

Disertación del Académico Correspondiente Ing.Agr. Luis A. Mroginski

**Sr. Presidente de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria,
Sr. Rector de la Universidad Nacional del Nordeste,
Sres. Académicos,
Autoridades, colegas, alumnos, amigos:**

Después de escuchar las palabras que aquí se han dicho, la mayoría inmerecidas, realmente me siento muy emocionado y me resulta muy difícil concentrarme en lo que debe ser mi disertación.

Antes que nada debo agradecer a la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria el honor que me ha otorgado al haberme nombrado Académico Correspondiente.

Es este el momento oportuno para hacer público mi reconocimiento hacia personas e instituciones que han contribuido a mi formación. Agradecimiento para mis padres y hermanos de los cuales aprendí muchas cosas, entre ellas el valor de la palabra y del trabajo. Me transmitieron la alegría de vivir con cosas simples y sencillas.

Vaya mi agradecimiento a mi esposa y mis hijos, Gracias Ketty, María Andrea, Erika y Javier por vuestro sacrificio y comprensión.

Al Académico Ing. Agr. Antonio Krapovickas y a la Dra. Carmen Cristóbal por la orientación que me brindaron y por el estímulo que siempre encontré en ellos con su ejemplo de trabajo y pasión por la botánica.

A todos mis compañeros de trabajo, muchas gracias, pues sin ellos nada podría hacer.

Por lo menos a cuatro instituciones debo recordar en estos agradecimientos:

A la Cooperativa Agrícola Limitada de Oberá, Misiones que, mediante un Préstamo de Honor contribuyó a que se hiciera realidad el sueño de ese joven de Picada Sueca de ser Ingeniero Agrónomo

Al CONICET y al National Research Council del Canadá por haber hecho posible el perfeccionamiento de mi formación profesional.

A esta Facultad por haberme cobijado en sus aulas, y brindado el espacio necesario para el desarrollo de mis actividades, pero por sobre todas las cosas por el ambiente de libertad académica que garantiza que cualquier hijo de esta Casa de Estudios - como lo soy- pueda sentirse cómodo en ella. Es éste, sin duda, mi segundo hogar, y es por eso que quiero que este reconocimiento vaya también para esta Facultad y esta Universidad.

Veinticinco años con el cultivo de tejidos de Leguminosas

Debo comenzar esta disertación con algunas aclaraciones con respecto al título. En primer término, por qué Leguminosas?. Ello tiene que ver con la importancia de esta familia de plantas que, con algo así como 650 géneros y más de 18.000 especies, constituye la tercer familia dentro de las Angiospermas (Polhill *et al* 1981). Biológicamente su importancia se ve reflejada por su papel en la fijación del

nitrógeno molecular mediante la simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. Las Leguminosas con un aporte de 56.986.726 Tn. (FAO, 1998) constituyen el tercer grupo productor de alimentos, sólo superadas por los cereales y por las denominadas plantas tuberosas. Además tienen una enorme importancia en la alimentación animal y algunas especies son utilizadas como forestales y también como ornamentales. Las Leguminosas y la Agronomía van estrechamente ligadas y ello explica el por qué me atrajo esta familia.

En segundo lugar, por qué veinticinco años?. En realidad, podrían haber sido treinta años porque fue en 1968 cuando rendí examen de Genética y Fitotecnia y una pregunta del Ing. Agr. Antonio Krapovickas, sobre la obtención de plantas haploides a partir del cultivo de anteras de *Datura innoxia* (Guha and Maheshwari, 1964, 1966), despertó mi curiosidad y mis deseos de hacer algo parecido con el maní y con las especies silvestres del género *Arachis*. Pero, fue recién en 1973 en que se pudo plasmar lo que podría llamarse con mucha buena voluntad un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. En un rincón de un aula se aisló un pequeño espacio de unos 3 m² donde se construyó un precario cubículo de madera que, esterilizado con luz UV hacía las veces de cámara de transferencia. Una olla a presión familiar era el autoclave; había que medir el pH y pesar las sustancias químicas en otro edificio; los frascos de mermelada (traídos por los alumnos) y 100 tubos de ensayo tomados en préstamo a la cátedra de Botánica (y aún no devueltos!!!) constituían el material de vidrio; las macetas eran latas de aceite que se conseguían en los basurales de las estaciones de

