

CULTIVO IN VITRO: UNA VISION RAPIDA A ESTA HERRAMIENTA BIOTECNOLOGICA

Juan M. Sáñez, Ana Pastor de Abram*

INTRODUCCION

El cultivo "in vitro", ya sea como micropropagación de plantas o cultivo de tejidos, es una importante técnica biotecnológica que se halla a disposición del cultivador y del fitoquímico, para obtener plantas mejoradas o tejidos de partes de estas, en un tiempo mucho menor que el cultivo tradicional, así mismo podrán estar enriquecidas en algún compuesto activo de interés particular.

CULTIVO "IN VITRO"

Todos conocemos las formas comunes de propagación vegetativa: por semillas o por medio de estacas o tallos subterráneos. Cuando se realiza por estas dos últimas formas toda la progenie ("vástagos") son miembros de un grupo llamado "clón", esto simplemente significa que su constitución genética es idéntica entre sí e idéntica a su progenitor (planta donadora del explante). Por otro lado las plantas propagadas por semillas, resultado de una reproducción sexual, no son clones, pues cada una de ellas tiene una constitución genética única diferente de una semilla a otra en una misma variedad de planta [1].

* Pontificia Universidad Católica del Perú. Dpto. de Ciencias. Sección Química.

Mediante el cultivo in vitro no solo podremos obtener una planta nueva, si no también reproducir un conjunto de tejidos de células indiferenciadas (callo). En la figura 1 podemos ver las posibilidades de manejo con esta técnica, con el explante podemos obtener plantas nuevas, destinadas para el cultivo tradicional, o callos para la obtención directa de metabolitos secundarios. Esto se logra poniendo al explante en las condiciones y medios adecuados [2].

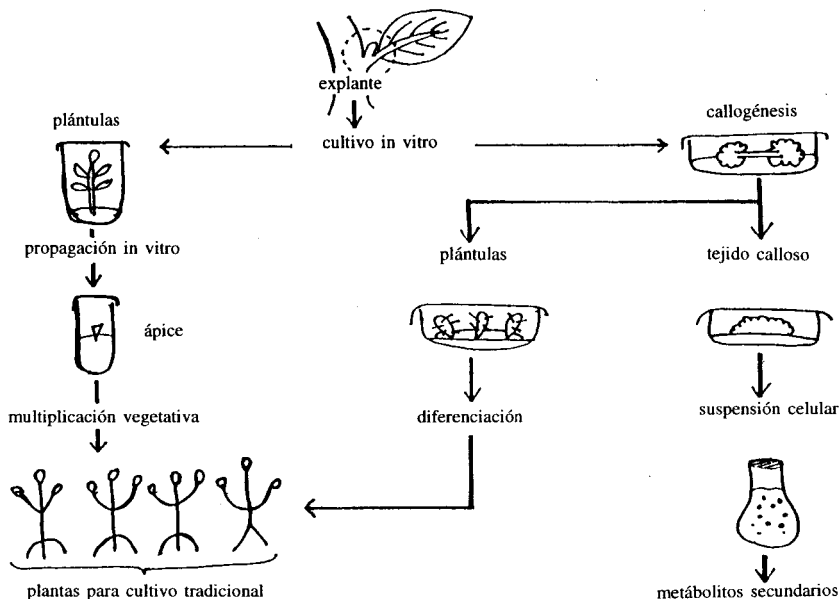


Fig. 1 Posibles rutas en el cultivo in vitro.

MICROPROPAGACION

Consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es una multiplicación masiva in vitro.

La micropropagación se emplea con mucho éxito en especies hortícolas, ornamentales y más reciente en especies leñosas. En algunas de ellas esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación a los sistemas tradicionales de propagación:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente rentables.
- Facilidad para transportar el material in vitro de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existan pocos individuos.

La propagación in vitro se desarrolla a través de la siguiente secuencia [1]:

- ETAPA 0 Es la inicial, que comprende la selección de la planta madre y de la modalidad de pretratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.
- ETAPA I Se establece el cultivo inicial o primario.
- ETAPA II Continúa con la multiplicación de los brotes, o multiplicación simplemente.
- ETAPAIII Corresponde al enraizamiento o etapa de pretransplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones de transplante al suelo.
- ETAPA IV Transferencia final al medio ambiente.

