



# APLICACIONES PRÁCTICAS DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

---

**ERICSON ARANZALES RONDON**

Ing. Producción Biotecnológica

[e.aranzales@cgiar.org](mailto:e.aranzales@cgiar.org)



OCTUBRE 30 DE 2008



1. CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA
2. OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE PATÓGENOS (CALIDAD FITOSANITARIA)
3. MICROPROPAGACIÓN Y PRODUCCIÓN MASIVA
4. MEJORAMIENTO VEGETAL
5. PRODUCCIÓN Y OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

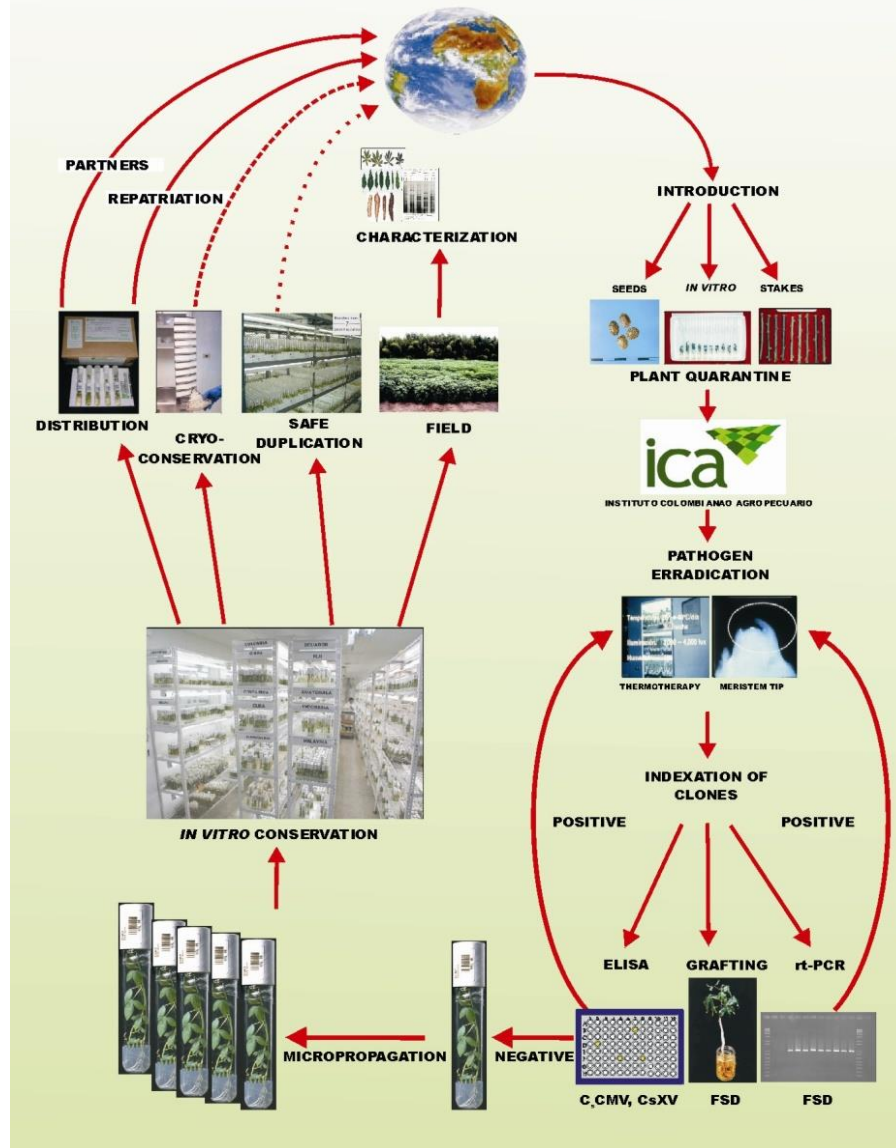


# 1. CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

- ✓ Estrategia de conservación *ex situ* usada como método complementario dentro de una estrategia de conservación de recursos fitogenéticos.
- ✓ Implica el mantenimiento de los explantes en un medio estéril y libre de agentes patógenos.
- ✓ Las técnicas *in vitro* ofrecen metodologías para la conservación y multiplicación de especies que producen semillas recalcitrantes o que no producen semillas.
- ✓ **USOS:** Introducción ó establecimiento, colecta, eliminación de patógenos, multiplicación, conservación y distribución e intercambio de germoplasma.



