

Hoy día, casi 30 años después que en varios países se intensificara la investigación en cultivo de tejidos vegetales en condiciones de laboratorio, se puede hablar ya de una tecnología de avanzada en este campo. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ha pasado rápidamente, en especial en los últimos cinco años, de las rutinas en los laboratorios de investigación básica en biología a los procedimientos estandarizados para enraizar esquejes, multiplicar brotes, desarrollar meristemos, proliferar yemas, aislar y desarrollar células, todo dentro del concepto de multiplicar clónicamente y en el menor tiempo posible, una especie vegetal de interés agronómico. Obtener por cualesquiera de estas técnicas varias plantas a partir de una muestra es hoy una realidad que en el

tos, esquejes y yemas, entre otros); heterogeneidad de los cultivos industriales; acción de plagas, mejoramiento genético muy lento; deforestación; extinción de especies; pérdidas por sistemas de multiplicación y organización de bancos de germoplasma *in vitro*, se pueden resolver en el laboratorio aplicando el cultivo de tejidos.

Debe decirse que la técnica del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, junto con las de agricultura moderna con invernaderos, medios hidropónicos, acuicultura e hipernutrición, está produciendo toda una revolución tecnológica en la producción agroindustrial. Debido a ello y aunque apenas se está madurando esta tecnología, los resultados obtenidos hasta hoy han estimulado ya a muchos inversionistas a utilizarla en

valdría la pena evaluar con esta tecnología.

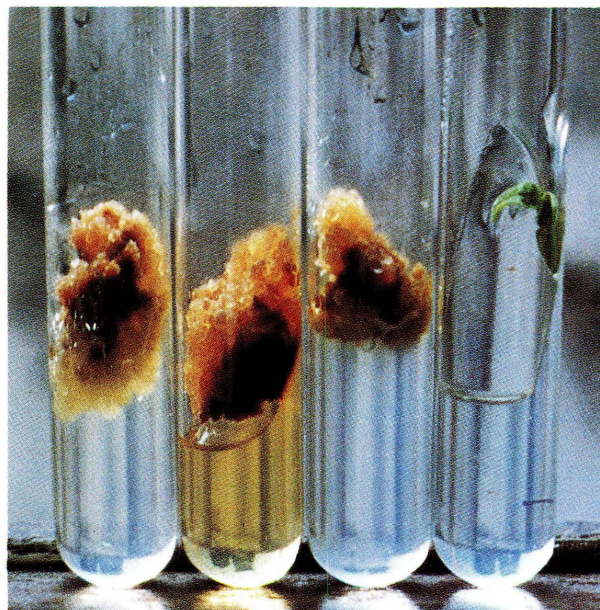
Los pinos (*Pinus sp.*), eucaliptos (*Eucalyptus sp.*), secoyas (sequoia) y tecas (tectona) son las especies que tradicionalmente se han explotado en el mundo como maderables. En Colombia también estas especies han sido introducidas y explotadas. En nuestra flora conocemos maderables de importancia como el ábaco, caoba, cedro rojo, caracolí, almendrón, Laural comino, carise-co, guayacán, cucharo, acacias, nogal, igua, diomate, samán, dinde, algunos de los cuales están casi extinguidos y otros no se han probado adecuadamente.

Puede verse entonces que nuestro medio es un campo muy fértil para la utilización amplia de esta

El cultivo de tejidos *IN VITRO* en la producción de maderas

Germán Pachón*
Over Quintero*

Los tubos de la izquierda muestran callos obtenidos a partir de embriones de *Pinus caribaea*, después de diez semanas de cultivo



caso de varias especies importantes es guardada como secreto industrial. Para llegar a ello se debió transitar un camino difícil entre la producción de conocimientos generales y específicos en este campo de la investigación biológica a nivel de laboratorio, y la necesidad de resolver con esas técnicas y esos conocimientos, problemas concretos para la producción vegetal industrial, ornamental, alimentaria o medicinal. Dificultades tales como la escasez de semilla sexual o asexual (injer-

forma estable. En nuestro país las aplicaciones son todavía muy reducidas.

Uno de los campos de mayor interés para la aplicación del cultivo de tejidos es el de la producción de maderas. Entre las especies vegetales para la obtención de maderas, las coníferas han sido vistas siempre por el hombre como preferidas. En Colombia, además de las coníferas hay una buena cantidad de especies vegetales maderables que

biotecnología, con las mejores perspectivas científicas y económicas.

IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro* EN LA PRODUCCIÓN DE ARBOLES

Varios autores han planteado interesantes argumentos sobre los problemas de la deforestación en el trópico y la afectación de los recursos genéticos propios de los países en desarrollo, especialmente países de vocación agrícola, los cuales

constituyen la mayoría. El impacto de la sobreexplotación maderera con nuevas tecnologías y el reemplazo de especies nativas por especies mejoradas o clones aptos para otras latitudes, se puede ver en el aumento de la polución ambiental y en la velocidad de deterioro de la calidad de vida de los pobladores de estos países, quienes han reducido drásticamente la producción de alimentos y la satisfacción de necesidades. Este problema, unido al opuesto, es decir, a la necesidad de explotar el recurso forestal renovándolo responsablemente sin que se ponga en peligro el ecosistema, origina un interesante campo en el que la biotecnología del cultivo de tejidos tiene particular aplicación.

J. Durzan, profesor y jefe del Departamento de Pomología de la Universidad de California-1986, plantea al respecto una estrategia que expresamente incluye las distintas áreas del cultivo de tejidos, la cual se resume en la expresión "domesticar árboles y reforestar estos países". Lo anterior significa, en términos comprensibles, que se debe identificar grupos de caracteres genéticos en árboles de utilidad comprobada y potencial para el hombre, encontrar las formas para una propagación masiva de estos árboles escogidos, investigar los problemas de variación genética donde esta ya sea restrictiva, e identificar las formas más efectivas para sembrarlos protegiendo los suelos productivos.

Desde el punto de vista investigativo, encontrar y utilizar caracteres genéticos importantes agrónomicamente, exige cumplir con cuatro tareas principales:

- Estimar la heredabilidad de los caracteres escogidos.
- Desarrollar los métodos para seleccionar específicamente estos caracteres.
- Establecer las relaciones del caso para reducir las pruebas de campo de los árboles seleccionados como promisorios y los riesgos asociados con su utilización por largo tiempo en programas forestales.

- Desarrollar tecnologías para llevar a producción, en el menor tiempo posible, los árboles mejorados.

Estas cuatro tareas pueden perfectamente reducirse a la mitad, dado que aunque no se ha estudiado exhaustivamente nuestra flora, hay especies nativas e introducidas/así como variedades de ellas que en la práctica se han caracterizado como productoras en distintas áreas industriales.

Lo anterior permitiría establecer en los laboratorios bancos de meristematos, yemas, esquejes o jardines de clones, de los que se partiría para un programa de multiplicación rápida y controlada de árboles de las especies o variedades probadas en el campo y seleccionadas. Clonar el árbol que se ha destacado por sus características en un cultivo forestal es una idea que vale la pena poner a prueba dada la alta probabilidad de tener en el inmediato futuro un cultivo de individuos idénticos a él (clones), esto es, individuos de la mejor condición, los mejores especímenes.

En el caso que no se pueda reducir ninguna de estas 4 tareas básicas, de todas maneras la tecnología del cultivo de células y tejidos puede apoyar eficientemente y en menor tiempo su realización.

Es sabido que la totipotencia celular (o capacidad de una célula para originar un organismo completo), permite que el contenido genético se mantenga y exprese en cada célula de un organismo pluricelular. Gracias a las técnicas de multiplicación celular en el laboratorio, con un litro de células suspendidas en medio de cultivo líquido se pueden obtener al menos 10 millones de árboles (J. Durzan, 1986). Esto indica que realizando una selección a través de la multiplicación masal de todo tipo clonal celular se pueden capturar los caracteres indicados para ser establecidos y multiplicados en pequeñas plantas de probeta, que luego se desarrollarán en medio hidropónico, invernadero y suelo.

Características especiales identificadas y establecidas para una especie forestal deben ser objeto además de una selección diferencial. Esta situación se origina en el hecho que aún dentro de una misma especie vegetal tanto la respuesta de las células como la de los tejidos no es igual frente a los nutrientes, a las fitohormonas, a las condiciones de incubación, etc. Es el viejo caso conocido por los cultivadores de tejidos en el laboratorio: es imposible extrapolar la información optimizada para una especie a otra o a una variedad de la misma. Se debe investigar la especie en particular y optimizar las variables para ella.