REQUERIMIENTOS DEL CULTIVO IN VITRO

Para lograr una manipulación exitosa del cultivo es indispensable familiarizarse tanto como sea posible, con la biología de la planta con la cual se trabaja. Esto significa que los aspectos de la regeneración vegetativa convencional tienen particular importancia cuando se trata de multiplicar clonalmente. Una vez seleccionada la planta madre hay que tener en cuenta su estado y edad fisiológica, pues los requerimientos nutricionales son diferentes para cada estado. La experiencia apunta que entre más joven el tejido mejor será la respuesta in vitro. Así mismo el tipo de tejido a seleccionar: meristema apical, axilar, yemas, anteras, hojas, pétalos, semilla, etc. No todas las partes responderán adecuadamente al cultivo in vitro [2].

Las condiciones de asepsia son importantes. El explante debe de estar libre de virus, agentes fitopatógenos, hongos y bacterias, pues cuando ocurra la multiplicación habrá una competencia entre éstos y las células del cultivo.

El empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (del 1 al 3%) como agentes desinfectantes es generalizado. Los explantes se sumergen en la mezcla desinfectante agitándolos en una centrifuga (80-150 rpm), luego se procede a enjuagarlos con abundante agua destilada y aséptica. Finalmente se les esteriliza en un autoclave. Los materiales a usar deberán igualmente ser previamente desinfectados.

La elección de un medio de cultivo adecuado garantizará el éxito del experimento. El medio de cultivo provee de los elementos nutricionales esenciales para que el explante crezca. Los nutrientes minerales se dividen en macronutrientes (Mg, Ca, K, P, N, S, Na) y los micronutrientes (I, Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Co). Se les incorpora en forma de sales minerales. Los macronutrientes se les requiere en mayor cantidad (mmol/l), en comparación con los micronutrientes (μmol/l). Los nutrientes orgánicos se adicionan como fuentes de carbono (azúcar, celulosa), vitaminas como el complejo vitamínico B: inositol, tiamina, ácido nicotínico, ácido fólico, rivofablina, biotina, etc. La mayoría de estas funcionan como coenzimas en el metabolismo celular.

Existen formulaciones de estos componentes en cantidades variables, los más conocidos son Murashige y Skoog (MS) [3], Gamborg et al (B5) [4], Chu et al (N6) [5], White (Wh) [6], etc. En la tabla 1 se muestran sus composiciones.

Tabla 1. Composición de cuatro medios básicos para el cultivo in vitro de tejidos

Componentes	Contenidos en cada medio (mg/litro)			
	MS	B5	N6	Wh
NH_4NO_3	1650	—	—	—
KNO_3	1900	2500	2830	80
KH_2PO_4	170	—	400	—
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	166	—
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	185	737
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	134	463	—
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	—	—	—	288
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	—	150	—	19
KCl	—	—	—	65
Na_2SO_4	—	—	—	200
KI	0,83	0,75	0,80	0,75
H_3BO_3	6.20	3,00	1,60	1,50

MnSO ₄ ·H ₂ O	—	10,00	—	—
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,30	—	4,40	6,65
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60	2,00	1,50	2,67
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	—	—
H ₂ MoO ₄	—	—	—	0,001
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	—	0,01
Fe ₂ (SO ₄) ₃	—	—	—	2,50
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,80	27,80	27,85	—
Na ₂ EDTA	37,30	37,30	37,25	—
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	—	—
Glicina	2,00	—	2,00	3,00
Tiamina-HCl	0,10	10,00	1,00	0,10
Piridoxidina-HCl	0,50	1,00	0,50	0,10
Acido nicotínico	0,50	1,00	0,50	0,50
Mionositol	100,00	100,00	—	100,00
Sacarosa	30000	20000	50000	20000
pH	5,7	5,5	5,8	5,5

Los reguladores del crecimiento de la planta, también conocidas como fitohormonas, tienen la finalidad de acelerar el crecimiento del cultivo en tiempos verdaderamente cortos en comparación con el cultivo tradicional. Se clasifican en tres grupos: auxinas, citoquininas y giberelinas. Las auxinas, promueven el alargamiento celular y el inicio del crecimiento radicular, mientras que las giberelinas estimulan exclusivamente el alargamiento celular, y las citoquininas la división celular. Otros constituyentes importantes son los agentes quelantes, aminoácidos y antibióticos.

Estos nutrientes se dispersan sobre agar, el cual funciona como soporte.

Los requerimientos físicos son: el tipo de luz e intensidad de esta, la temperatura y el flujo de aire.

En el proceso de multiplicación del explante puede pasar directamente a plántula o dar callos (conjunto de células indiferenciadas). Los callos se convertirán a plántulas cambiando el medio y modificando alguna fitohormona.