## Flow chart of operations for *Manihot* germplasm

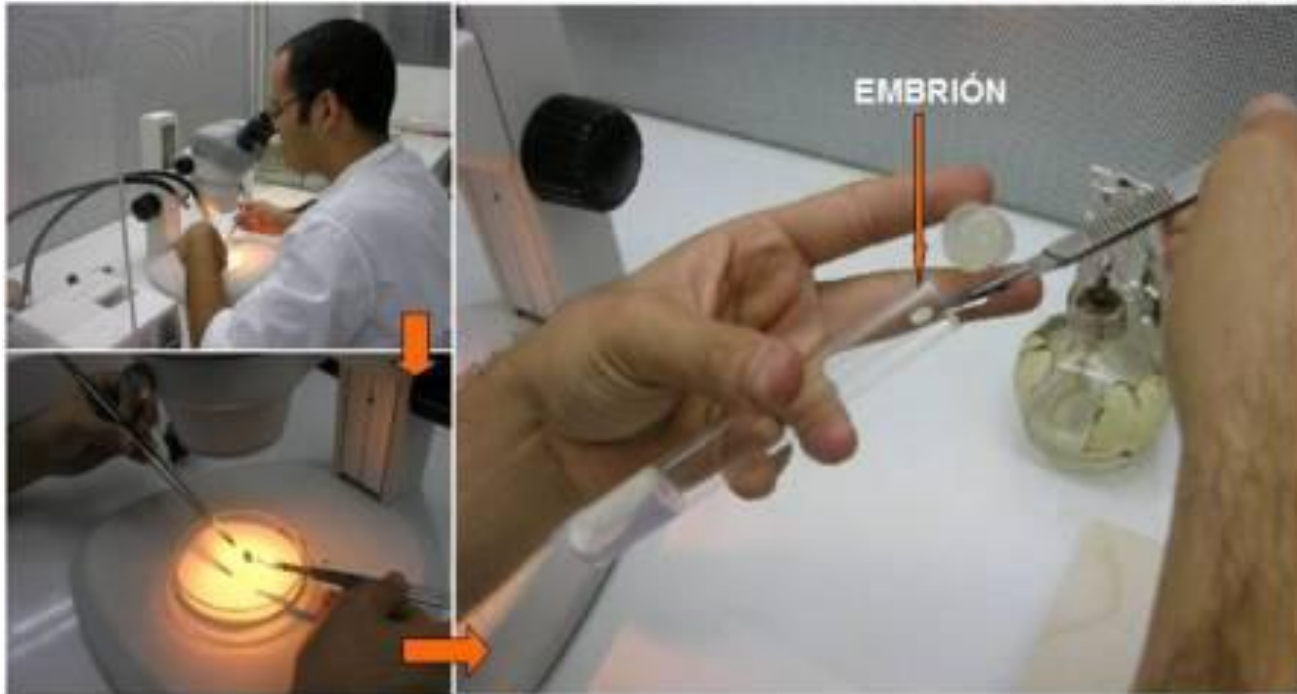


Fuente: URG-CIAT, 2008



# INTRODUCCIÓN DE GERMOPLASMA

## RESCATE DE EMBRIONES

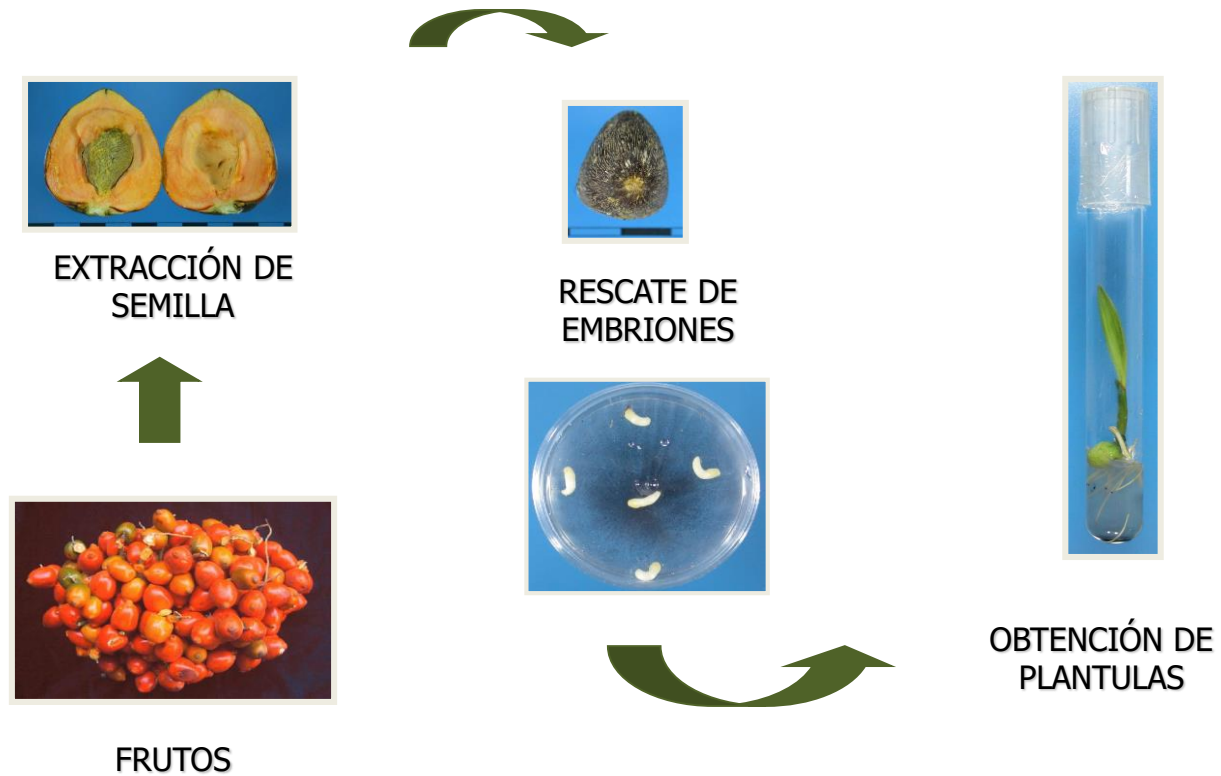


Proceso de excisión y siembra en el medio de cultivo desarrollado para embriones cigóticos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) [www.ciat.cgiar.org/urg](http://www.ciat.cgiar.org/urg)



# Fase 1. FASE ESTABLECIMIENTO *in vitro*.

## RESCATE DE EMBRIONES EN PALMAS



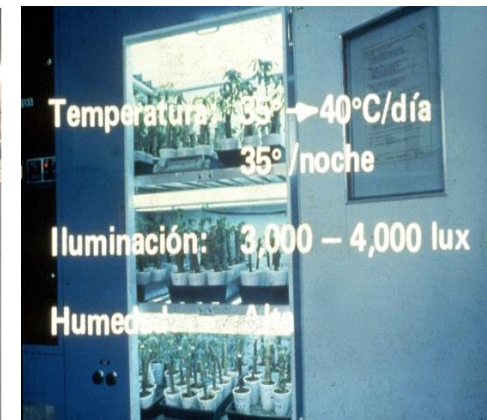
Fuente: Aranzales, 2005







## CULTIVO DE YEMAS Y MERISTEMOS



Selección en función del objetivo:

Yemas Apicales (> estables) Yemas Laterales (< estables)  
Saneamiento de material vegetal.



## COLECTA DE GERMOPLASMA

Consiste en tomar y transportar *in vitro* hasta el laboratorio tejidos vegetales viables denominados explantes (yemas, meristemos, embriones).

El explante se extrae, se esteriliza y se siembra en un medio de cultivo. La colecta *in vitro* se practica con especies cuyas muestras son difíciles de manejar, como las de reproducción vegetativa o de semilla no ortodoxa (recalcitrante).

Se ha usado para coleccionar coco ( *Cocos nucifera*), algodón ( *Gossypium spp.*), cacao ( *Theobroma cacao*), pastos y forrajes entre otros (Withers, 1995).





