

A diferencia de las células de los animales, las células vegetales tienen la capacidad inherente de regenerar un organismo completo cuando, en condiciones controladas y asépticas, se aíslan de la planta y cultivan en un medio nutritivo artificial. Esta técnica se conoce con el nombre genérico de "cultivo de tejidos".

Aunque el potencial del cultivo de tejidos en varias actividades de la producción agrícola sólo ha sido demostrado en los últimos 20 años, la investigación en este campo ha sido referida como el "láser botánico" cuyos numerosos usos están todavía por ser totalmente conocidos. Avances registrados recientemente en la fisiología y genética celular y molecular ayudarán a entender mejor y por lo tanto a controlar el proceso de clonaje y generación de plantas *in vitro*, requerimiento básico para desarrollar un sistema de manipulación *in vitro* aplicable a la agricultura.

La regeneración de plantas por cultivo de tejidos puede ocurrir como una continuación del crecimiento y desarrollo de estructuras organizadas separadas de la planta (ej: meristemas aplicables y auxiliares del tallo) (Fig. 1), o puede ser el resultado de un proceso de formación de novo, a partir de células o grupos de células donde no existía organización alguna; estas células pueden derivarse de los órganos vegetativos (somáticos) o de las estructuras sexuales (gaméticas) de la planta. La formación de plantas *de novo* puede ocurrir a través de la diferenciación de embriones que se inicia en células individuales (embriogénesis somática y asexual) o vía la diferenciación de órganos vegetativos (organogénesis) que se inicia en grupos de células. La regeneración de plantas *in vitro* depende de varios factores, siendo los más importantes la variedad de planta, la clase de tejido a cultivar y la composición del medio de cultivo. Este último normalmente contiene los nutrientes inorgánicos mayores (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio) y menores (hierro, cobre, molibdeno, boro, sodio), una fuente de energía (sacarosa), algu-

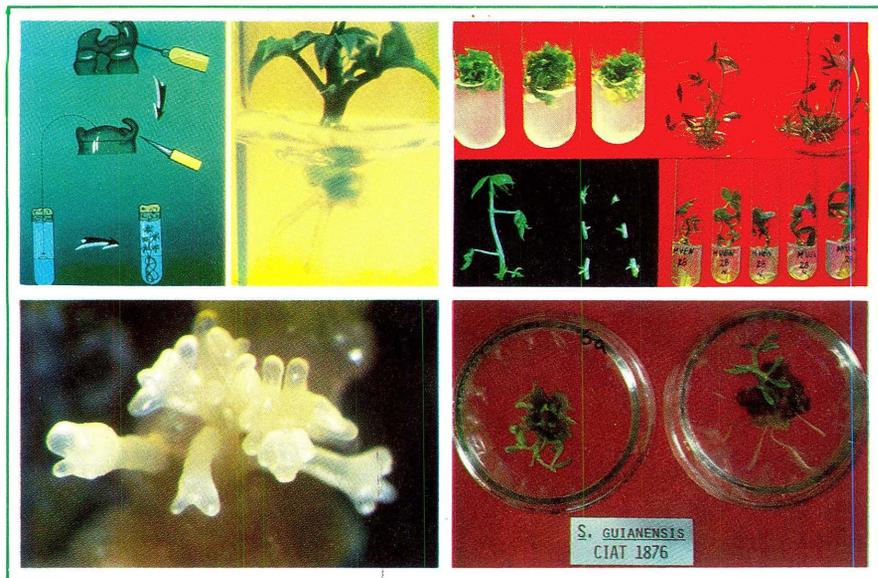


Figura 1. Regeneración de plantas *in vitro*: A. Disección, corte y "siembra" de meristemas apicales del tallo (izquierda) y una plántula de yuca crecida a partir de un meristema (derecha). B. Multiplicación masiva de la yuca por cultivo de meristemas (arriba) y corte de nudos (abajo). C. diferenciación de embriones somáticos a partir de una porción de hoja de yuca. D. Diferenciación de vástagos y raíces en un grupo de células de *Stylosanthes*.