servicio y el papel de aluminio utilizado para obturar los frascos conteniendo los medios derivaban de los paquetes de cigarrillos. En lo técnico recibimos muchos y valiosos consejos del Dr. Osvaldo Caso. En estas condiciones comenzamos a jugar con lo que era el cultivo *in vitro* de tejidos. La falta de medios no se notaba en un ambiente de enorme alegría que significaba el poder trabajar con absoluta libertad en un tema que nos gustaba. No teníamos, además que soportar las presiones que hoy alteran a nuestros becarios. Para ese entonces ya se había incorporado Hebe Rey, quien realizó su trabajo final de graduación (Rey, 1976) y en 1974 ya tenía plantas de mandioca obtenidas por cultivo de meristemas, prácticamente al mismo tiempo que lo que se menciona en la literatura como la primera planta de mandioca obtenida por esa vía (Kartha, et al 1974). Lamentablemente no publicamos ese trabajo a tiempo. Posteriormente el grupo se amplió, al igual que el laboratorio y los temas de trabajo.

En tercer lugar, por qué cultivo de tejidos?, definido aquí en su acepción amplia, como el cultivo de un explante (parte separada de un vegetal, como podría ser un meristema, un embrión, células aisladas o protoplastos) en un medio de cultivo de composición química definida e incubado en un ambiente controlado.

En este sentido comenzamos a trabajar con el objetivo de desarrollar sistemas *in vitro* que hicieran posible la regeneración de plantas con vistas a su utilización en la agricultura para, dependiendo de la especie cultivada:

- Obtener plantas con sanidad controlada.
- Micropropagar plantas seleccionadas por su aptitud agronómica.

- Conservar e intercambiar germoplasma.
- Incrementar la variabilidad genética a través de la obtención de :
 - 1) Híbridos interespecíficos con la ayuda del rescate y cultivo *in vitro* de embriones
 - 2) Plantas haploides mediante el cultivo *in vitro* de anteras, microsporas u óvulos .
 - 3) Variantes somaclonales.
 - 4) Híbridos somáticos mediante la fusión de protoplastos.
 - 5) Plantas genéticamente transformadas.

Rápidamente nos dimos cuenta que con el avance logrado por las ciencias biológicas se iban desarrollando técnicas para el estudio de las plantas a nivel celular y molecular. Estos enfoques, conocidos colectivamente como Biotecnología , se estaban convirtiendo en herramientas

poderosas para el mejoramiento de las plantas y el progreso de la Agricultura. Dentro de la Biotecnología Vegetal el “cultivo *in vitro* de tejidos” adquiría cada vez mayor importancia por las aplicaciones en la Agricultura que comenzaban a surgir (micropropagación, obtención de plantas con sanidad controlada, de haploides y de híbridos interespecíficos mediante la ayuda del rescate y cultivo de embriones) y porque ya se avizoraba como una suerte de puente necesario para llevar los logros de las manipulaciones genéticas del laboratorio al campo. Pero para el logro de todos estos objetivos se debía contar con sistemas *in vitro* que brindaran como producto final plantas enteras. Y en 1973, estos sistemas eran relativamente escasos. Se podían cultivar diferentes explantes, se obtenían callos, eventualmente raíces, pero la regeneración de vástagos y/o plantas enteras no era lo común. Dentro de las plantas de interés agronómico solamente se destacaban como modelos el tabaco y la zanahoria.