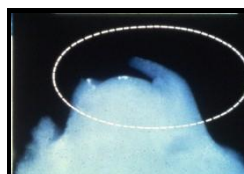
# ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS



ESTACAS

TERMOTERAPIA

40°C/35°C



MATERIAL *in vitro*

TERMOTERAPIA

37°C/35°C



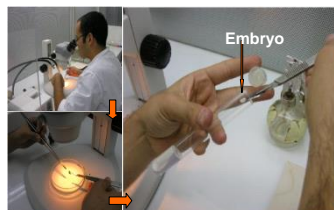
12 días



SEMILLAS

RESCATE DE

EMBRIONES



INDEXACIÓN

Fotoperiodo 12 horas  
Temperatura 26-28  
Medios 4E – 17N  
Intensidad lumínica 1000 lux

Fuente: URG-CIAT, 2008



# MULTIPLICACIÓN DE MATERIAL VEGETAL



**Proceso de micropropagación en yuca.** Las fotografías **a)**, **b)** y **c)** muestran el proceso de corte para la obtención de los explantes (ápices y yemas axilares), **d)** muestra la selección y siembra de los explantes en el medio, **e)** pueden verse el tubo rotulado y sellado, finalmente **f)** y **g)** los cuarto de crecimiento y conservación respectivamente a donde finalmente son llevados.

[www.ciat.cgiar.org/urg](http://www.ciat.cgiar.org/urg)



# CONSERVACIÓN *in vitro* – Mínimo crecimiento

## BANCO GENÉTICO *in vitro* ACTIVO (IVAG)

### MÍNIMO CRECIMIENTO

#### CONDICIONES FÍSICAS



#### CONDICIONES QUÍMICAS

##### Factores ambientales



Temperatura

Fotoperiodo

Intensidad lumínica

Recipientes de cultivo

[O<sub>2</sub>]

##### Composición del medio



Reguladores osmóticos

Reguladores de crecimiento (Relaciones h.)

