidos vegetales no son fotosintéticamente eficientes e incluso, por lo general, no son autotróficos. No obstante, al igual que las características de la radiación influyen en el desarrollo de la planta también afectará a los procesos morfogenéticos de los cultivos. El tiempo de exposición (fotoperíodo), la calidad de la luz e intensidad de la misma influye en el comportamiento y metabolismo de los cultivos, afectando a las actividades enzimáticas que participan en la biosíntesis de diferentes compuestos (Hahlbrock et al., 1980).

### La temperatura

Existe poca información sobre la temperatura óptima para el crecimiento y mucho menos para la producción de metabolitos secundarios. Por lo general, los cultivos "in vitro" se mantienen a una temperatura entre 25-27°C de forma rutinaria, pero la óptima para el crecimiento de cada cultivo debería ser investigada individualmente para cada especie.



### PRINCIPALES METODOS DE MICROPROPAGACIÓN

La obtención de plantas es el pilar indiscutible de la metodología del cultivo de células y tejidos "in vitro". Sin ella, la hibridación de protoplastos, los estudios de crecimiento y diferenciación, la generación de genotipos variantes, el cultivo de anteras, el clonaje, la eliminación de enfermedades mediante el cultivo de meristemos y muchos estudios sobre reguladores del crecimiento serían imposibles.

La propagación asexual utilizando las técnicas del cultivo de células y tejidos vegetales "in vitro" puede realizarse siguiendo el esquema que se muestra en la figura 1. En ella se observa que la obtención de plantas puede realizarse por morfogénesis directa o indirecta a partir de un explanto o bien mediante el cultivo de meristemos y/o de ápices caulinares.

### Regeneración de plantas "in vitro" por morfogénesis

Las células vegetales en cultivo pueden expresar en un momento dado, y en condiciones adecuadas su totipotencia, siguiendo una ruta organogénica que conduce al desarrollo de meristemos caulinares y/o radiculares, o una ruta embriogénica que implica la formación de embriones somáticos o zigóticos.

Cualquier especie vegetal puede ser regenerada "in vitro" utilizando métodos diversos. La eficiencia depende de la especie, del tejido u órgano cultivado y del procedimiento elegido. La regeneración de plantas puede llevarse a cabo mediante tres métodos: cultivo de embriones, embriogénesis somática y organogénesis.

El cultivo de embriones se realiza cultivando asépticamente un embrión zigótico. El embrión se aísla de la semilla o del óvulo y se implanta en un medio nutritivo que sustituya al endospermo; el desarrollo subsiguiente y la germinación tiene lugar como si se tratase de una semilla.

La embriogénesis somática o asexual es la producción de estructuras embriogénicas

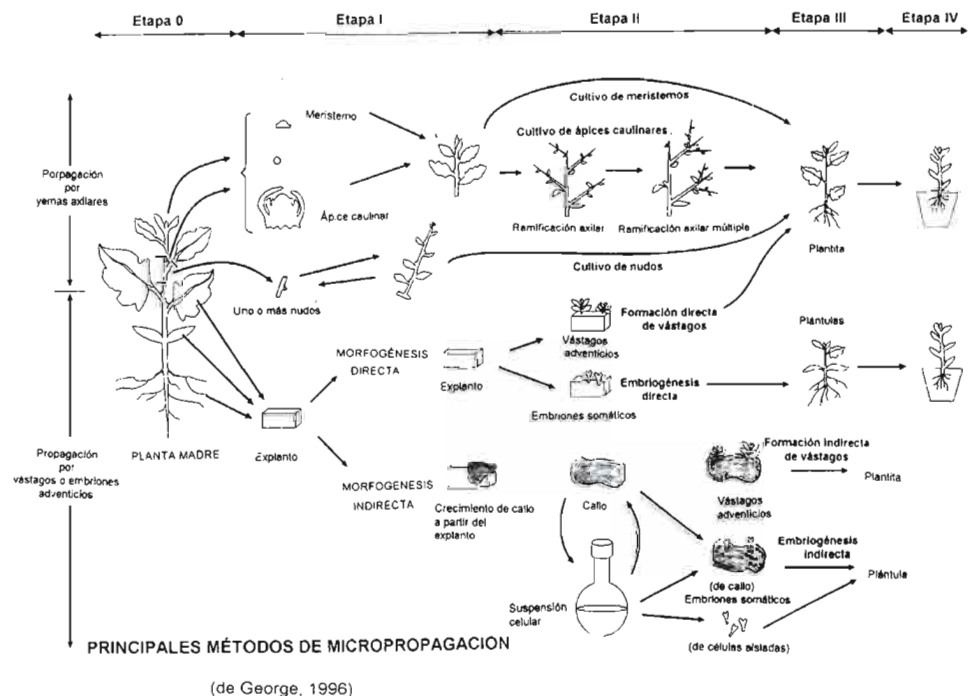


Fig.1. Diferentes métodos de obtención de plantas mediante el cultivos "in vitro" de tejidos vegetales.



originadas en células somáticas. Un embrión somático es una estructura bipolar independiente que no está físicamente unido al tejido que la origina. Estos embrioides, término que generalmente se utiliza para diferenciarlo de los embriones zigóticos, pueden desarrollarse y germinar dando lugar a plántulas a través de la misma serie de acontecimientos correspondientes a la germinación de embriones zigóticos.