Cuadro 1.- Regeneración *in vitro* de plantas de Leguminosas (hasta 1973) *

Sistemas Géneros	“Organos”				Suspensiones celulares	Protoplastos
	Embrión cigótico	Meristemas	Anteras	Otros		
<i>Glycine</i>	--	--	--	X ?	--	--
<i>Lotus</i>	X	--	--	--	--	--
<i>Medicago</i>	--	--	X	X	--	--
<i>Phaseolus</i>	X	--	--	--	--	--
<i>Trifolium</i>	X	--	--	X	--	--

* Datos extraídos de Mroginski and Kartha, 1984 y de Hammatt *et al*, 1986

Con las Leguminosas, en 1973 (Cuadro 1), la regeneración *in vitro* de plantas se limitaba a especies de unos pocos géneros. En *Lotus*, *Phaseolus* y *Trifolium*, había trabajos que informaban acerca de la obtención de plantas mediante el cultivo de embriones cigóticos. Con la alfalfa se informaba acerca de la obtención de plantas de anteras y de hipocótilo. Murashige (1974) contabilizaba que había información acerca de regeneración *in vitro* de plantas en 143 géneros (solamente 3 de Leguminosas) de 56 familias. Narayanaswamy (1977) expresaba: "...*The degree of regeneration varied considerably from species to species. Among those that*

have been highly regenerative are members of the family Solanaceae, Umbelliferae, Cruciferae, Compositae and a few of the Leguminosae...". Keller and Stringam (1978), refiriéndose al cultivo de anteras, decían: "...*However, a major group in which very little progress has been made and in which more study are required are the Leguminosae...*". Por este motivo los cultivadores de tejidos de esa época le habían concedido, a las Leguminosas, el título de "*recalcitrant plants*". Esta situación justificaba que los logros obtenidos con el empleo de estas técnicas se limitaba a la obtención de híbridos interespecíficos (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Aplicaciones del Cultivo *in vitro* de tejidos de Leguminosas (hasta 1973)

Aplicaciones Géneros	Híbridos Inter-específicos	Micropropagación	Haploides	Semilla Sintética	Variantes somaclonales	Híbridos somáticos	Transgénicas
<i>Glycine</i>	--	--	--	--	--	--	--
<i>Lotus</i>	X	--	--	--	--	--	--
<i>Medicago</i>	--	--	--	--	--	--	--
<i>Phaseolus</i>	X	--	--	--	--	--	--
<i>Trifolium</i>	X	--	--	--	--	--	--

Los maníes fueron muy fáciles de cultivar *in vitro*: Los callos se obtenían con suma facilidad pero lo que no se lograba era la regeneración de plantas completas (Mroginski y Fernández, 1979), hasta que finalmente tuvimos éxito con dos especies silvestres de *Arachis* (Mroginski y Fernández, 1980). Estas plantas (Fig. 1A y B) contribuyeron enormemente a que prosiguiera con el cultivo de tejidos y merced a una beca externa del CONICET, pude trabajar en el Prairie Regional Laboratory (Hoy, Plant Biotechnology Institute), del National Research Council del Canadá. Para los cultivadores de tejidos era "el laboratorio de Gamborg". Estaba (y está) en Saskatoon, Saskatchewan. Allí, a partir del congelado Enero de 1980, bajo la dirección de Frederick

Constabel y Kutty Kartha tuve la suerte de trabajar con cultivo de "órganos", suspensiones celulares y protoplastos . Asimismo pude conocer la metodología de la criopreservación de plantas a las temperaturas ultrabajas (-196°C) del nitrógeno líquido. Conseguimos regeneración *in vitro* de plantas de varias Leguminosas: 1) *Arachis hypogaea*, mediante el cultivo de hojas inmaduras (Mroginski, et al, 1981). De esta especie y de soja, caupí, garbanzo y poroto, también desarrollamos los protocolos para la obtención de plantas por cultivo de meristemas (Kartha et al, 1981).2) *Stylosanthes guianensis*, una especie de importancia en pasturas tropicales (Mroginski and Kartha, 1981a) y 3) Arveja (Mroginski and Kartha, 1981b ; Rubluo et al, 1984).



