



CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO* COMO ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN DE RECURSOS FITOGENÉTICOS

ERICSON ARANZALES RONDON

e.aranzales@cgiar.org

JAIME ROBERTO GUZMÁN

“Conservación de bienes públicos internacionales: el papel de los bancos de germoplasma de los centros internacionales”

Estudiantes Maestría en Ciencias Biológicas línea de investigación en Recursos Fitogenéticos Neotropicales (RFG)

Universidad Nacional sede Palmira



OCTUBRE 14 DE 2011

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL -Cultivo de tejidos

Conjunto de técnicas que se refieren al trabajo con células y tejidos vegetales, son técnicas diversas- heterogéneas mediante las cuales un **EXPLANTE** es cultivado sobre un **MEDIO NUTRITIVO ARTIFICIAL** y bajo condiciones ambientales controladas y **CONDICIONES ASÉPTICAS** con el objetivo fundamental de regenerar plantas enteras.

El proceso de crecer células, tejidos, órganos u otra parte de la planta en un ambiente estéril y sobre un medio de cultivo

- ♣ Rápida multiplicación de clones
- ♣ Especies difíciles
- ♣ Uniformidad genética
- ♣ Condiciones asépticas
- ♣ Ambiente controlado



APLICACIONES PRÁCTICAS

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

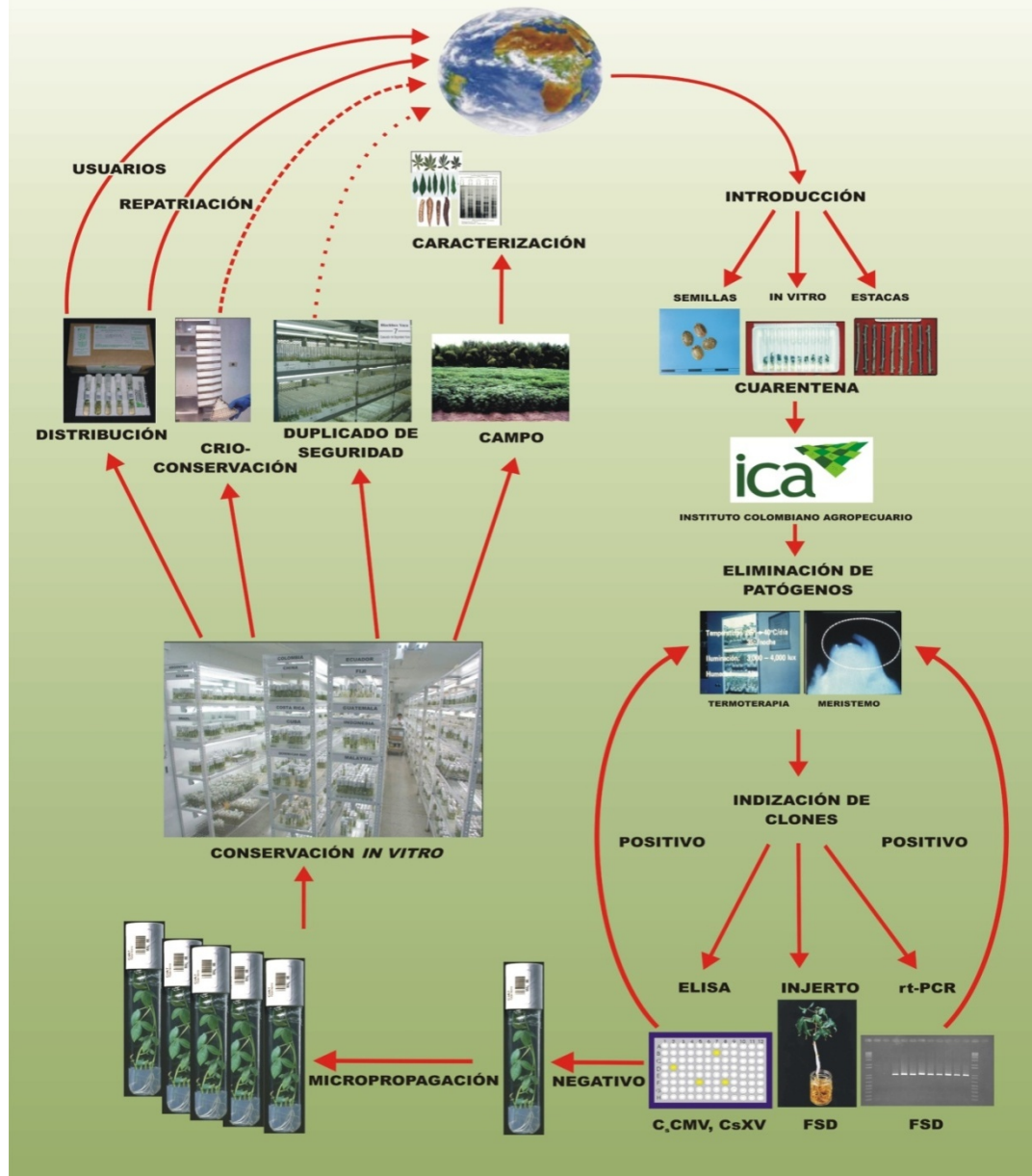


1. CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

- ✓ 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 o establecimiento, colecta, eliminación de patógenos, multiplicación, conservación y distribución e intercambio de germoplasma.