La organogénesis puede iniciarse a partir del explanto, morfogénesis directa o a partir de callos, morfogénesis indirecta. La regeneración de vastagos se inicia con la formación de zonas de células meristemáticas (meristemoides) capaces de responder a determinados factores, dentro del tejido, y originar así un primordio. Dependiendo de la naturaleza de estos factores internos, el estímulo podría iniciar la formación de una raíz, un tallo o un embriode, no obstante se desconocen los factores que regulan el origen de estas zonas meristemáticas. La iniciación del proceso es asincrónico y, en ocasiones, impredecible, pero en cualquier caso sólo unas cuantas células están implicadas, originándose el crecimiento de tallos a partir de callos o a partir de yemas axilares generadas en cultivos de ápices y la subsecuente formación de raíces. Los tallos y raíces así formados son estructuras unipolares y conectados físicamente al tejido que la origina.

En resumen la regeneración de plantas por organogénesis puede llevarse a cabo de tres formas:

a) Mediante la producción de órganos adventicios a partir de callos derivados de un explanto.

b) Por la formación de órganos adventicios originados directamente en el explanto, sin que intervenga la fase de callo.

Por la formación de plántulas a partir de yemas.

El estudio de los factores que regulan la organogénesis es difícil, aunque se piensa que el control del proceso esta determinado por:

- 1) Genotipo del material cultivado.
- 2) Estado fisiológico de la planta donadora
- 3) Composición química del medio
- 4) Factores ambientales del cultivo
- 5) Reguladores del crecimiento.

La acción de estos factores no se puede generalizar existiendo varias hipótesis sobre su modo de acción. La más aceptada es que la organogénesis está regulada por el balance cuantitativo de todos los constituyentes que componen el medio. Así la adición o no de diferentes compuestos orgánicos puede influir en la intensidad de la respuesta y también en el modelo de diferenciación.

### CULTIVO DE MERISTEMOS Y APICES CAULINARES

Durante los últimos años se está utilizando la técnica de cultivo "*in vitro*" como una medida alternativa de la propagación asexual para plantas con interés económico. Se trata de un sistema de propagación vegetativa a partir de cultivos de tejidos meristemáticos. Se utilizan como explantos tanto meristemos de tallos, como ápices de tallos o bien yemas apicales, tomando la zona del meristemo apical, o con más frecuencia la región meristemática subapical. Cuando la eliminación viral no es parte del objetivo, es preferible partir de ápices de tallos y de yemas apicales que de cultivo de meristemos.

Para el cultivo de ápices caulinares o

meristemos por micropopagación de numerosas especies vegetales se necesita la contribución de tres medios diferentes: uno para el establecimiento del cultivo del ápice caulinar, otro para la multiplicación de tallos y un tercero para el enraizamiento (Hiraoka y Oyanagi, 1988).

Existen tres posibles rutas para la multiplicación de propágulos "*in vitro*": a) aumentando la relación de yemas axilares; b) producción de yemas adventicias por medio de una ruta organogénica; c) por embriogénesis somática. Todas ellas presentan una serie de ventajas e inconvenientes. Así, en la regeneración "*in vitro*" por organogénesis y embriogénesis somática, se producen más variaciones en el desarrollo pues por lo general es necesario un paso previo de inducción de callos, con la subsecuente reorganización dentro de las plántulas para obtener la planta completa. Sin embargo, utilizando el método de proliferación de yemas axilares a partir de cultivos de meristemos, ápices de tallos o yemas apicales solamente se requiere la elongación del tallo y la diferenciación de raíces para originar la nueva planta aunque este hecho no ha podido ser demostrado en muchas especies vegetales.

Cuando se da una formación previa de callo se origina un incremento en la frecuencia de cambios genéticos, especialmente si se produce una poliploidia o una aneuploidia, resultantes de anomalías mitóticas, mientras que las plantas derivadas de cultivos de meristemos, ápices de tallos y yemas apicales son prácticamente estables genéticamente, lo que produciría material uniforme para experimentación o para producción de protoplastos.