La utilización de la multiplicación clonal a nivel celular partiendo de tejidos e incluyendo embriogénesis somática ha sido exitosa en coníferas (Eupta et al 1985). La producción de embriones somáticos nos coloca al borde de otra aplicación tecnológica factible: la obtención de "semillas artificiales" (con embriones no cigóticos desarrollados a partir de células somáticas) que son encapsulados en geles (News Letter 48, 1986). La semilla producida en esta forma no sólo sería de alta calidad sino totalmente sana y de disponibilidad permanente.

No todo es tan fácil en este tipo de tareas. Con razón los reforestadores y silvicultores hablan de que lo importante es clonar individuos probados en el campo. Los árboles de varios años que se destacan en los cultivos, son los indicados para un programa de clonación. Esta es una limitante que se viene investigando en los últimos 10 años en los laboratorios.

Tomar material del campo —de organismos desarrollados— pasarlo al laboratorio, multiplicarlo allí y luego ofrecerlo en buena cantidad a los cultivadores, es el mayor desafío actual para esta biotecnología. Los resultados de investigaciones en este campo aplicados a coníferas y a

Pasa a la pág. 30

* Investigadores del grupo de Tejidos Vegetales *in vitro*, Instituto Superior de Ciencias Naturales. Universidad Incca de Colombia. Carrera 13 No. 24-15, Bogotá.

EL CULTIVO...

Viene de la pág. 9

otros árboles se presentarán más adelante.

El cultivo de tejidos *in vitro* también ha venido enfrentando el reto de reducir la duración del ciclo del cultivo y el mejoramiento de árboles. La variación natural producto de la combinación y recombinación genética solo se manifiesta cuando se produce la semilla sexual y ésta se germina lográndose el desarrollo de plantas para ser seleccionadas por sus nuevas características. Este ciclo lleva normalmente muchos años. Se requiere introducir técnicas y métodos para inducir variación genética en corto tiempo. También en árboles —para no citar la abundante producción de resultados positivos en hierbas— se han venido obteniendo halagadores resultados con las técnicas de fusión de protoplastos, inserción de genes, ADN —recombinante, producción de haploides e individuos de alta homocigosis. La aplicación tecnológica de estos resultados no es muy lejana.

Como puede verse, la importancia de la aplicación del cultivo de tejidos *in vitro* en la producción de árboles es incuestionable y sin desconocer las limitantes que existen, también su probabilidad de éxito es alta.

AVANCES EN LA INVESTIGACION DE CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro* APLICADA A PINUS

Las coníferas en general, gracias a su utilidad práctica para el hombre, han sido también objeto de estudio con las técnicas de cultivo de tejidos. Ya hemos afirmado que el aplicar esta tecnología a tejidos de árboles no fue fácil.

Pasar de plántulas herbáceas desarrolladas en laboratorio a tratar tejidos lignificados, desarrollados a la intemperie, contaminados externa e internamente y con nutrición no controlada, fue un gran reto que todavía genera incertidumbre. Greenwood y Berlyn (1965) fueron pione-

ros en el tratamiento a nivel de laboratorio del *Pinus lambertiana*. Experimentaron y obtuvieron enraizamiento de esquejes de este pino con tratamientos no convencionales. En *Pseudotsuga mensziessi*, Bethel (1972) logró producir callos y enraizamiento de ellos, al igual que la producción de embrioides y brotes a partir de yemas y cotiledones de *Biota orientalis* y *Pinus gerardiana*. Estos fueron realmente los trabajos pioneros en cultivo de tejidos aplicados a *Pinus*.

A partir de 1975, con los trabajos de Sommer et al, se retoman estas aplicaciones y es desde este momento que se puede hablar de resultados consistentes en esta tecnología frente a especies de coníferas y otros géneros de árboles maderables.

Sommer, H., et al (1975) experimentaron inicialmente con *Pinus*

talenacético y 5 mg/lit. de Benziladenina al medio estandar. Con este medio y partiendo de material seleccionado producido en condiciones de laboratorio, en 3-5 semanas se obtuvieron resultados positivos. De igual modo lograron que embriones aislados de semillas diferenciaran hojas primarias y yemas adventicias en un 80% de los casos. Un resumen de las experiencias y los resultados obtenidos con la aplicación de tejidos en coníferas se presenta en la tabla No. 1.

