

EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES IN VITRO PARA PAÍSES EN DESARROLLO

CLAUDIA BOTTI G.

Ing. Agr. M.S.

Depto. Producción Agrícola

INTRODUCCIÓN

La técnica de cultivar células, tejidos u órganos en condiciones completamente artificiales —asépticas, en un medio nutritivo conocido y bajo ambiente controlado— está siendo aplicada comercialmente con éxito en muchas especies vegetales, algunas de las cuales juegan un rol importante en la economía nacional de países en desarrollo. Los ejemplos más impactantes de estas últimas se refieren a la micropropagación y mejoramiento genético de especies tropicales como las palmas aceitera y datilera, cocotero, caña de azúcar, cafeto y algunas especies forestales. La propagación clonal de ellas, es decir, la obtención de plantas iguales a la planta madre, es de un interés particular, ya que la gran mayoría de especies tropicales son altamente heterocigotas (de gran variabilidad), están infectadas con virus y son propagadas tradicionalmente por medios vegetativos.

Numerosas otras especies no tropicales, como la alcachofa, espárrago, betarraga, ajo, papa, frambuesa, frutilla, arándano, camote, cítricos, kiwi, papayo, vid, jojoba, tabaco, zanahoria, endivia, portainjertos frutales, cereales, legumbres y una infinidad de especies ornamentales están siendo micropropagadas, especialmente en países industrializados, con fines de producción a gran escala o de mejoramiento genético. La gran mayoría de los laboratorios comerciales de cultivo *in vitro* en el mundo (150, aproximadamente) está fundamentalmente dedicada a la micropropagación de especies ornamentales y algunos frutales, pero paralelamente desarrollan programas de investigación, en otras especies, tendientes al mejoramiento genético.

POSIBILIDADES QUE OFRECE LA TÉCNICA DEL CULTIVO IN VITRO

Las aplicaciones del cultivo de tejidos *in vitro* son numerosas y pueden resumirse en:

- aplicaciones de corto plazo (hasta tres años), que incluyen la micropropagación, eliminación de enfermedades y almacenamiento e intercambio de germoplasma;
- aplicaciones de mediano plazo (de tres a ocho años), que incluyen diversos sistemas de mejoramiento genético a través de la variación somaclonal, es decir, la variación producida durante el cultivo *in vitro* en el tejido somático que originará clones, el rescate de embriones inmaduros, la fertilización *in vitro* y la producción de plantas haploides, y
- aplicaciones a largo plazo (de ocho a quince años), como la producción de metabolitos secundarios por cultivos celulares *in vitro* y aquellos que también se refieren a mejoramiento genético, pero a través de sistemas más sofisticados, como las hibridaciones somáticas, obtención de líneas celulares mutantes, transferencia de organelos (cuerpos celulares) y cromosomas y la transferencia de genes.

Estas posibilidades se basan en que toda célula vegetal viva, cualquiera sea su grado de especialización, desde el momento que posee un núcleo, es capaz de reproducir la planta completa de la cual ella proviene.

Es a esta sorprendente capacidad de la célula vegetal que el cultivo *in vitro* debe todo su potencial, y de este fundamento se desprende que cualquier individuo del Reino Vegetal pue-

de o podrá ser cultivado *in vitro* y regenerar plantas iguales o semejantes a la planta de origen. No hay excepciones.

Sin embargo, esto no significa que el desarrollo actual de los medios de cultivo y el conocimiento que hoy se tiene del comportamiento de las especies vegetales: su fisiología, su bioquímica, los sistemas complejos de desarrollo, nos permitan reproducir *in vitro* a corto plazo y sin dificultades todas las plantas existentes. Así como hay una larga lista de especies vegetales que han podido ser regeneradas *in vitro* a partir de órganos, trozos de tejidos e incluso de células aisladas, también se sabe que hay un gran número de especies que ofrecen serias dificultades en su respuesta al cultivo *in vitro*. No obstante, y gracias a los innumerables programas de investigación mundial en esta materia, es que año a año se agregan más a la lista de especies así regeneradas.

Es evidente que al cultivar células o tejidos con menor grado de especialización (células meristemáticas, tejidos en desarrollo o inmaduros, células embrionarias) la respuesta *in vitro* será más rápida y segura, ya que un material vegetal de mayor desarrollo o madurez debe, necesariamente, diferenciarse o revertir a condiciones de escasa diferenciación, antes de poder iniciar un proceso de división y elongación celular. Pero, aun conociendo esta premisa, la respuesta de algunas especies es escasa o nula, lo que está indicando que existen otros varios factores que están controlando internamente a la célula o tejido. Entre éstos, uno de los más importantes es el nivel hormonal endógeno de los tejidos en el momento de cultivo. Este factor incide indirectamente y en forma muy importante en la época de recolección del material vegetal para iniciar el cultivo *in vitro* de una especie, y en las concentraciones hormonales o de reguladores de crecimiento que se apliquen, en forma exógena, al medio nutritivo.