Diagrama de flujo de actividades para el manejo del germoplasma de *Manihot*



ALTERNATIVAS DE CONSERVACIÓN PARA *MANIHOT*

BANCO DE CAMPO

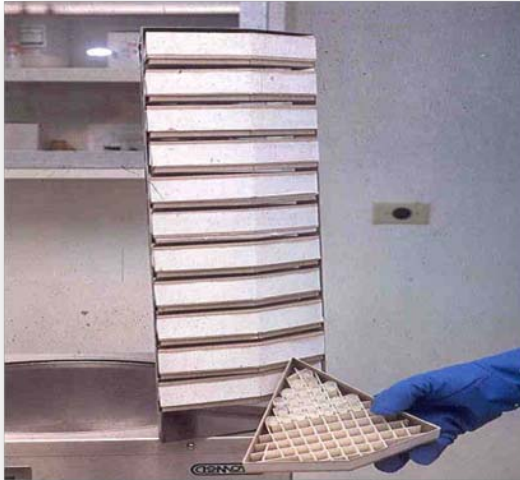
- permite evaluaciones, pero necesita renovación periódica
- riesgo de contaminación en los centros primarios de diversidad
- distribución internacional no es permitida

BANCO *in vitro*

- puede certificarse como material limpio
- distribución internacional es permitida
- necesita subcultivos periódicos aún bajo crecimiento frenado



ALTERNATIVAS DE CONSERVACIÓN PARA *MANIHOT*



BANCO CRIOCONSERVADO

- permite conservación a largo plazo
- necesita subcultivos, aunque no frecuentes
- inadecuado para distribución internacional
- inversión en personal y equipos

BANCO DE SEMILLAS



- permite conservación a largo plazo
- necesita regeneración periódica, aunque no frecuentes
- adecuado para conservación y distribución de especies
no todas las especies de *Manihot* evaluadas; Ortodoxas??
- conservación de genes, no genotipos (doble propósito)



COLECTA DE GERMOPLASMA

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

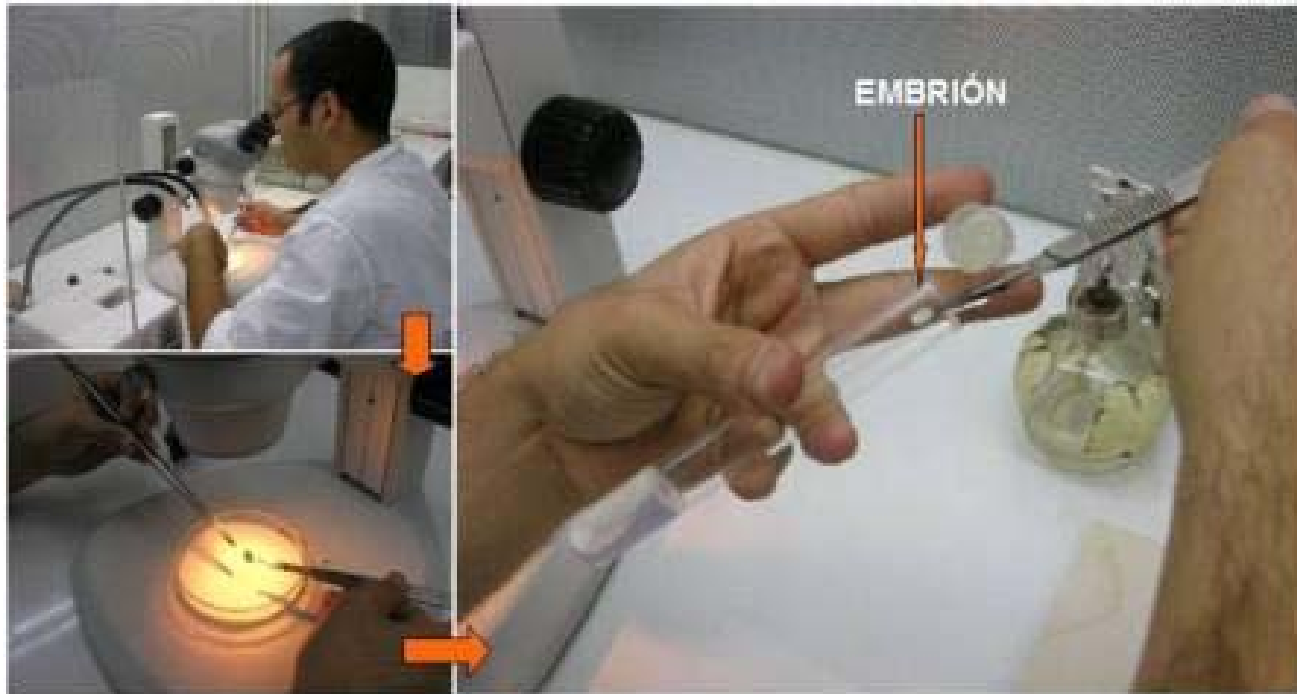
El explante se extrae, se esteriliza y se siembra en un medio de cultivo. La colecta *in vitro* se practica con especies cuyas muestras son difíciles de manejar, como las de reproducción vegetativa o de semilla no ortodoxa (recalcitrante).