Estos resultados se complementan con la utilización de las técnicas de aislamiento de células y protoplastos en cofineras (Ahuja, M. 1981, David et al 1981 y Vinton et al, 1975) y con algunos trabajos sobre micorrización y fijación de Nitrógeno por microorganismos en *Pinus* (Jacobi, 1982). De igual modo con trabajos sobre secuenciamiento y clonación de genes (Dundekar, et al

INVENTARIO DE INVESTIGACIONES SOBRE CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO* EN CONIFERAS



En el tubo de la izquierda, brotes a partir de un Callo basal y en los de la derecha, brotes y yemas a partir de la siembra de un ápice singular.

ESPECIE	PARTE SEMBRADA	RESULTADOS
<i>Biota orientalis</i>	Cotiledones y raíces	embriones y yemas
<i>Pinus lambertiana</i>	Hipocórito	Rizogénesis
<i>Pseudotsuga</i>	Callos	Rizogénesis
<i>Pinus gerardiana</i>	Callos	Rizogénesis y yemas
<i>Pinus palustris</i>	Meristemos de Plántulas de semillas	Rizogénesis
<i>Pinus radiata</i>	Protoplastos del hongo	Micorrizas asociadas con la raíz con hongos portadores de información de bacteria fijadora de Nitrógeno.
<i>Picea spp.</i>	Meristemos	Callos
<i>Abies sibirica</i>	Meristemos	Callos
<i>Larix spp</i>	Meristemos	Callos
<i>Pinus taeda</i>	Meristemos de plántulas	Esporádica rizogénesis.
<i>Pinus elliotii</i>	Meristemos	Rizogénesis esporádica.
<i>Pinus rigida</i>	Meristemos	Rizogénesis esporádica.
<i>Pinus radiata</i>	Meristemos	Rizogénesis esporádica.
<i>Pinus virginiano</i>	Meristemos	Rizogénesis esporádica.

palustris, cultivando en medio de cultivo M. S. (Murashige and Skoog, 1961) modificado, yemas axilares y aplicables (yemas de los vegetales denominadas así por su ubicación en el tallo sobre las ramificaciones laterales o al final de una ramificación respectivamente) extirpadas de plántulas de semillero. La modificación del medio de cultivo correspondió a la realizada por Gressoff and Doy (1972) y consistía en adicionar 2 mg/lit de Acido Naf-

1983) y elaboración de mapas topológicos tridimensionales (Durzan and Uri, 1985), que basados en principios moleculares pueden permitir evaluar la expresión génica, las modificaciones y la selección de grupos de caracteres génicos en *Pinus*.

Como puede verse toda la amplia gama de técnicas del cultivo de tejidos vegetales *In Vitro* se ha venido investigando en los *Pinus*. Falta tal

vez alguna aplicación en el cultivo de células haploides. Cuáles son los resultados? Veamos un resumen de ellos para concluir con alguna sugerencia.

- Germinación en el laboratorio de semilla sexual seleccionada
- Extirpación de yemas axilares y terminales, meristemos y brotes en plántulas de semillero.
- Aislamiento y cultivo de células y protoplastos.
- Aislamiento e identificación de micorrizas y de las moléculas involucradas en la asociación hongo-raíz.
- Formulación de medios de cultivo básico para mantener en el laboratorio protoplastos, células, tejidos y plántulas de pinus.

ESPECIE	PARTE SEMBRADA	RESULTADOS
<i>Pseudotsuga</i>	Meristemos	Rizogénesis esporádica
<i>Pinus radiata</i> <i>Pinus taeda</i>	Meristemos de Callos	Rizogénesis Aislamiento de moléculas inhibitorias para <i>C. Fusiforme</i> .
<i>Pinus elliotti</i>		Aislamiento de moléculas inhibitorias para <i>C. Fusiforme</i> .
<i>Pinus sibirica</i> <i>Pinus pumila</i>	Meristemos	Callos Rizogénesis y callos.
<i>Planatus orientalis</i> <i>Pinus monticola</i> <i>Pinus pinaster</i>	Meristemos Plántulas de semillero	Rizogénesis Rizogénesis de Brotes clonados
<i>Pinus pinaster</i>	Explantos de laboratorio	Formación de raíz micorrizogénica
<i>Pinus tinctorius</i> <i>Pinus strobus</i> Abeto blanco	Brotes y yemas Embriones sexuales	Micorrización Embriogénesis somática
Varios	Células libres	Secuenciamiento de genes
<i>Pinus caribaea</i>	Embriones sexuales	Cultivo de embriones (ver fotos)