Inhibidores del etileno

Agente gelificante



# CONSERVACIÓN *in vitro* – Crioconservación

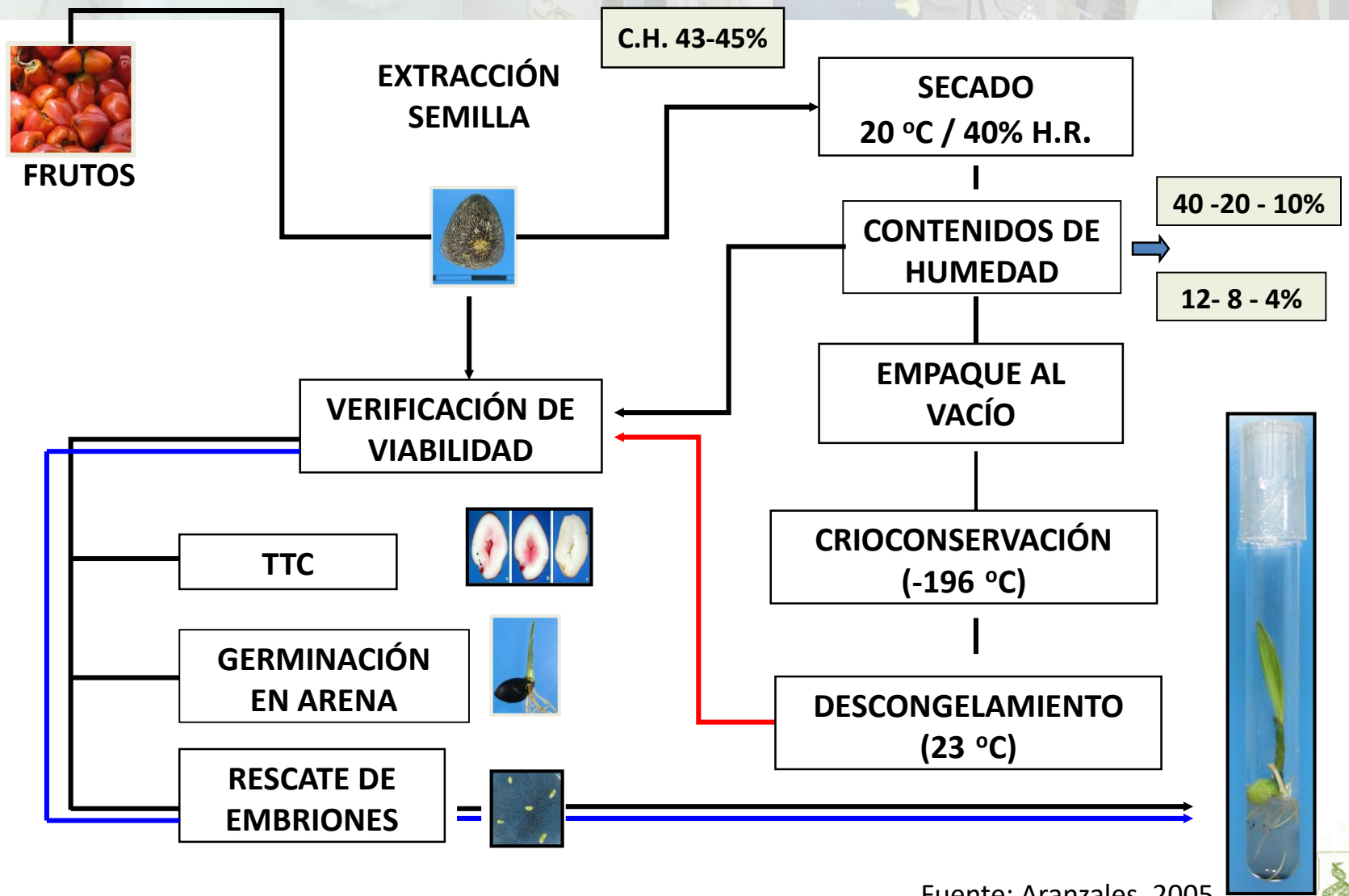
## BANCO GENÉTICO *in vitro* BÁSICO (IVBG)



- ✓ Las técnicas en las que ocurre supresión de crecimiento por almacenamiento del material a temperaturas ultra bajas ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), usualmente en nitrógeno líquido se denominan técnicas de crioconservación.
- ✓ A estas temperaturas la división celular y los procesos metabólicos se detienen, permitiendo el almacenamiento a largo plazo sin que sufra alteraciones o modificaciones (Engelmann, 1997).
- ✓ Útil para conservar especies de semilla no ortodoxa o de reproducción vegetativa, difíciles de conservar en cámaras o en campo (Ashmore, 1997; Engelmann, 2000).
- ✓ Técnicas clásicas y modernas (vitrificación).



# Metodología de crioconservación en semillas de palmas



Fuente: Aranzales, 2005

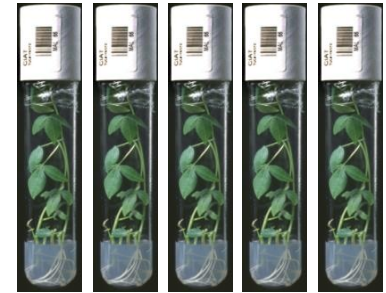




# DISTRIBUCIÓN E INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA

## RIESGO:

Transferencia o introducción accidental de plagas y patógenos asociados al material vegetal



## REQUISITOS:

Certificado fitosanitario expedido por la autoridad competente p. e. Colombia el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en el cual se explican los tratamientos y pruebas de detección de enfermedades aplicadas al material vegetativo.