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



INTRODUCCIÓN DE GERMOPLASMA

RESCATE DE EMBRIONES

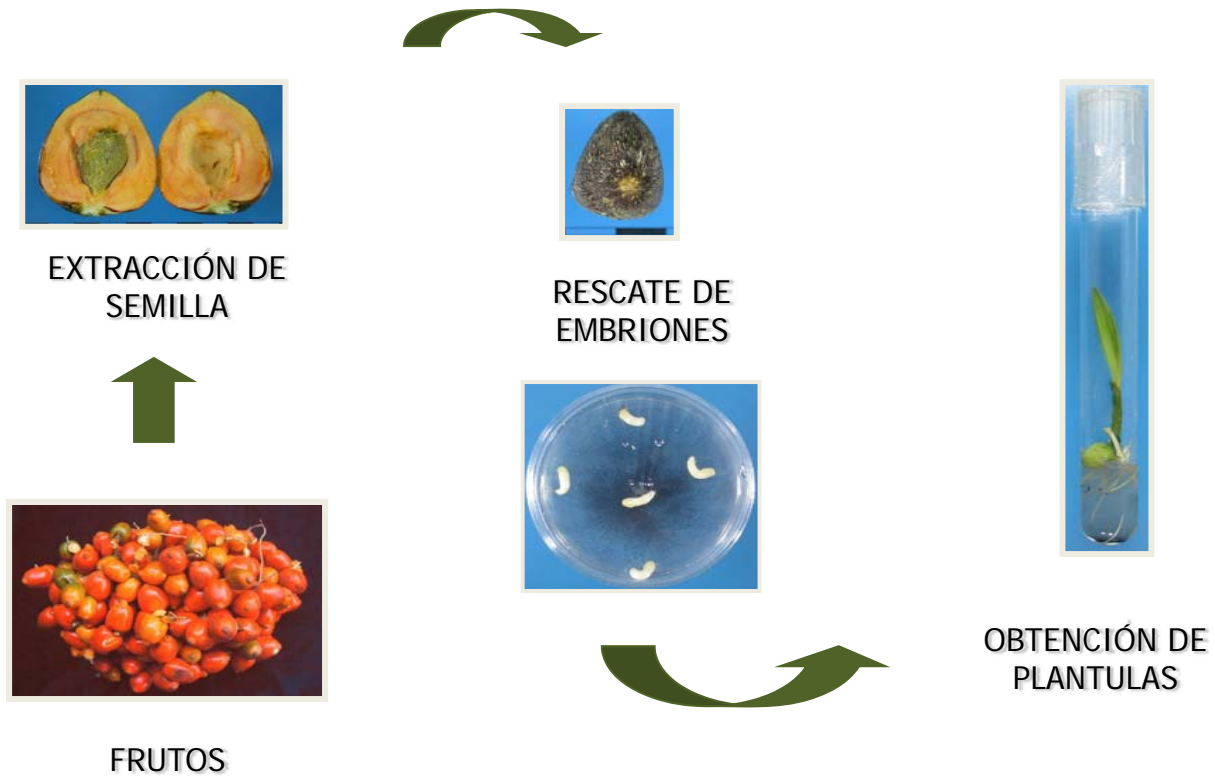


Proceso de extracción y siembra en el medio de cultivo de embriones cigóticos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) www.ciat.cgiar.org/urg



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)
Saneario de material vegetal



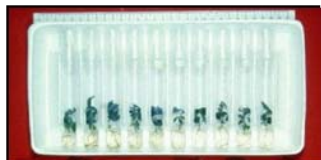
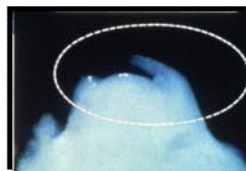
ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS



ESTACAS

TERMOTERAPIA

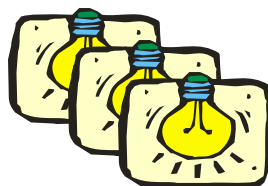
40°C/35°C



MATERIAL *in vitro*

TERMOTERAPIA

37°C/35°C



12 días



SEMILLAS

RESCATE DE
EMBRIONES



INDEXACIÓN

Fotoperíodo 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

CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO* COMO ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN DE RECURSOS FITOGENÉTICOS



CONSERVACIÓN *in vitro* – Mínimo crecimiento

BANCO GENÉTICO *in vitro* ACTIVO (IVAG)

MÍNIMO CRECIMIENTO

CONDICIONES FÍSICAS



CONDICIONES QUÍMICAS

Factores ambientales

Composición del medio



Temperatura

Reguladores osmóticos

Fotoperíodo

Reguladores de crecimiento (Relaciones h.)

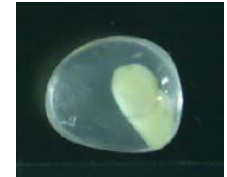
Intensidad lumínica

Inhibidores del etileno

Recipientes de cultivo

Agente gelificante

[O₂]



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°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).



CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA *IN VITRO*

Requerimiento de pequeño espacio

Plantas libres de enfermedades

Alta estabilidad genética

Alto potencial de propagación

Distribución segura de germoplasma



MÉTODOS QUE CONTROLAN EL DESARROLLO *IN VITRO*

- MODIFICANDO LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO
- DISMINUCIÓN DEL POTENCIAL OSMÓTICO
- USO DE ALGUNOS RETARDANTES E INHIBIDORES DE CRECIMIENTO
- CONSERVACIÓN A BAJAS TEMPERATURAS
 - 2- 5°C para especies de zonas frías
 - 8-17°C para especies subtropicales
 - 20-24°C para especies tropicales
- USO DE INHIBIDORES DE ETILENO