# CLONAJE DE CELULAS VEGETALES "IN VITRO":

## APLICACIONES EN AGRICULTURA

William Roca\*

Cuadro 1. Rendimiento de la yuca (var. Secundina) en relación a la forma de propagación\*

Propagación	Rendimiento		
	Raíces t/ha	Almidón t/ha	Reducción del rendimiento %
Cultivo <i>in vitro</i> **	24.0 a	7.9 a	0
Tradicional (plantas sin síntomas)	19.6 b	6.2 b	18.3
Tradicional (plantas con síntomas)	14.7 c	4.5 c	38.7
Tradicional (plantas sin seleccionar)	7.3 d	2.4 d	69.5

\* Adaptado de: Lozano, C., Jayasinghe, U., y Pineda, B. Boletín de Yuca, Vol. 7, 1983.

\*\* Plantas regeneradas por cultivo de meristemas de clones infectados con una enfermedad viral de la Costa Norte de Colombia.

nas vitaminas (tiamina, ácido nicotínico), compuestos orgánicos complejos (caseína hidrolizada, etc) y varias fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas). De la concentración y balance de estas últimas dependerá en gran medida el tipo de proceso de las células y tejidos cultivados *in vitro*: proliferación celular, diferenciación de yemas y vástagos o diferenciación de raíces.

### APLICACIONES

La regeneración de plantas *in vitro* puede resultar en la conservación de las características originales de la variedad o puede liberar inesitabilidades que se manifiestan en plantas genéticamente alteradas. De aquí que las aplicaciones de las técnicas de cultivo de tejidos comprendan dos grandes áreas: propagación clonal y generación de variabilidad.

#### Propagación Clonal

Se han desarrollado esquemas de propagación masiva *in vitro*. Este método es una forma económica y rápida para aumentar el rendimiento y la calidad de plantas alimenticias atacadas por enfermedades causadas por virus o bacterias (Cuadro 1).

Grandes colecciones de variedades pueden ser conservadas *in vitro*. El alto costo del mantenimiento en el campo y el riesgo de perder materiales debido al ataque de plagas y enfermedades, cambios climáticos y problemas de suelos, pueden ser reducidos o eliminados aplicando un sistema de conservación *in vitro* a plantas como yuca, papa, camote, caña de azúcar, plátano, etc. (Cuadro 2).

La colección *in vitro* de yuca mantenida en el CIAT actualmente incluye más de 2.500 variedades. Además, los clones libres de enfermedades pueden ser intercambiados *in vitro* entre países y continentes minimizando así los riesgos de diseminar plagas y enfermedades.

\* Fisiólogo de plantas, científico principal, unidad de Investigación en Biotecnología, CIAT, A.A. 6713, Cali.

Así, en los últimos 6 años se han transferido más de 1.500 variedades de yuca de Latinoamérica al CIAT, usando las técnicas *in vitro*.

#### Generación de Variabilidad

- **Cruzamientos amplios.** Después de la polinización se disectan los embriones inmaduros, se cultivan *in vitro* y regeneran plantas híbridas que de otra forma no sería posible debido al aborto del embrión (Cuadro 2).
- **Obtención de haploides por cultivo de anteras.** Los granos de polen contenidos en la antera tienen sólo la mitad de cromosomas de la especie (haploidía), además, los granos de polen de plantas híbridas entre variedades con diferentes características contienen combinaciones de genes de ambos padres. Al cultivarlos *in vitro*, éstos formarán plantas en lugar de gametofitos (Fig. 2). Las plantas resultantes muestran una diversidad de características cercanas a los padres o combinaciones de estos; además, si todos los cromosomas de los tejidos o plantas haploides se duplican, el resultado es la formación de tejidos o plantas genéticamente uniformes (homocigosis). La haploidía está siendo integrada en programas de mejoramiento de plantas (Cuadro No. 2). Se estima, por ejem-

plo, que sería posible reducir el tiempo para la obtención de variedades mejoradas de arroz de 8-10 años a 3-4 años, usando la técnica del cultivo de anteras.

- **Variación somaclonal.** Es el incremento de la variabilidad genética en plantas regeneradas por cultivo de tejidos. En diversos casos, las variaciones detectadas han sido relacionadas a cambios cromosómicos y alteración de los genes.

Contrario a lo que se creía hace pocos años, el cultivo de tejidos, especialmente de sistemas no organizados, ej: callos, células en suspensión y protoplastos (Fig. 3), constituye una fuente mayor de variabilidad, la cual puede resultar en el mejoramiento de variedades seleccionadas en una o dos características importantes (Cuadro 2).

- **Hibridación somática.** Protoplastos (células cuya pared ha sido digerida enzimáticamente) (Fig. 3), de plantas distintas pueden ser inducidos a fusionarse para formar células híbridas.