- Producción de callos y su posterior organogénesis.
- Diferenciación de plántulas a partir de callos.
- Desarrollo de plántulas a partir de tejidos o explantes de semillero.
- Extirpación y tratamiento de tejidos y explantes de árboles cultivados.

- Producción de retoños múltiples a partir de material de árboles de campo.
- Enraizamiento de brotes en tubo de ensayo.
- Secuenciamiento y clonación de genes.
- Mapas genéticos tridimensionales con base molecular.

Este resumen de resultados abarca desde las técnicas estandarizadas hasta lo obtenido como resultado experimental. La información es amplia y útil. El problema de utilizar material de campo en vez de material de semilleros asépticos en laboratorio es solucionable. Nuestro propio laboratorio puede hoy ofrecer una etapa de limpieza exógena y endógena para este material, tratamientos del explante que evitan la contaminación y muerte por oxidación y necrosis de los tejidos.

En *Pinus caribaea* (foto 1) de distinta procedencia, hemos logrado cultivar embriones (foto 1), retoños (foto 2) y células, produciendo en el tubo de ensayo callos, brotes y proliferación de estos últimos. (foto 1 y 2).

Se requiere entonces aplicar esta técnica y obtener en la etapa de multiplicación rápida *In Vitro*, resultados que permitan ofrecer suficiente semilla para cultivar en el campo, por cualesquiera de estas alternativas:

- Diferenciando plántulas a partir de células cultivadas en suspensión y provenientes de tejidos de árboles.
- Proliferando brotes a partir de tejidos de árboles de campo dentro de los tubos de ensayo y logrando el enraizamiento de éstos.
- Diferenciando en cantidad suficiente plántulas a partir de meristemos, yemas, brotes o explantes.

Ofrecer al cultivador "Semilla" en forma de plántulas completas, listas para sembrar y clonadas de árboles seleccionados en el campo, es una posibilidad real según lo expuesto anteriormente. □

INTEGRACION...

Viene de la pág. 15

al ser humano y constituyen su bien. La que rebaja al hombre, reduciéndolo a un simple objeto de experimentación, sencillamente no cumple con su cometido.

En el respeto celoso de la autonomía de las ciencias y en la relación de las mismas con la realización humana, se entiende su contribución a abrir nuevos caminos para una nueva civilización. A través de ellas el hombre puede contribuir a que la familia humana se eleve a más altos pensamientos sobre la verdad, el bien y la belleza, y al juicio de valor universal. A su vez los progresos científicos exigen nuevas investigaciones teológicas.

La vinculación expresa de las ciencias con la realización del hombre no es una afirmación sin consecuencias. Motiva toda una tarea de los científicos, técnicos y forjadores de la sociedad tecnológica para que alienten el espíritu científico con amor a la verdad a fin de investigar los secretos del universo y dominar la tierra. Se trata de construir una sociedad en la positividad de los valores que promueven al hombre. Esto se hace urgente en este mundo en desarrollo de América Latina.

El trabajo científico ha de integrarse en la promoción de la justicia, para la construcción de un mundo más humano. De ninguna manera ha de ser un instrumento más de opresión y explotación.

Dentro de la visión integral del hombre, la cultura toda, que incluye lógicamente la investigación y experimentación de las ciencias y todo el trabajo de la técnica, ha de relacionarse orgánica y constitutivamente con la fe. Esta le ofrece su último y radical fundamento. Y estamos entendiendo la fe, no como un reino aparte de la vida, sino como una actitud existencial de compromiso con la realidad.

En consecuencia, nuestra reflexión nos lleva a la afirmación de que no es posible seguir alimentando el divorcio entre ciencia y fe. Por el contrario se impone una integración en orden a la promoción humana con todas sus consecuencias. □