CONDICIONES DE CONSERVACIÓN *IN VITRO* EN CIAT-PRG

Temperatura constante de 23-24 °C

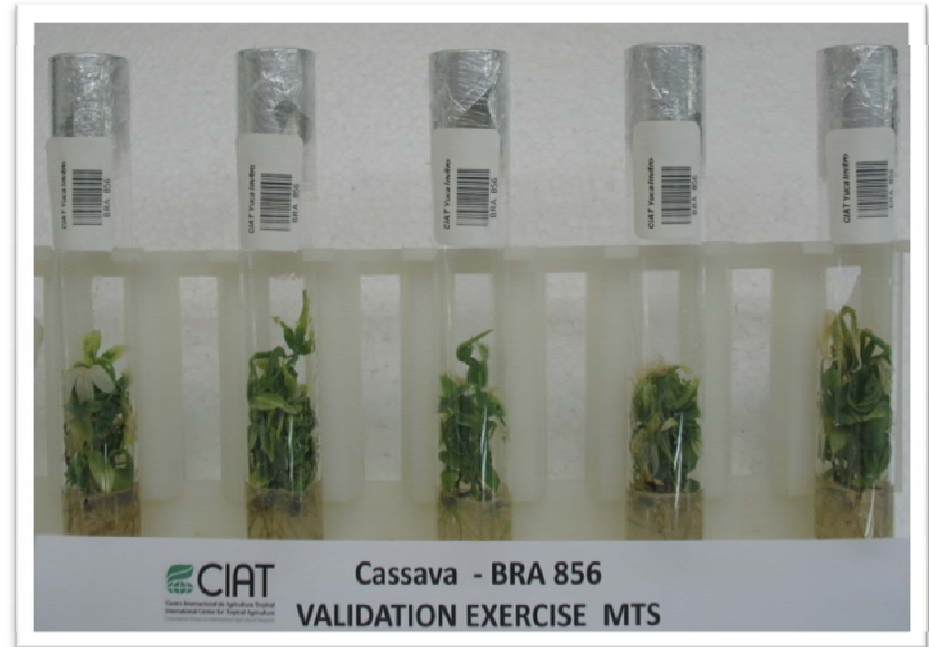
Fotoperíodo 12 horas día/noche con
1000 lux de iluminación

Medio basal de Murashige- Skoog
Modificado

Inhibidor del etileno: Nitrato de plata

Tubos de ensayo 25x150 mm cubiertos
con papel aluminio y sellados con cinta

Cinco tubos son mantenidos por clon



Tiempo de conservación:

8 – 12 meses (8S)

18- 24 meses (NP)



PROCEDIMIENTOS PARA LA INTRODUCCIÓN A LA CONSERVACIÓN *IN VITRO*

Indización
Negativo
(LSG)

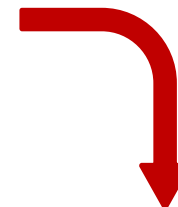


MICROPROPAGACIÓN



3 Explantes/Tubo

Medio conservación
(8S/ NP/12A) - (5 tubos)



CUARTO CONSERVACIÓN



Temperatura: 23-24°C

CUARTO CRECIMIENTO

2-3 semanas



Temperatura: 27-28°C

Lumínica: 1000 lux

Fotoperiodo: 12 horas

Calidad luz: lámparas
fluorescentes, tipo luz día

Humedad relativa: 50-70%



Tubos: 25x150 mm

Tapas: Papel aluminio

Sellados: Cinta extensible



PROCEDIMIENTOS CONSERVACIÓN *IN VITRO*



MONITOREO



MENSUALMENTE

- Contaminación
- Senescencia
- Número ápices
- Número nudos
- Presencia-ausencia raíces
- Presencia-ausencia callo
- Muerte cultivo

CUARTO CRECIMIENTO
(2-3 SEMANAS)



REGISTRO SALIDA



SUBCULTIVO



REGISTRO ENTRADA



CONSERVACIÓN - Documentación

Developer/2000 Forms Runtime for Windows 95 / NT - [BANCO IN VITRO GERMOPLASMA YUCA]

Acción Edición Consulta Bloque Registro Campo Ayuda

Accesión Género Especie

Conservación Ubicación Indexación Cambio de Med

Variedad

	Fecha Entrada		Medio Cultivo	Fecha Salida		Causa Salida
1	<input type="text" value="15/11/2005"/>	<input type="text" value="8S"/>	<input type="text" value="MEDIO DE CONSERVACIO"/>	<input type="text" value="11/10/2006"/>	<input type="text" value="S"/>	<input type="text" value="SUBCULTIVO"/>
2	<input type="text" value="15/11/2005"/>	<input type="text" value="8S"/>	<input type="text" value="MEDIO DE CONSERVACIO"/>	<input type="text" value="11/10/2006"/>	<input type="text" value="S"/>	<input type="text" value="SUBCULTIVO"/>
3	<input type="text" value="15/11/2005"/>	<input type="text" value="8S"/>	<input type="text" value="MEDIO DE CONSERVACIO"/>	<input type="text" value="11/10/2006"/>	<input type="text" value="S"/>	<input type="text" value="SUBCULTIVO"/>
4	<input type="text" value="15/11/2005"/>	<input type="text" value="8S"/>	<input type="text" value="MEDIO DE CONSERVACIO"/>	<input type="text" value="11/10/2006"/>	<input type="text" value="S"/>	<input type="text" value="SUBCULTIVO"/>
5	<input type="text" value="15/11/2005"/>	<input type="text" value="8S"/>	<input type="text" value="MEDIO DE CONSERVACIO"/>	<input type="text" value="11/10/2006"/>	<input type="text" value="S"/>	<input type="text" value="SUBCULTIVO"/>

Responsable_Entrada Responsable_Salida

Bonsai Designada Core Disponible Enter

Limpiar forma
Record: 2/?