BIOSINTESIS Y BIOCONVERSION DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR CELULAS CULTIVADAS IN VITRO

Los cultivos de células y tejidos vegetales in vitro constituyen una alternativa para producir sustancias de uso farmacéutico, agrícola o industrial, cuya

producción comercial por los métodos convencionales –síntesis química o extracción de las plantas que lo sintetizan– resulta difícil o económicamente poco viable.

Así mismo se puede inducir un alto rendimiento en la obtención de ciertos principios activos, ya sea por conocimiento de las fases de la biosíntesis de estos metabolitos secundarios, o por manipulación genética. Obviamente el paso final será la industrialización de estos procesos. Actualmente el proceso industrial de muchas posibles plantas cultivadas in vitro se encuentran en estudio (tabla 2). Uno de los procesos de mayor éxito es la obtención de Shikonina [7], un pigmento que se extrae de las raíces del *Lithospermum erythrorhizon*.

La figura 2 presenta un posible esquema de trabajo [7].

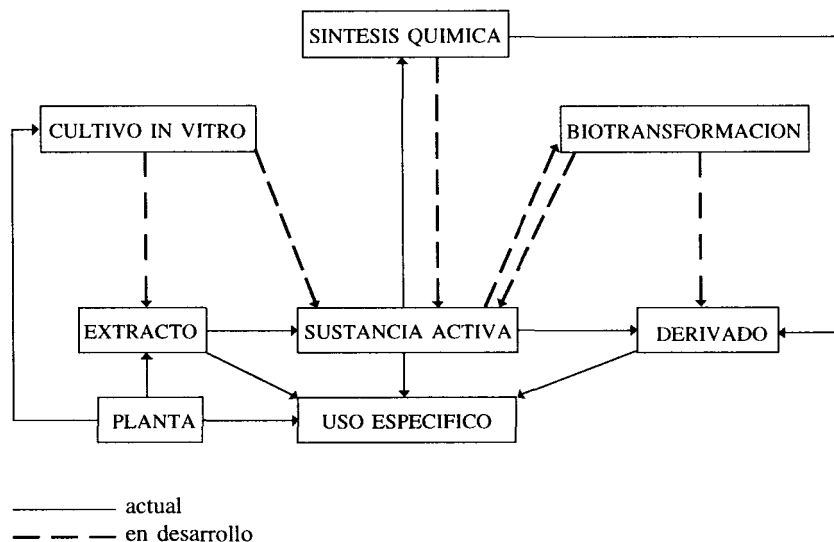


Fig. 2 Posible esquema de trabajo con el cultivo in vitro.

Es muy importante para un país como el nuestro de gran biodiversidad de uso industrial y farmacéutico, alcanzar y desarrollar esta biotecnología; así mismo, su empleo reducirá la actual depredación que sufren muchos de estos recursos, estos logros se alcanzarán a través de un trabajo interdisciplinario de agrónomos, biólogos, genetistas y fitoquímicos.

Tabla 2. Productos Naturales obtenidos por cultivos de tejidos

Producto	Especie	Uso Industrial
codeína	<i>Papaver somniferum</i>	analgesico
diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	anticonceptivo
quinina	<i>Chinchona ledgeriana</i>	antimalárico amargorizante
digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	cardiotónico
escopolomina	<i>Datura stramonium</i>	antihipertensivo
vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	antileucémico
taumantina	<i>Thaumatococcus danielli</i>	edulcorante
jasmina	<i>Jasminum sp.</i>	perfume
shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	colorante
vainillina	<i>Vainilla planifolia</i>	saborizante
capsaicina	<i>Capsicum frutescens</i>	saborizante

BIBLIOGRAFIA

1. Mejía, R. (1994) **Propagación comercial. 312 Especies de plantas por cultivo in vitro**, La Molina.
2. Roca, W. M. y Mroginski, L.A. (1991) **Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones**, CIAT, Colombia.
3. Murashige, T. y Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
4. Gamborg, O. L.; Miller, R.A. y Ojima, K. (1968) *Exp. Cell Res.* **50**, 151-158.
5. Chu, C.C.; Wang, C. C.; Sun, C. S.; Hsu, C.; Yin, K.C. y Chu, C. Y. (1975) *Sci. Sinica* **18**, 659-668.
6. White, P.R. (1943) **A handbook of plant tissue culture**. The Ronald Press, New York.
7. Bajaj, Y.P.S. (1989) **Biotechnology in agriculture and forestry**, Ed. Springer-Verlag, New York.