El solicitante permiso de importación expedido por la autoridad competente del lugar de destino del material o la respectiva comunicación escrita en la que se informa la ausencia de requerimiento de este para el ingreso del material vegetal al país de destino.





## ESQUEMA DE DISTRIBUCIÓN DE GERMOPLASMA DE YUCA URG- CIAT



ANTECEDENTES	➔	Solicitud de Germoplasma Aceptación del SMTA
LOGISTICA	➔	Selección de materiales Preparación del envío Micropopagación
DOCUMENTACIÓN	➔	Lista de materiales Manual de procedimientos Base de datos-URG
REQUERIMIENTOS	➔	Certificado Fitosanitario Permiso de Importación

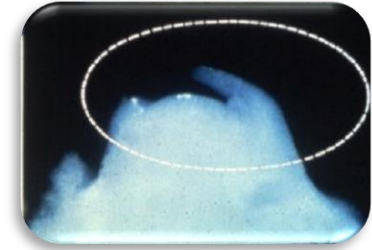
[www.ciat.cgiar.org/urg](http://www.ciat.cgiar.org/urg)



# 2.OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE PATÓGENOS

## CULTIVO DE MERISTEMOS

El meristemo es un pequeño tejido (0.2-0.3 mm) localizado en la parte apical de la yema.



La técnica consiste en aislar asépticamente la región meristemática de la yema vegetativa apical o axilar, juntamente con 1-2 de los primordios foliares más jóvenes, e implantarla en un medio de cultivo estéril.

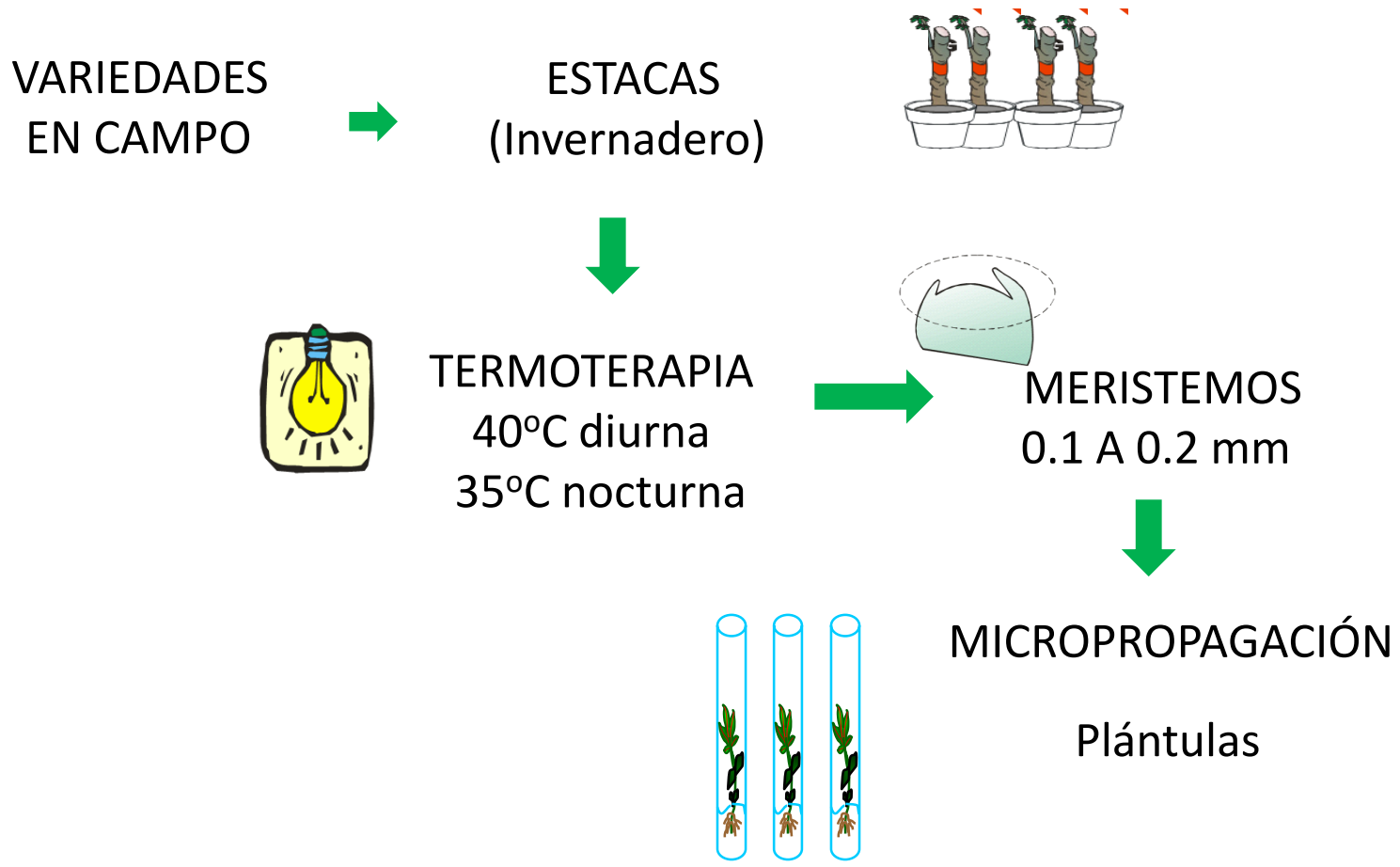
Las características morfológicas (ausencia de tejido vascular y conexiones plasmodesmáticas pequeñas), unida a la activa multiplicación celular que allí ocurre, puede explicar la baja concentración o la ausencia de virus en ese tejido (Wu *et al.*, 1960).