LA MICROPROPAGACIÓN

De todas las aplicaciones mencionadas, la micropropagación ha sido la más estudiada y desarrollada en los países del Tercer Mundo, especialmente en América Latina, debido a que, como ya se mencionó, se logran resultados a corto plazo que pueden ser utilizados y aprovechados rápidamente por el sector productivo con retornos inmediatos.

La micropropagación, consiste en reproducir plantas iguales (o semejantes) a la planta madre mediante la estimulación de las capacidades naturales de multiplicación vegetativa de la especie o por la inducción forzada de proliferación de brotes o embriones. El sistema presenta numerosas ventajas frente a un proceso de propagación tradicional.

- rapidez en la multiplicación;
- propagación masiva a partir de escaso material madre;
- obtención de plantas sanas;
- probable homogeneidad y mayor vigor del material regenerado;
- propagación durante todo el año, sin impedimentos estacionales;
- definición de programas de producción a través del año;
- ahorro de espacio en los viveros (400 a 1.000 plántulas en 1,2 × 0,6 m);
- propagación de especies de difícil multiplicación tradicional.

Existen, no obstante, algunas limitantes como:

- alto costo inicial en infraestructura;
- necesidad de mano de obra especializada;
- largo período requerido para establecer las condiciones apropiadas del cultivo en algunas especies (aun cuando la multiplicación puede hacerse muy rápida después);
- riesgo de producir plantas variables, diferentes a la planta madre;
- problemas de juvenilidad, es decir, el retraso en entrar a una fase productiva en algunas especies;
- peligro de una clonación exagerada, produciendo plantas muy vulnerables a plagas y enfermedades;
- dificultad en la aclimatación de algunas especies al ser llevadas a condiciones *ex vitro* (fuera de los frascos o recipientes de cultivo y luego a terreno).

Debido a estos problemas es que se debe ser muy cauteloso antes de implementar un laboratorio para producción comercial y necesariamente deben determinarse varios factores previamente, como: tipo de especies, tasa de proliferación aproximada, velocidad de aclimatación y demanda y precio de ella. Estos parámetros toman especial relevancia si el interés radica en la propagación de especies o variedades de las que no existe suficiente in-

formación bibliográfica relacionada con su cultivo bajo condiciones *in vitro*.

ESTABLECIMIENTO DE BANCOS DE GERMOPLASMA

Las reservas genéticas vegetales incluyen la herencia genética de todas las variedades y especies vegetales de plantas cultivadas, así como de las silvestres o semidomesticadas de una región dada. Mientras más grande sea la reserva, mayor será el potencial que ofrece al mejoramiento de especies o variedades o para la selección de nuevos cultivares.

La existencia de una amplia diversidad genética, así como la disponibilidad de semillas y otros órganos de reproducción o propagación de las plantas, es decir germoplasma, en colecciones y en su ambiente natural, es un requerimiento esencial para salvaguardar las valiosas reservas existentes en los países en desarrollo y permitir el mejoramiento de ellas. Sin embargo, el medio ambiente natural, la dispersión de monocultivos y el hombre son algunos de los factores que están constantemente significando una amenaza a la destrucción de las reservas vegetales. Es por ello que el cultivo de tejidos *in vitro* se presenta como una interesante alternativa para el almacenamiento, propagación e intercambio de germoplasma, que no ha sido debidamente aprovechado en estos países, permitiendo asegurar su limpieza o sanidad, un gran ahorro de espacio para las colecciones y un transporte fácil y rápido.

Para formar un banco de germoplasma deben primero establecerse prioridades dentro de cada país para definir metas económicas y maximizar las reservas disponibles. Dentro de estas prioridades está, por ejemplo, la de identificar las especies de mayor interés, crear lazos de cooperación entre instituciones relevantes y la de promover programas de mejoramiento genético de las especies o variedades promisorias.

ELIMINACIÓN DE ENFERMEDADES Y VIRUS

A menudo se confunde el cultivo de tejidos o la micropropagación con el cultivo de meristemas. Esto es un error. La micropropagación utiliza un órgano completo (yema) o trozos de órganos (hojas, raíces, tallos) de tamaños variables (hasta 1 cm, aproximadamente) para incentivar el desarrollo y proliferación de bro-

tes, preexistentes o neoformados, o de embriones somáticos que puedan regenerar en una planta completa. El cultivo de meristemas utiliza un volumen de tejido mucho menor, equivalente a un cubo de 0,1 a 0,3 mm de altura, disectado de la parte superior de un ápice de brote, con el objetivo de lograr la proliferación de brotes libres de virus u otras enfermedades, que posteriormente deben ser enraizados para regenerar plantas completas. Esta "limpieza" del material vegetal se logra, en muchos casos, porque el crecimiento de células meristemáticas sobrepasa a la proliferación del virus y porque no hay diferenciación de tejido vascular, que transporta el virus, en la sección disectada para cultivo.