PROMEDIO MESES CORTO PLAZO

Variedad BRA 975

Meses

15.

14.

6.2

18.

16

23.

12.

9.9

12.

18.

10.

11.

20.

Promedio 14.3



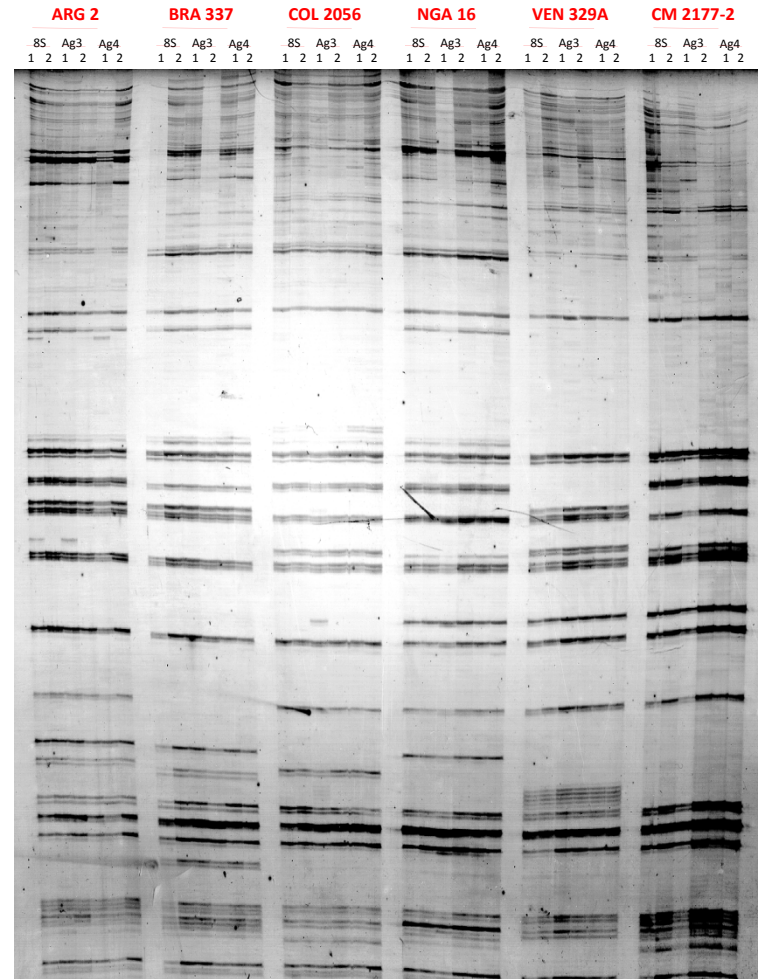
CRECIMIENTO MÍNIMO



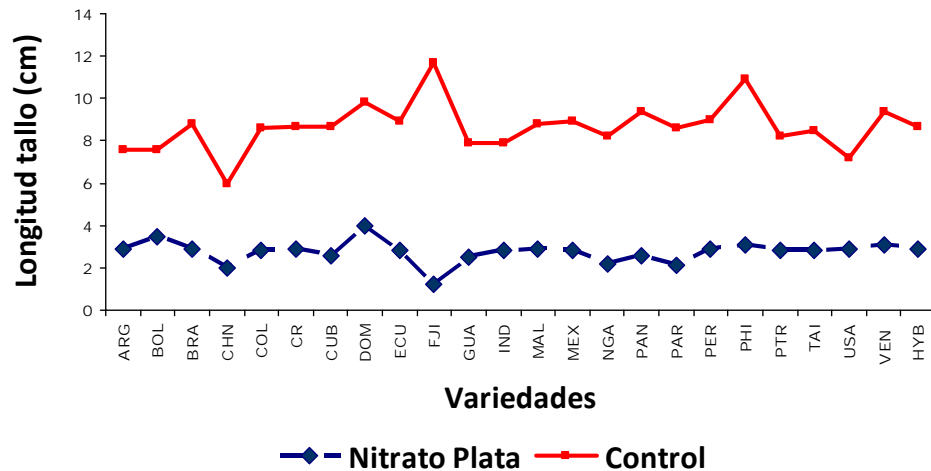
CONTROL

NITRATO PLATA

- ✓ Aumento tiempo conservación
- ✓ Duplicado seguridad colección



- ✓ Estabilidad genética verificada - AFLPs

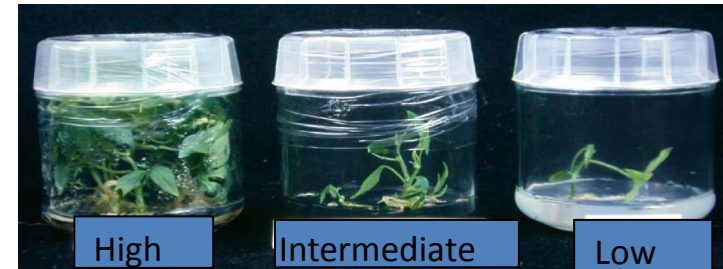


Fuente: Mafla *et al.*, 2004



CRIOCONSERVACIÓN EN YUCA

- ✓ Establecimiento de la técnica encapsulación- deshidratación
- ✓ 95% de los clones de la colección núcleo
- ✓ 3 grupos de respuesta evaluados
Alta (70-97%), intermedia (30 -70%), Baja (<30%)
- ✓ 60 clones evaluados en el campo