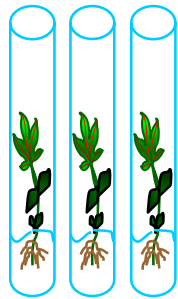




# OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE PATÓGENOS

## CASO: Yuca





Banco de germoplasma

TERMOTERAPIA

Invernadero



PROCESOS DE INDEXACIÓN



Hojas

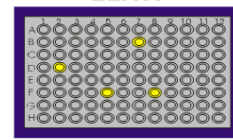


Estacas



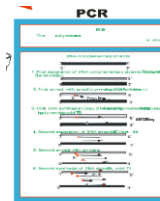
PRUEBA DE ELISA Y PCR

ELISA



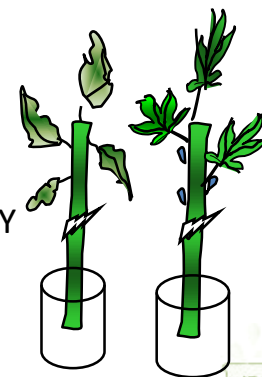
CMMV, CsXV, ACMV

PCR



CMMV

INJERTOS



INJERTOS NEGATIVOS Y POSITIVOS

OBTENCION DE RESULTADOS

Conservación de plantas bajo condiciones de invernadero

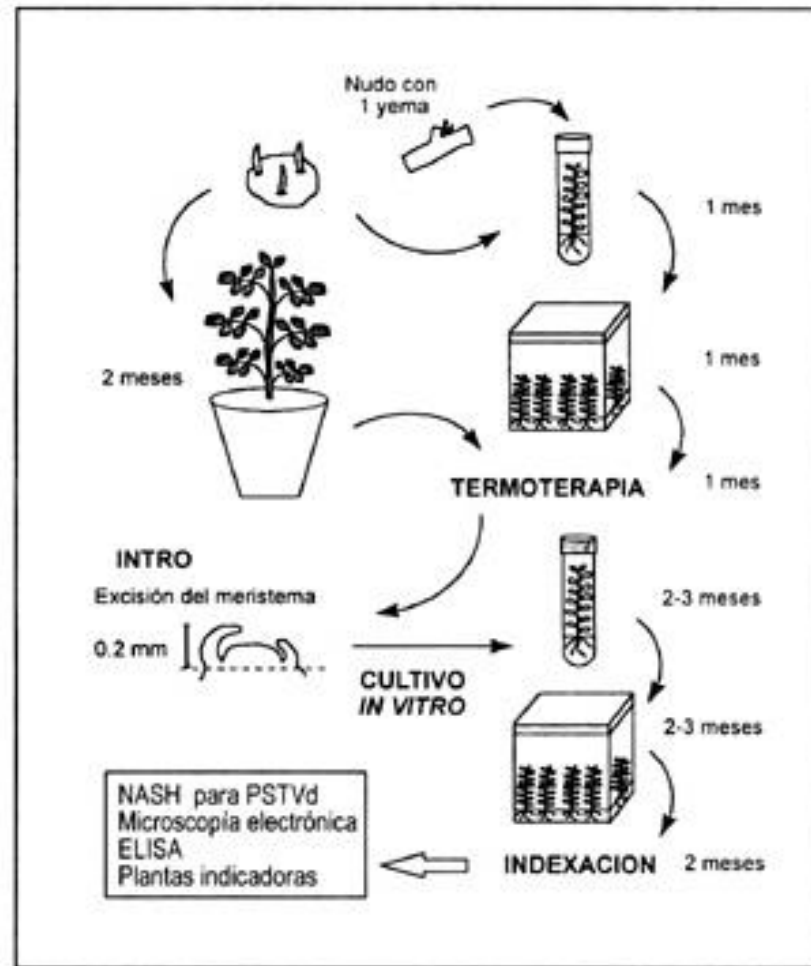
COLECCIÓN BONSAI

Fuente: N.C. Flor, 2004





# CASO: Papa



Representación esquemática del proceso de erradicación de virus que se realiza con fines de producción de semilla el Centro Internacional de la Papa –CIP.