Aparentemente no existen barreras para la fusión intra o interespecífica, o aún intergenérica, de protoplastos, sin embargo, todavía no se ha producido un cultivar generado por medio de esta tecnología.

*Pasa a la pág. 29*

Cuadro 2. Resumen de las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en la agricultura. (octubre, 1985).

Tecnología	Objetivos	Plazo para aplicación	utilización	
			a nivel experiencia	en la práctica
Propagación clonal Cultivo meristemas, ápices, etc.	1. Multiplicación masiva	Inmediato	Mayoría de forestales y pocas plantas nativas	Numerosas plantas Ej. yuca, papa; frutales; ornamentales. Palmas (60 plantas).
	2. Eliminación de enfermedades	Inmediato		
	3. Conservación de plantas	Inmediato		
	4. Intercambio de materiales	Inmediato		
Rescate de embriones Cultivo de embriones	1. Obtención de híbridos entre especies distintas	Inmediato	@ 50 casos*	Ej. papa, frijol, maíz, trigo
Haploidía Cultivo anteras, cultivo de embriones	1. Acelerar mejoramiento genético.	Mediano	@ 50 plantas**	Ej. arroz, cobada, papa, tabaco
	2. Investigaciones genéticas	Mediano		
Variación somaclonal Cultivo protoplastos, Callos, etc.	1. Acelerar mejoramiento genético intra-varietal	Mediano	@ 15 plantas	Ej. tomate
Selección de mutantes Cultivo protoplastos, células, callos, etc.	1. Obtención de líneas con caracteres deseables	Largo	@ 20 plantas	Ej. arroz, tabaco
	2. Investigación básica	Largo		
Hibridación somática Fusión protoplastos	1. Obtención híbridos asexuales.	Largo	@ 41 casos	—
	2. Transferencia genes citoplasmáticos	Largo	—	—
Ingeniería genética ADN Recombinante, vectores y cultivo protoplastos, callos, etc.	1. Incorporación genes sintéticos simples	Mediano	@ 6 plantas	—
	2. Transferencia genes naturales simples.	Largo	@ 4 plantas	—
	3. Transferencia genes complejos	Más largo	—	—

\* : Cruzamientos diferentes  
\*\* : Especies diferentes

mente especializado y un control riguroso de calidad.

Trece años después, Producciones Químicas está en capacidad de abastecer el mercado nacional de secantes metálicos y el de compuestos de cobalto y mercurio, así como buena parte de la demanda de estearatos de zinc y calcio. “Aún cuando desaparecieran las actuales fábricas del ramo —anota Bernardo Uribe—, nuestra empresa podría suplir con rapidez la producción faltante”.

El proceso de sustitución de importaciones que viene aconteciendo Producciones Químicas guarda gran importancia, puesto que sienta los cimientos para el progreso autónomo de las industrias de pinturas, plásticos, cauchos, pilas eléctricas, cosméticos y productos farmacéuticos, que al disponer de las materias primas básicas aminoran su dependencia con respecto a las naciones industrializadas. No se trata, pues, de un simple ahorro de divisas. “Y lo que es de resaltar —agrega Uribe— es que tal realidad constituye un aporte de la pequeña industria. El que con recursos limitados y principalmente con base en el avance de la propia tecnología puedan desarrollarse productos de avanzada, muestra un ejemplo del camino a seguir, perfectamente accesible a los industriales del país”.

Producciones Químicas Ltda. ha puesto en marcha tecnologías propias en todos sus productos e investiga continuamente con miras a perfeccionar las actuales y abrir paso a las innovaciones. Se ha puesto especial atención al control de calidad, conforme a los parámetros fijados por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Icontec.

“Los profesionales colombianos —concluye Bernardo Uribe— podemos fabricar artículos con la misma calidad de los importados, aumentando las posibilidades de autoabastecimiento del país y creando empleo calificado y no calificado”.