Figura 1: Regeneración de plantas de especies silvestres del género *Arachis*. Por cultivo *in vitro* de anteras. A- *A. sp* (leg. Hammons *et al*, 559). B- *A. lignosa*.

Luego del ansiado regreso al país en 1983, hubo que armar algo que ahora sí podía llamarse un laboratorio de cultivo de tejidos. Contamos con el apoyo de la Universidad Nacional del Nordeste, del CONICET, de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación (a través de su programa de Biotecnología), del Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología y de empresas de la región. Y aunque las listas de especies con las que trabajamos se amplió considerablemente seguimos siendo fieles a las Leguminosas y al género *Arachis* -Fig. 3-(Burtnik

y Mroginski, 1985; Prado *et al*, 1988) y a *Stylosanthes* (Rey *et al*, 1985; Saccani, *et al*, 1995). Nuevos géneros incorporados a nuestros estudios fueron: *Lotononis* (Bovo *et al*, 1986), *Desmodium* (Angeloni *et al*, 1988; Rey and Mroginski 1997), *Centrosema* (Angeloni *et al*, 1992b), *Gleditsia*, *Prosopis* (Angeloni *et al*, 1992a), *Medicago* (Mroginski *et al*, 1995, Fig. 2A , B y C), *Leucaena* (Suster *et al*, 1995), *Enterolobium* (Del Fabro *et al*, 1995) y *Aeschynomene* (Rey and Mroginski, 1996).

Cuadro 3.- Regeneración *in vitro* de plantas de Leguminosas (hasta 1998)

Sistemas Géneros	"Organos"				Suspensiones celulares	Protoplastos
	Embrión	Meristemas	Anteras	Otros		
<i>Medicago</i> <i>Lotus</i> <i>Trifolium</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Stylosanthes</i>	--	X	X	X	X	X
<i>Arachis</i>	X	X	X	X	--	--
<i>Glycine</i> <i>Phaseolus</i>	X	X	--	X	--	--
<i>Pisum</i>	--	X	--	X	--	--
<i>Vigna</i>	X	--	--	X	--	X
<i>Vicia</i>	X	X	--	--	--	X
<i>Desmodium</i>	X	--	--	X	--	--
<i>Melilotus</i>	X	--	--	--	--	--
<i>Ornithopus</i>	X	--	--	--	--	--
Otros 42 géneros	--	--	--	X	--	--

Cuadro 4.- Aplicaciones del Cultivo *in vitro* de tejidos de Leguminosas (hasta 1998)

Aplicaciones Géneros	Híbridos Inter-específicos	Micropropagación	Haploides	Semilla Sintética	Variantes somaclonales	Híbridos somáticos	Transgénicas
<i>Medicago</i>	X	X	X ?	X	X	X	X
<i>Lotus</i>	X	X	X ?	--	X	--	X
<i>Trifolium</i>	X	X	X ?	--	X	X	--
<i>Arachis</i> <i>Phaseolus</i> <i>Vicia</i>	X	X	--	--	--	--	X
<i>Glycine</i> <i>Vigna</i>	X	X	--	--	--	--	X
<i>Stylosanthes</i>	--	X	--	--	X	--	--
<i>Lens</i>	X	X	--	--	--	--	--
<i>Pisum</i> y otros 5 géneros	--	X	--	--	--	--	X
<i>Ornithopus</i> <i>Melilotus</i>	X	--	--	--	--	--	--
Otros 40 géneros	--	X	--	--	--	--	--

Simultáneamente, en el mundo se iban logrando interesantes avances en cuanto a la regeneración de plantas de Leguminosas a través del cultivo de tejidos. Estos trabajos elevaban –en 1998- a 55 la cantidad de Géneros en los que, mediante algún sistema *in vitro*, era factible obtener plantas enteras (Cuadro 3). Con *Medicago*, *Lotus* y *Trifolium* existía información sobre la regeneración de plantas mediante el cultivo de embriones cigóticos, meristemas, anteras, suspensiones celulares y protoplastos. Probablemente el condicionamiento más importante era la utilización de genotipos adecuados. Con otros géneros, si bien la eficiencia no era similar, se habían hecho notables avances en los últimos 25 años. Esta situación hizo posible que el cultivo de tejidos fuera aplicado exitosamente