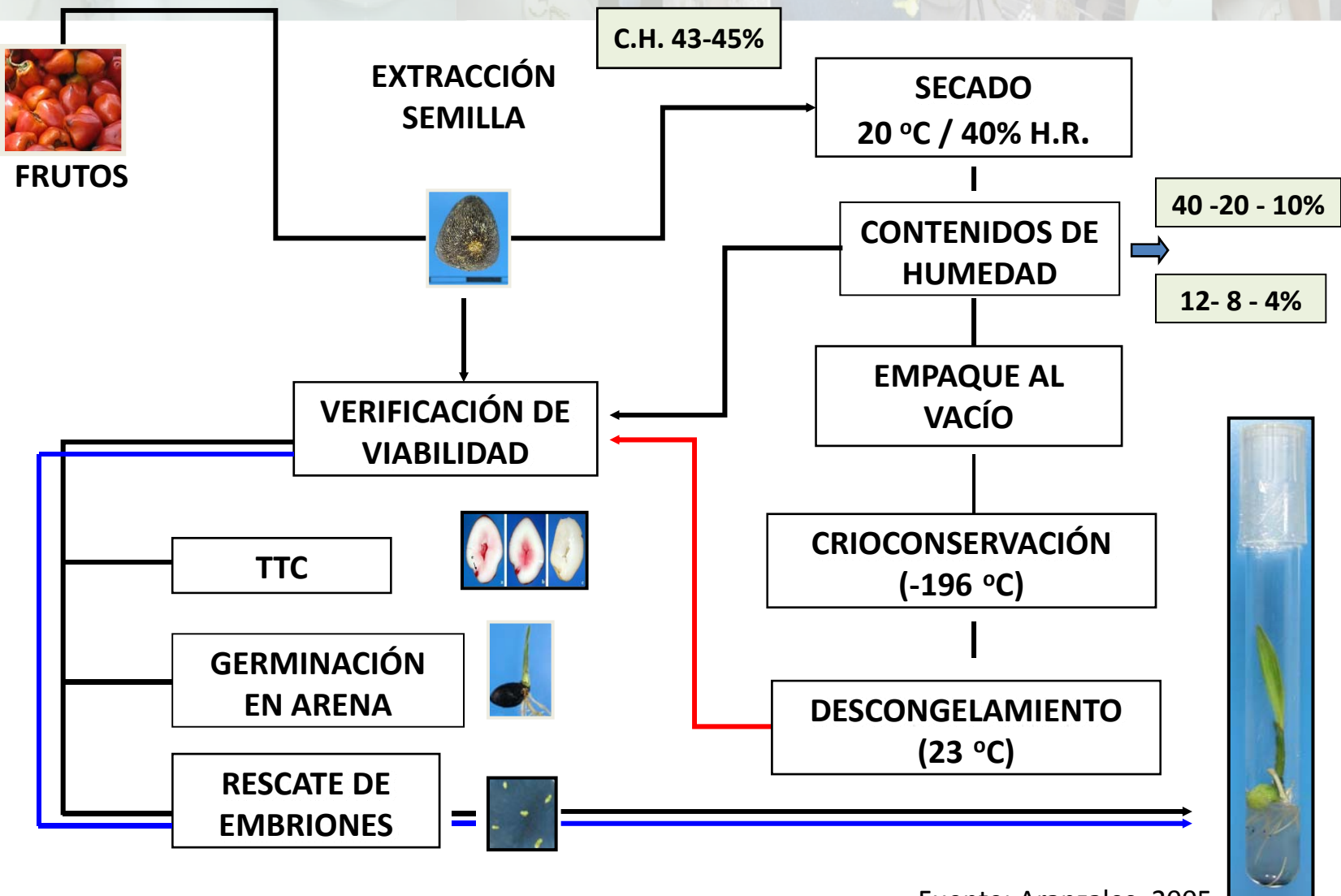
Cassava cryopreservation by rapid freezing methodology.

R. H. Escobar¹, N. Manrique, L. Muñoz, A. Rios, D. Debouck and J. Tohme
Agrobiodiversity and Biotechnology Project.
International Center for Tropical Agriculture (CIAT Acronyms in Spanish)
Km 17 Recta Cali-Palmira. A.A. 6713 Cali-Colombia
<mailto:r.escobar@cgiar.org>

Note: This methodology was proposed by the validation exercise developed as a GPG-2 initiative among other CG centers.

This protocol is a modification of Escobar and Roca, W.M. (1997), Cryopreservation of cassava shoot tips through rapid freezing. *African Journal of Root and Tuber Crops*. 2: 214-215.