A pesar de que el nivel de multiplicación de plántulas por vía organogénica o por vía



embriogénica es muy alto, este disminuye rápidamente después de varios subcultivos y en algunos casos se llega a perder su potencial morfogénico. Sin embargo, el porcentaje de multiplicación por proliferación de yemas axilares, que en un principio es relativamente bajo, va aumentando en progresión geométrica durante los primeros subcultivos, hasta llegar a un punto en que la producción alcanza una estabilidad. Todo esto hace que económicamente la regeneración por este método sea beneficiosa, pues, un único explanto, en un año, es capaz de producir millones de plantas, que pueden servir como fuente continua de propágulos, aunque hubiera que renovar periódicamente dicha reserva con cultivos de explantos frescos. Así mismo, no se puede olvidar que esta técnica se puede utilizar cuando los métodos organogénicos y embriogénicos fallan como alternativa

para la producción comercial de algunas especies (George 1993 y 1996)

### CONCLUSION

La micropropagación de plantas a partir del cultivo de células y tejidos "in vitro", es un método de regeneración útil, ya que proporciona un sistema simple con el que se pueden efectuar múltiples estudios fisiológicos, como el del control del crecimiento, la dormición de yemas, ciclos reproductivos y otros procesos fisiológicos de las yemas, tales como explicar el papel de los reguladores de crecimiento en su desarrollo. Además esta técnica presenta, para muchas especies, múltiples ventajas sobre otros métodos convencionales de propagación asexual en invernaderos, entre ellas podemos citar:

1) Solo es necesaria una pequeña cantidad de tejido vegetal como explanto inicial

para obtener la regeneración de millones de clones vegetales en un año, mientras que por métodos convencionales se necesitarían años para obtener una cantidad igual de clones.

2) Es un método alternativo que puede resultar útil sobre todo para aquellas especies que no pueden propagarse por otros procedimientos.

3) Es una técnica que proporciona un método adecuado para el intercambio de material vegetal, y si se emplean bien los conceptos de esterilidad, se puede eliminar el peligro de introducción de enfermedades, con lo cual el periodo de cuarentena puede reducirse o suprimirse.

4) Se elimina la dependencia estacional como ocurre con la práctica convencional y por lo tanto las reservas "in vitro", pueden proliferar rápidamente después del embarque o almacenamiento.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BROWN, S., WETHERELL, D. F., DOUGALL, D. K. (1976). The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. *Physiol. Plant.* 37: 73-79.

CLARKSON, D. T., HANSON, J. B. (1980). The mineral nutrition of higher plants: *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 239-298.

GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., OJIMA, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.

GAUTHERET, R. J. (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sc.* 208: 118-120.

GEORGE E. F., DAVID J. M., PUTTOCK B. Sc. And GEORGE H. J. (1987). "Plant Culture Media": Volume 1. Formulations and uses. Exegetics Limited. Edington, Westbury. Wilst BA 13 4QG, England.

GEORGE E. F., DAVID J. M., PUTTOCK B. Sc. And GEORGE H. J. (1988). "Plant Culture Media": Volume 2. Commentary and Analysis. Exegetics Limited. Edington, Westbury. Wilst BA 13 4QG, England.

GEORGE E. F. (1993). "Plant Propagation by Tissue Culture": Part 1 The Technology. 2<sup>nd</sup> Edition. Exegetics Limited. Edington, Westbury.

Wilst BA 13 4QG, England.

GEORGE E. F. (1996). "Plant Propagation by Tissue Culture": Part 2 In Practice. 2<sup>nd</sup> Edition. Exegetics Limited. Edington, Westbury. Wilst BA 13 4QG, England.

HABERLANDT, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber Akad. Wiss. Wien., Math.- Naturwiss. Kl., Abt. 1*, 111: 69-92.

HAHLBROCK, K., SCHRÖDER, J., VIIEGGE, J. (1980). Enzyme regulation in parsley and soybean cell cultures. *Advances in Biochemical Engineering* 18: 39-60.

HELLER, R. (1953). Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux cultivés "in vitro". *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 14: 1-223.

HIRAOKA, N., OYANAGI, M. (1988). *In vitro* propagation of *Glenia littoralis* from shoot tips. *Plant Cell Rep.* 7: 39-42.

KAO, K. N., MICHAYLUK, M. R. (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126: 105-110.

LINSMAIER, E. M., SKOOG, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

NOBÉCOURT, P. (1939) Sur les radicules nées des cultures de tissus végétaux. *C.R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.* 130: 1271-1272

NOBÉCOURT, P. (1939). Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C.R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.* 130: 1270-1271.

SANCHEZ-GRAS M.C. and CALVO M.C. (1996). Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 259-261.

SCHENCK, R. U., HILDEBRANDT, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.

SKOOG, F., MILLER, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.

SKOOG, P., TSUI, C. (1948). Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured "in vitro". *Am. J. Bot.* 35: 782-787.

STREET, H. E. (1977). Introduction. En: *Plant Tissue and Cell culture.* (H. E. Street, ed.), pp 1-10. Blackwell Scientific. Publications, Oxford

WHITE, P.R. (1939). Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am. J. Bot.* 26: 59-64.