Para una propagación rápida y masiva no se recomienda el cultivo de meristemas ya que es de disección lenta y difícil y la tasa de proliferación y regeneración es bastante menor que al usar trozos más grandes de tejido. Debe, además, destacarse que el cultivo de meristemas en sí no asegura una eliminación completa de virus. Posteriormente, deben hacerse pruebas específicas para verificar su sanidad. Las plantas libres de virus obtenidas no son resistentes a los virus y pueden ser fácilmente reinfectadas con virus si son cultivadas en sectores expuestos a infección. Por lo tanto, debe desarrollarse un programa de producción de plantas sanas en conjunto con medidas de protección y pruebas de verificación rigurosas.

El establecimiento de un plantel de plantas sanas, bajo invernadero con condiciones ambientales controladas, permite contar con excelente material vegetal para la micropropagación que posteriormente se desee hacer de éste. Con ello se mejora enormemente la respuesta inicial del tejido en cultivo, ya que presenta niveles más estables de hormonas y otros compuestos endógenos. Además, las plantas que se regeneren de este material estarán, certificadamente, libres de enfermedades y virus.

CONSIDERACIONES GENERALES Y POSIBILIDADES PARA CHILE

El hecho que la micropropagación, la formación de bancos de germoplasma o la eliminación de enfermedades sean objetivos de corto plazo, no implica que sean menos importantes que aquéllos de largo plazo. Por el contrario, éstos son muy valiosos y deseables de estable-

cer en países en desarrollo como Chile, que cuenta con material vegetal exótico para los países industrializados, muchas veces escaso, algunos de alto valor nutricional y que están altamente infectados. Por otra parte, el lograr mantener material vegetal seleccionado y escaso, limpiarlo de enfermedades y poder reproducirlo en forma masiva y homogénea son herramientas complementarias, y absolutamente indispensables, para poder cumplir los otros objetivos de mejoramiento genético ya indicados. Además, el costo de equipamiento e infraestructura para aplicaciones de mediano y corto plazo es menor que para las perspectivas de más largo plazo como la ingeniería genética, donde además existe escasez de profesionales o técnicos entrenados. Por otra parte, el avance y desarrollo de estas aplicaciones más sofisticadas se logra necesariamente gracias a la implementación de líneas de investigación estables y de largo plazo, que cuenten con un respaldo financiero también estable y suficientemente prolongado en cada una de ellas, condiciones que no se cumplen en la mayoría de los países en desarrollo. Las fuentes de financiamiento para investigación en Chile y otros países en desarrollo, en su gran mayoría, apoyan proyectos de no más de 3 años, que tiendan a resolver un problema aplicado y que al cabo de ese plazo el producto de la investigación pueda ser, ojalá, utilizado por el sector productivo. Es una realidad lógica, quizás ni siquiera criticable, pero impide el desarrollo rápido y constante de ciertas líneas de investigación como las ya mencionadas dentro de la biotecnología vegetal.

Es por ello que, dadas las circunstancias económicas mencionadas anteriormente, los países en desarrollo no debieran tratar de competir, por lo menos inicialmente, con los países industrializados en las áreas más sofisticadas de la biotecnología vegetal, como la ingeniería genética o transferencia de genes, sino más bien desarrollar fuertemente las técnicas, hasta cierto punto más simples y de

menor costo, de micropropagación de cultivos escasos y valiosos y promover líneas de mejoramiento genético en estas especies mediante técnicas de mediano plazo. Debido a la rápida desaparición de este germoplasma silvestre o semidomesticado y al rápido aumento de las patentes y privatización de variedades vegetales, el establecimiento de un programa de preservación de los recursos vegetales nacionales se presenta como una prioridad. Por otra parte, la investigación dirigida a afinar técnicas de regeneración a partir de tejidos, es otra alternativa de gran impacto que puede y debe desarrollarse en nuestros países, ya que no implica gran equipamiento y es uno de los mayores problemas que enfrenta la ingeniería genética. La regeneración, en plantas completas, de células o tejidos modificados genéticamente, se ha presentado como una de las etapas más difíciles de superar en el campo de la biotecnología vegetal. Los estudios dirigidos a resolver algunos de los problemas que inciden en la regeneración, como ser: tipo y condición fisiológica del tejido a utilizar, época de recolección, niveles de reguladores de crecimiento a aplicar, niveles endógenos de ciertos compuestos, y otros, son investigaciones de corto plazo que cuentan con el equipamiento necesario y profesionales altamente calificados en el país para su desarrollo. Los resultados de estos estudios podrían ser de gran utilidad para la ingeniería genética.

BIBLIOGRAFÍA

- MARGARA, J. 1984. *Bases de la Multiplicación Vegetativa. Les Meristèmes et l'Organogenèse*. INRA, Paris, 262 p.
- SASSON, A. 1986. *Recent and foreseeable progress in plant biotechnology and its implications, especially for the developing countries*. 15-92. En: Life Sciences and Society eds. R. Daudel y N. Lemaire D'Aggio. Elsevier, Amsterdam. 92 p.
- SASSON, A. 1988. *Biotechnologies and development*. UNESCO, France. Imprimerie de la Manutention, Mayenne. 361 p.