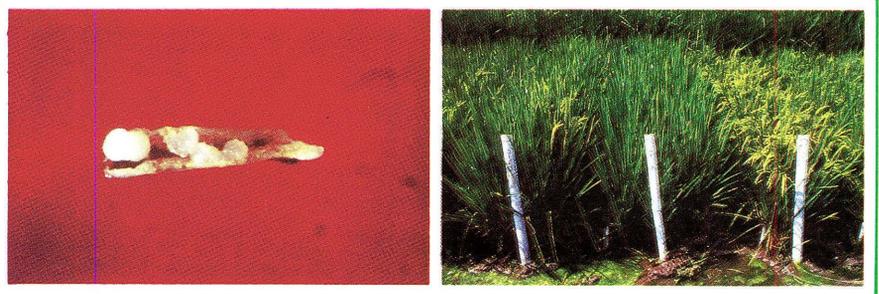


Figura 2. Obtención de haploides de arroz por cultivo de anteras: A. Inducción de callos a partir de granos de polen inmaduro contenidos en la antera; B. Plantas diploides homocigotas regeneradas por cultivo de anteras. Notar las diferencias entre líneas y la uniformidad dentro de cada línea.

### CLONAJE...

Viene de la pág. 15

La fusión de citoplasmas lleva a la formación de híbridos citoplasmáticos. Este mecanismo puede ser potencialmente útil para la transferencia de genes citoplasmáticos, ej. tolerancia a herbicidas, resistencia a enfermedades y esterilidad masculina, las que difícilmente pueden ser transferidas mediante la hibridación sexual convencional (Cuadro 2). Una importante limitación en el uso de esta técnica es la dificultad de regeneración de plantas a partir de las células híbridas.

### PERSPECTIVAS

El clonaje de plantas *in vitro* está llamado a ser una herramienta poderosa en las manos de los mejoradores de plantas. Asociado a las téc-

nicas del ADN recombinante y de la transferencia de genes mediante vectores apropiados, el cultivo de tejidos vegetales contribuirá no sólo a un mejor entendimiento de los procesos fisiológicos y genéticos básicos de las plantas, sino que ayudará a reducir el espacio, tiempo y costos en la obtención de variedades alimenticias genéticamente mejoradas (Cuadro 2). Estas tecnologías ofrecen numerosas oportunidades directamente relacionadas a las necesidades de los países en desarrollo, como por ejemplo la modificación de plantas para aumentar la resistencia a enfermedades. Los países en desarrollo deben orientar esfuerzos para utilizar las *nuevas biotecnologías* para lo cual es necesario entrenar científicos y proporcionar apoyo para el establecimiento de infraestructura y mantenimiento de la investigación.

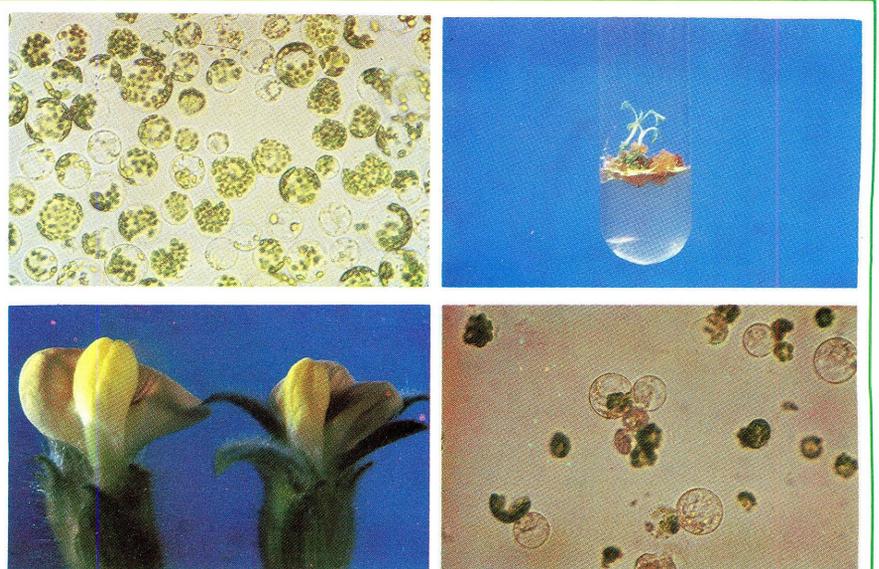


Figura 3. Cultivo y fusión de protoplastos y variación somaclonal en *Stylosanthes*: A. Protoplastos aislados de la hoja (notar abundancia de cloroplastos) B. Regeneración de plantas en callos derivados de protoplastos, C. Variación en el tamaño de la flor que refleja el doblaje de los cromosomas de 20 (testigo, izquierda) a 40 (un somaclón, derecha). D. Resultado inicial (al centro) de una fusión entre protoplastos mesofílicos (verdes) y de suspensión celular (transparentes y grandes).