(Cuadro 4) especialmente en el mejoramiento genético de varias especies de Leguminosas. De esta manera, se desarrollaron sistemas de micropropagación en, por lo menos, 48 géneros. El rescate y cultivo de embriones fue usado para la obtención de numerosos híbridos interespecíficos que involucraron a 7 géneros. Se ha explotado la técnica para la obtención de variantes somaclonales y en dos géneros se han obtenido híbridos somáticos mediante la fusión de protoplastos. En por lo menos 5 géneros se ha informado la obtención de plantas transgénicas. Asimismo la alfalfa es actualmente una planta modelo en lo que se refiere a la producción de semillas sintéticas generadas por encapsulamiento de embriones somáticos (Fig.2A, B y C).

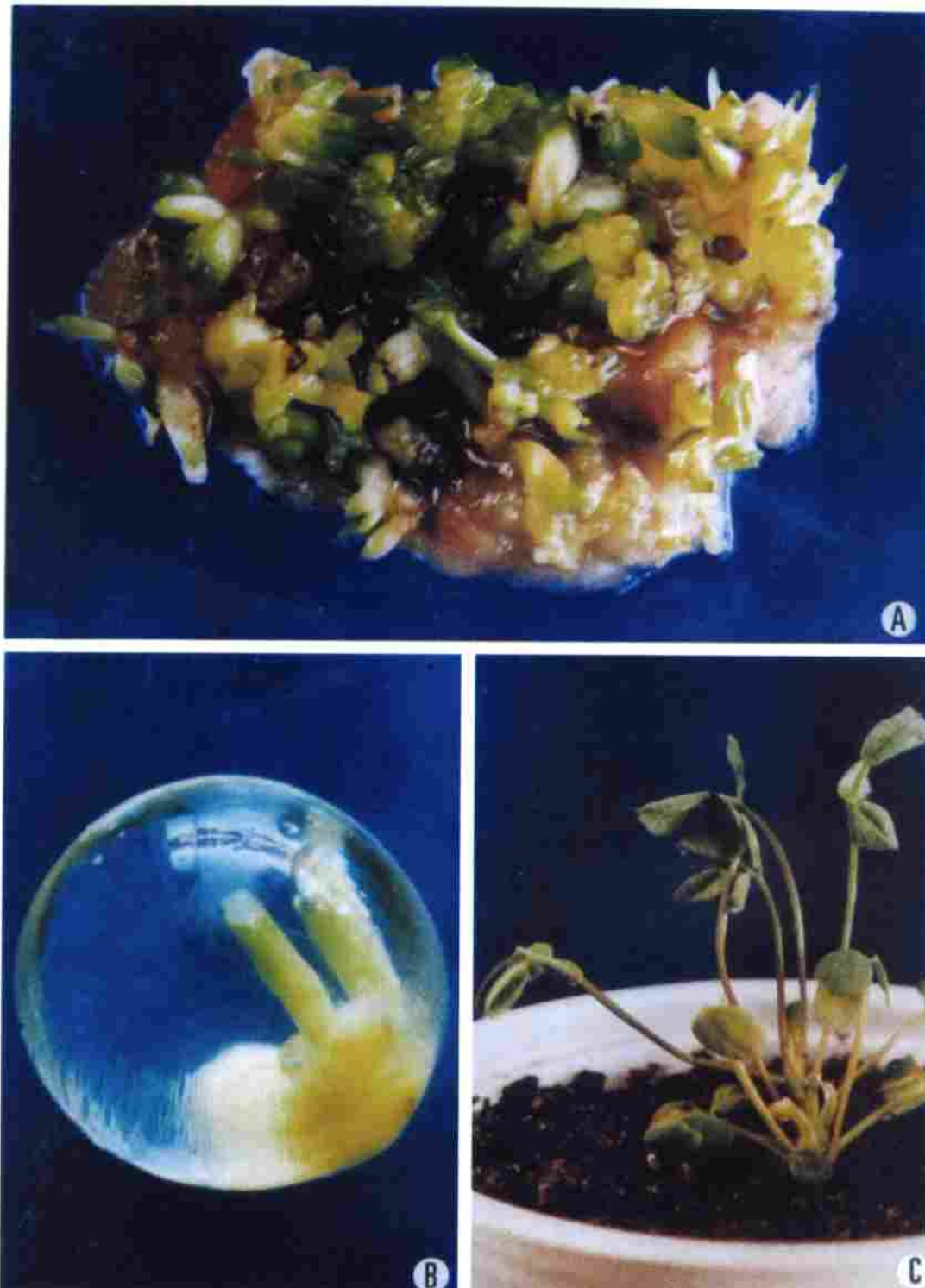


Figura 2: Semilla sintética de *Medicago sativa*. A- Callo, obtenido por cultivo de explantes foliares, con embriones somáticos. B- Semilla sintética. C- Planta obtenida por conversión (germinación) de una semilla sintética.

De ahora en más quedan muchas cosas por hacer y los jóvenes tienen el desafío de tratar de entender mejor las bases de la regeneración de plantas. No me caben dudas que en los próximos años asistiremos a avances realmente notables en este sentido. Sólo me resta pedir que sus trabajos estén guiados por la visión de Gottlieb Haberlandt y por la pasión de

un botánico boliviano, Martín Cárdenas quien alguna vez escribiera "Al consagrar por entero mi vida a estudiar la naturaleza de Bolivia, no he perseguido más propósito que honrarla y prestigiarla en el Mundo Científico. Pido a Uds. seguir mi ejemplo en recuerdo mío".

Nada más y agradezco a todos la grata compañía que me han brindado y la atención dispensada.

Bibliografía

- Angeloni, P., H. Y. Rey y L.A. Mroginski. 1988. Cultivo *in vitro* de tejidos de *Desmodium incanum* y *D. affine* (Leguminosae). *Phyton* 48 (1/2): 71-76.
- Angeloni, P.N., L.A. Mroginski, H.Y. Rey, E.A. Flachslund y M.C. Inda. 1992a. Establecimiento *in vitro* de especies de los géneros *Gleditsia*, *Prosopis*, *Toona* y *Cedrela*. *FACENA* 9: 135-150.
- Angeloni, P.N., H.Y. Rey and L.A. Mroginski. 1992b. Regeneration of plants from callus tissue of the pasture legume *Centrosema brasilianum*. *Plant Cell Reports*. 11: 519-521.