Fuente: Panta & Golmirzaier- CIP



# 3. MICROPROPAGACIÓN Y PRODUCCIÓN MASIVA

## FASES O ETAPAS

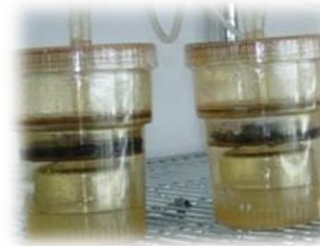
**Fase 0.** FASE INICIAL

**Fase 1.** FASE ESTABLECIMIENTO *in vitro*

**Fase 2.** FASE DE MUTIPLICACIÓN

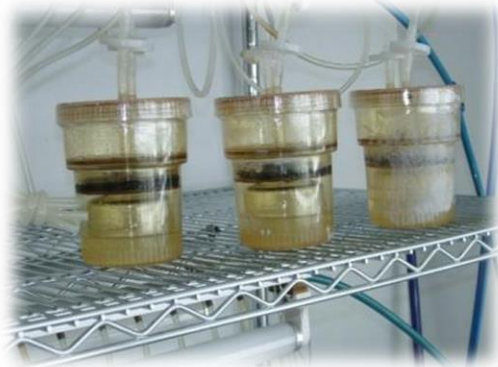
**Fase 3.** FASE DE ENRAIZAMIENTO

**Fase 4.** FASE DE ACLIMATIZACIÓN

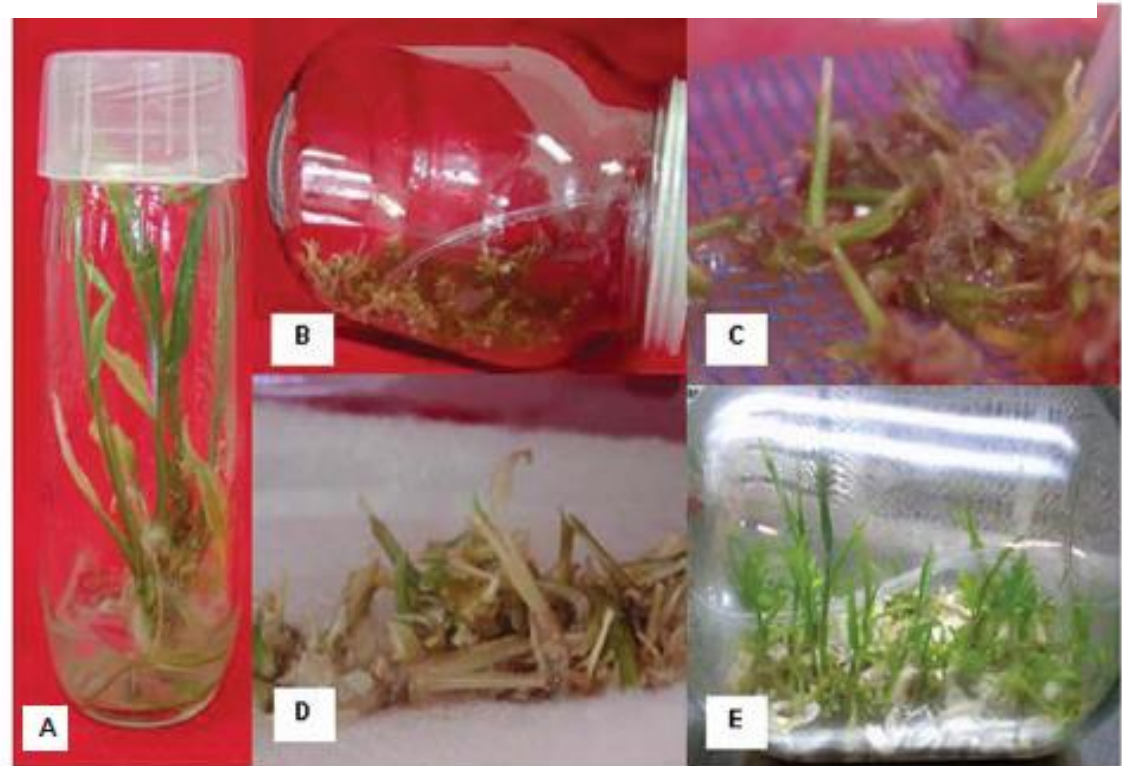
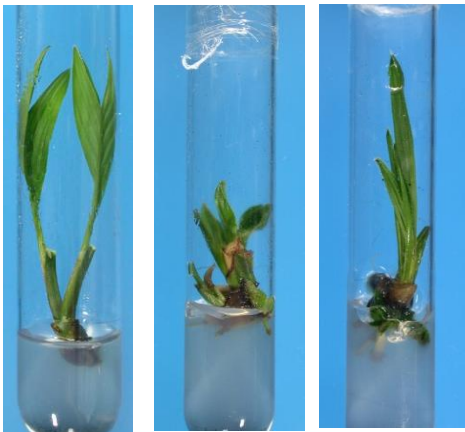