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 PRG- CIAT



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

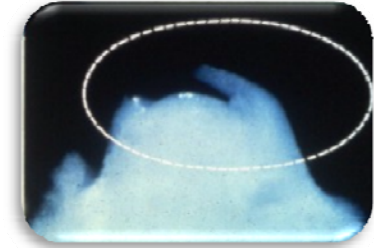
www.ciat.cgiar.org/urg



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

VARIETADES
EN CAMPO



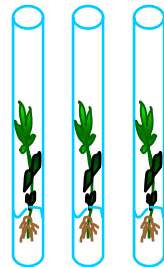
ESTACAS
(Invernadero)



TERMOTERAPIA
40°C diurna
35°C nocturna

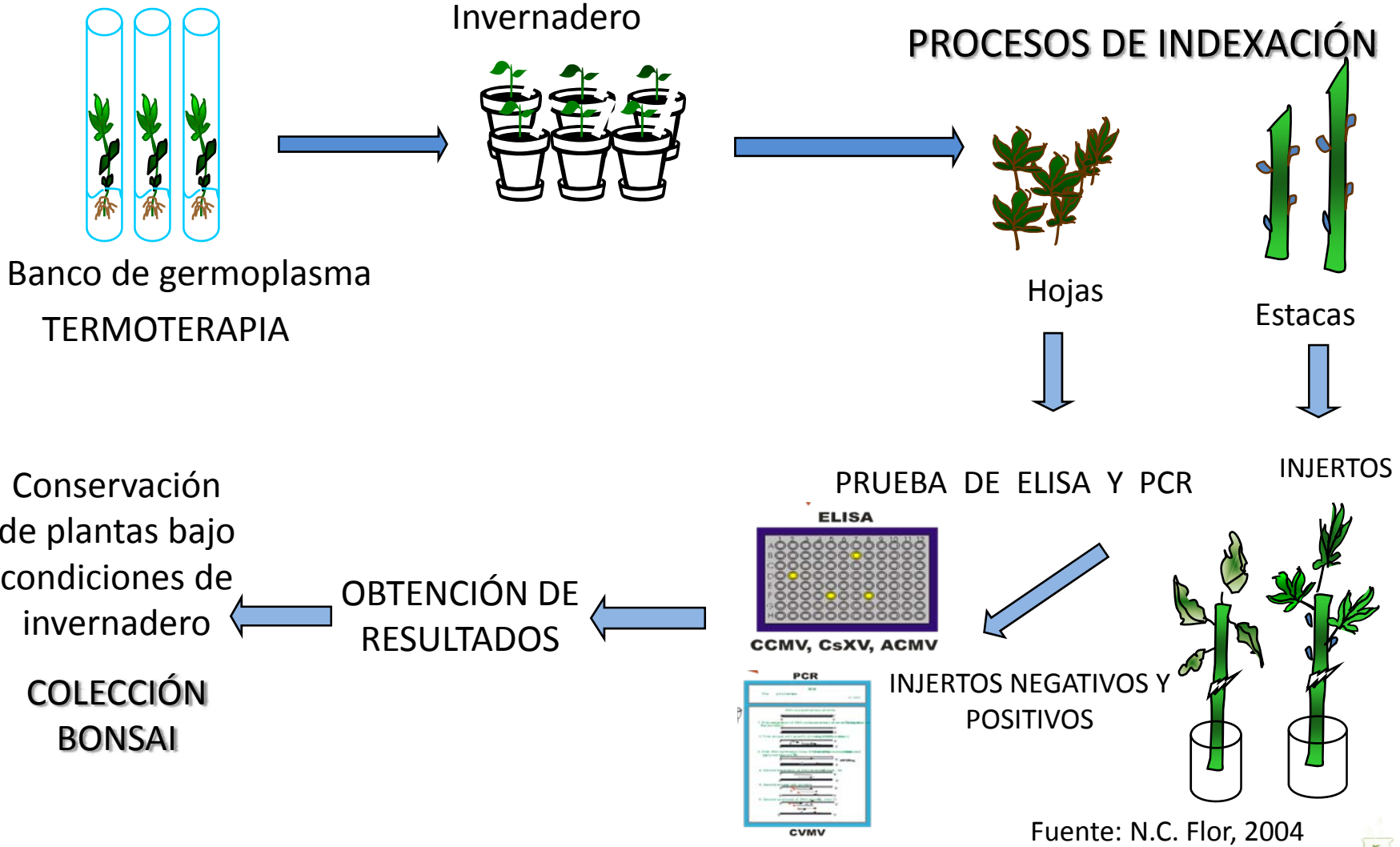


MERISTEMOS
0.1 A 0.2 mm

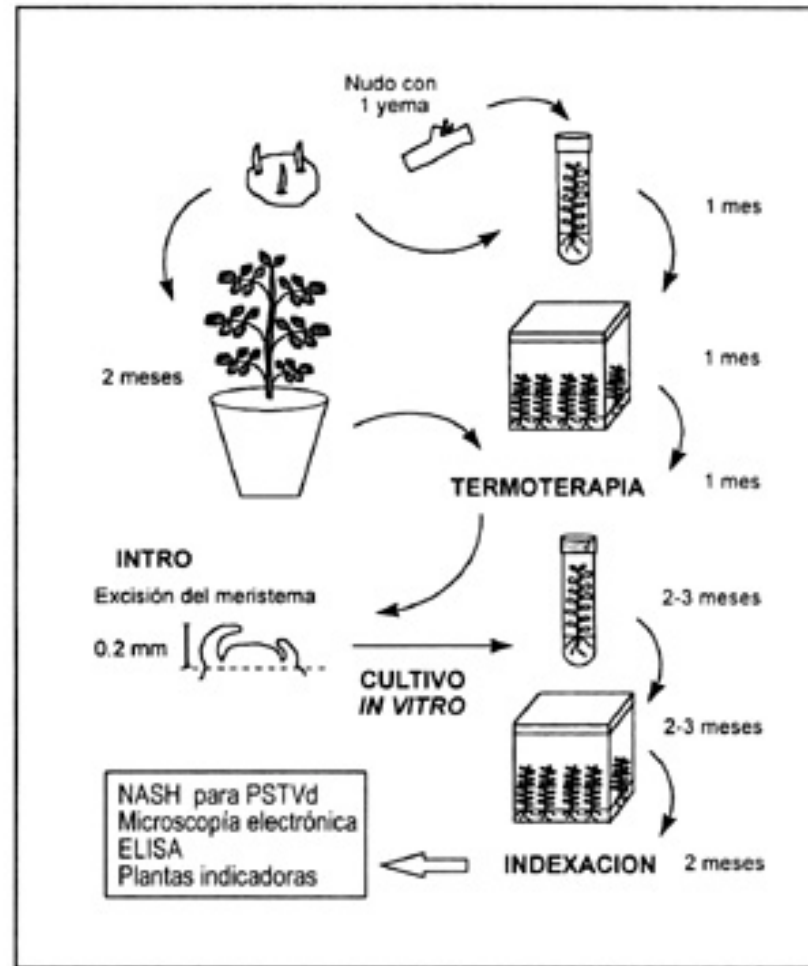


MICROPROPAGACIÓN
Plántulas





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 JENGIBRE¹

Alejandro Hernández-Soto², Andrés Gatica-Arias³, Silvana Alvarenga-Venutolo⁴



Sistemas de propagación masiva a bajo costo

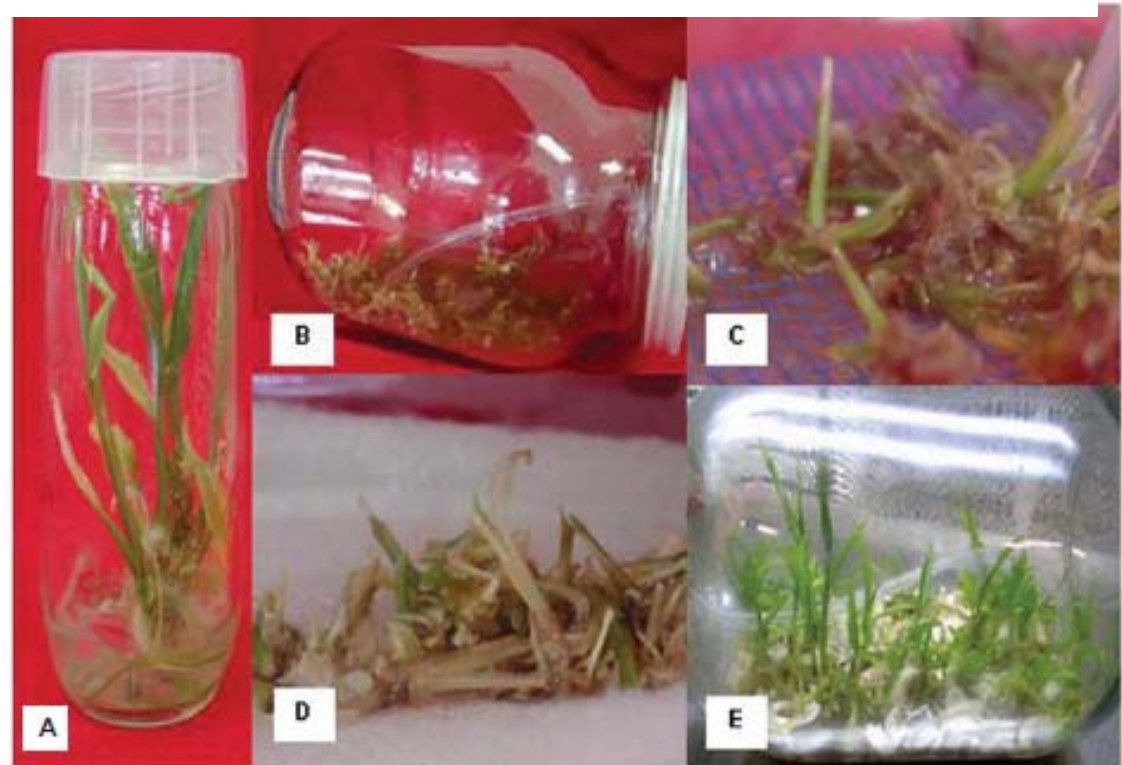
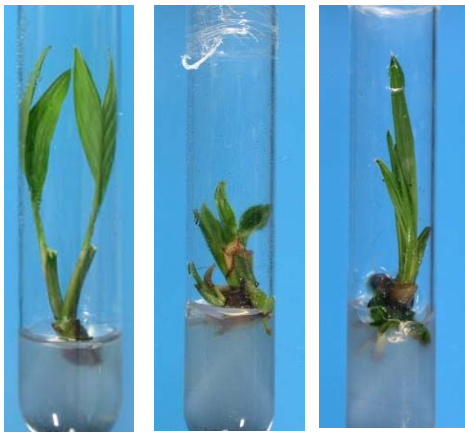


Figura 1. Características morfológicas de los explantes de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivados en: A. Medio de multiplicación en estado semisólido. B. Modelo simple. C. Modelo de la rejilla. D. Modelo de la espuma. E. Modelo de las piedras inertes. Cartago, Costa Rica. 2003.



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 incluso 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® 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).



A photograph showing two hands holding a small, clear glass vial. The hand on the left is wearing a white long-sleeved shirt, and the hand on the right is wearing a light-colored, possibly khaki, long-sleeved shirt. The background is a blurred field of crops under a bright sky. The word "GRACIAS" is written in large, bold, green capital letters across the center of the image.

GRACIAS

e.aranzales@cgiar.org