- Bovo, O.A., L.A. Mroginski and H.Y. Rey. 1986. Regeneration of plants from callus tissue of the pasture legume *Lotononis bainesii*. *Plant Cell Reports* 5: 295-297.
- Burtnik, O.J. y L.A. Mroginski. 1985. Regeneración de plantas de *Arachis pintoii* (Leguminosae) por cultivo *in vitro* de tejidos foliares. *Oleagineux* 40 (12): 609-612.
- Del Fabro, R., O.A. Bovo y L.A. Mroginski. 1995. Regeneración de primordios de vástagos mediante el cultivo de cotiledones y pínulas de *Enterolobium contortisiliquum* (Leguminosae). *Phyton* 57 (1) : 55-59.
- Guha, S. and S.C. Maheshwari. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura* *Nature* 204: 497.
- Guha, S. and S.C. Maheshwari. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature* 212: 97-98.
- Hammatt, N., T.K. Ghose and M.R. Davey. 1986. Regeneration in legumes. *Cell Cult. Somat. Cell Genet. Plants* 3: 67-95.
- Kartha, K.K., O.L. Gamborg, F. Constabel and J.P. Shyluk. 1974. Regeneration of cassava plants from apical meristems. *Plant Sci. Lett.* 2: 107-113.
- Kartha, K.K., K. Pahl, N.L. Leung and L.A. Mroginski. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. *Can.J.Bot.* 59: 1671-1679.
- Keller, W.A. and G.R. Stringam. 1978. Production and Utilization of Microspore-derived Haploid Plants. *In: Thorpe, T.A.(ed.). Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. University of Calgary. pp. 113-123.*
- Mroginski, L.A. y A. Fernández. 1979. Cultivo *in vitro* de anteras de especies de *Arachis* (Leguminosae). *Oleagineux* 34 :243-248.
- Mroginski, L.A. y A. Fernández. 1980. Obtención de plántulas por Cultivo *in vitro* de anteras de especies silvestres de *Arachis* (Leguminosae). *Oleagineux* 35:89-92.
- Mroginski, L.A. and K.K Kartha. 1981a .Regeneration of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. *Plant Sci.Lett.* 23: 245-251.
- Mroginski, L.A. and K.K. Kartha. 1981b. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L. cv. Century) plants by *in vitro* culture of immature leaflets. *Plant Cell Rep.* 1: 61-64.
- Mroginski, L.A. and K.K. Kartha. 1984. Tissue culture of Legumes for Crop Improvement. *Plant Breeding Reviews* 2:215-264.