# VASO FERMENTADOR DE BAJO COSTO PARA LA MICROPROPAGACIÓN MASIVA DE JENGIBRE<sup>1</sup>

*Alejandro Hernández-Soto<sup>2</sup>, Andrés Gatica-Arias<sup>3</sup>, Silvana Alvarenga-Venutolo<sup>4</sup>*



Sistemas de propagación masiva a bajo costo



**Figura 1.** Características morfológicas de los explantes de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivados en: A. Medio de multiplicación en estado semisólido. B. Modelo simple. C. Modelo de la rejilla. D. Modelo de la espuma. E. Modelo de las piedras inertes. Cartago, Costa Rica. 2003.



## 4. MEJORAMIENTO VEGETAL

**Obtención de híbridos interespecíficos.** Ayuda para la obtención de híbridos derivados de cruzamientos interespecíficos, donde se produce el aborto temprano de embriones. En estos casos, el explante cultivado es el embrión cigótico en estadios tempranos de su desarrollo. Con la misma finalidad también se utilizan ovarios u óvulos fecundados.

**Obtención de plantas haploides** (considerando como haploide a un esporofito que contiene el complemento gamético de cromosomas). En este caso, los explantes más utilizados son las anteras, aunque también pueden emplearse microsporas aisladas, óvulos y ovarios no fertilizados.

**Inducción de variación somaclonal.** En este caso se pueden utilizar varios explantes, pero si la finalidad de su utilización es la aplicación en planes de **mejoramiento** genético de plantas, los explantes utilizados deben posibilitar la regeneración de plantas







**Obtención de híbridos somáticos.** Para esta finalidad se recurre a la fusión de protoplastos. En la mayoría de los casos se aíslan los protoplastos de mesófilos de hojas y de suspensiones celulares.

## APLICACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS DE INTRODUCCIÓN DE GENES VEGETALES

Varias estrategias se aplican en ingeniería genética para obtener:

- Plantas tolerantes a infecciones virales
- Plantas tolerantes a los insectos y resistentes a los herbicidas
- Mejoramiento de la calidad nutricional de los cultivos





# 5. PRODUCCIÓN Y OBTENCIÓN DE M. SECUNDARIOS

Las plantas son fuente de una amplia variedad de compuestos químicos, **METABOLITOS SECUNDARIOS**, utilizados como fármacos, pesticidas, colorantes, saborizantes y fragancias, entre otros.

**Desventajas** Su acumulación en las plantas es baja y lenta, ya que está regulada espacial y temporalmente. Es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés (Verpoorte *et al.*, 2002). Estado Particular de Diferenciación Celular.

Puede existir alta variabilidad entre poblaciones e inclusive entre individuos.

Plantas silvestres → colecta hábitat natural



amenaza o en peligro de extinción



## Ventajas

Alternativa para desarrollar **BIOPROCESOS** a partir de células vegetales *in vitro* para la producción de compuestos químicos de alto valor agregado.

Combinación de estrategias agregación (acumulación), selección de líneas y la adición de precursores (diferenciación e individualización).

- ✓ Sistemas de cultivo

  - Tipo de explantes cultivados

- ✓ Condiciones de cultivo

  - Optimización del medio de cultivo- parámetros

  - Adición de potenciadores, precursores biosintéticos

  - Extracción continua del producto

- ✓ Genética y Biología Vegetal

  - Enzimas y rutas metabólicas



## Ejemplos

Después de más de 40 años de investigación y desarrollo tecnológico, los casos exitosos que justifican técnica y económicamente su operación a nivel comercial son limitados (Trejo-Tapia & Rodríguez-Monroy, 2007).

VID (*Vitis vinifera* var. red globe)



**ANTOCIANINAS** conocidas por tener propiedades antioxidantes, anticancerígenas y cardiotónicas.

Árbol (*Taxus brevifolia* L.)



**TAXOL<sup>®</sup>** actividad citotóxica 1kg / corteza de 1000 árboles (Kieran *et al.*, 1997).

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don



**VINBLASTINA** potente antileucémico 1gr / ½ tonelada de hojas secas (Sottomayor *et al.*, 2004).



# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

## OBTENCIÓN DE BIENES Y SERVICIOS = BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Las técnicas de cultivo de tejidos constituyen una importante herramienta de apoyo en el desarrollo de investigación agrícola.

Las técnicas de manipulación genética son importantes en el contexto general de la agricultura moderna. La biotecnología vegetal se encarga de conectar áreas básicas de la biología molecular y de biología celular con las prácticas agrícolas tradicionales.



A photograph showing a person in a white lab coat holding a test tube over a hand in a field. The background is a blurred agricultural field with rows of crops. The word "GRACIAS" is overlaid in large green letters.

# GRACIAS

[e.aranzales@cgiar.org](mailto:e.aranzales@cgiar.org)