- Mroginski, L.A., K.K. Kartha and J.P. Shyluk. 1981. Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by *in vitro* culture of immature leaves. *Can.J.Bot.* 59: 826-830.
- Mroginski, L.A., H. Rey, S. Olmos y V. González. 1995. Semillas artificiales para la propagación de plantas. *Paradigmas* 1: 5- 9.
- Murashige, T. 1974. Plant Propagation through tissue cultures. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of Plants from Tissue Cultures. *In*: Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj (eds.). *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 179-206.
- Polhill, R.M., P.H. Raven and C.H. Stirton. 1981. Evolution and Systematics of the *Leguminosae*. *In*: Polhill, R.M. and P.H. Raven (eds.) *Advances in Legume Systematics. Part 1*. Royal Botanical Garden. England. pp. 1-27.
- Prado, E.A., A.N. Secchi y L.A. Mroginski. 1988. Conservación de la capacidad caulogénica de callos de *Arachis major* (*Leguminosae*) durante prolongados subcultivos. *Turrialba* 38 (3) :249-254.
- Rey, H.Y. 1976. Cultivo *in vitro* de tejidos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Trabajo Final de Graduación. Facultad de Ciencias Agrarias UNNE). 30 pp.
- Rey, H.Y., O.A. Bovo y L.A. Mroginski. 1985. Cultivo *in vitro* de tejidos de tres especies de *Stylosanthes* (*Leguminosae*). *Agronomie* 5 (9) : 819-824.
- Rey, H.Y. and L.A. Mroginski. 1996. Regeneration of plants from callus tissue of *Aeschynomene* spp. (*Leguminosae*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 185-190.
- Rey H.Y and L.A Mroginski 1997. Regeneration of plants from callus tissue of *Desmodium affine* and *Desmodium uncinatum*. *Biologia Plantarum* 39: 309-313.
- Rubluo, A., K.K. Kartha, L.A. Mroginski and J. Dyck. 1984. Plant regeneration from pea leaflets cultured *in vitro* and genetic stability of regenerants. *J. Plant Physiol.* 117: 119-130
- Saccani, J.L.F., H.Y. Rey y L.A. Mroginski. 1995. Regeneración de plantas mediante el cultivo *in vitro* de hojas de *Stylosanthes macrosoma* y *S. montevidensis* (*Leguminosae*). *FACENA* 11: 11-18.
- Suster, G.A., H.Y. Rey, L.A. Mroginski y M.C. Goldfarb. 1995. Micropropagación de plantas jóvenes de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham (*Leguminosae*). *FACENA* 11: 3- 10.