



Fotos: Juan Pablo Gallino

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES Y SUS APLICACIONES EN EL MEJORAMIENTO DE CULTIVOS

Dr. Juan Pablo Gallino, Aux. Lab. Marlene Bentancor, Lab. Asist. Junior Belén Bonilla, Lab. Asist. Junior Maribel Ceppa, Aux. Lab. Laura Rogel, Dra. Victoria Bonnacarrere

Área de Mejoramiento Genético y Biotecnología Vegetal

Este artículo plantea una introducción al cultivo de tejidos vegetales como herramienta de apoyo al mejoramiento genético vegetal, así como las principales líneas de investigación en las cuales se trabaja en el laboratorio de Biotecnología de INIA Las Brujas.

El cultivo de tejidos vegetales se ha utilizado ampliamente en todos los ámbitos de la agricultura ya que es una herramienta biotecnológica que se utiliza con varios fines, en particular como herramienta de apoyo al mejoramiento genético. La micropropagación masiva, la eliminación de virus, la obtención de doble haploides, la conservación a largo plazo del acervo genético, el rescate de embriones y la obtención de

transgénicos, son algunas de las aplicaciones del cultivo de tejido vegetal.

En el presente artículo se plantea una breve introducción sobre las metodologías mencionadas y se dan a conocer las líneas de investigación en las cuales se trabaja en el laboratorio de cultivo de tejidos de Biotecnología de INIA Las Brujas.



El cultivo de tejido vegetal consiste en el crecimiento de células, tejidos, órganos o plantas enteras en condiciones asépticas (Figura 1) en medios de composición artificial, bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas (*in vitro*) que incluyen un suministro adecuado de nutrientes, temperatura, intensidad lumínica, fotoperiodo y el adición de hormonas vegetales en muchos de los casos (Thorpe 2007) (Figura 2).

LA MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO*

La tecnología de cultivo de tejidos vegetales se utiliza ampliamente para la multiplicación de plantas a gran escala. Pequeños trozos de tejido (llamados explantes) se pueden utilizar para producir cientos y miles de plantas en un proceso continuo. Un solo explante puede multiplicarse en varios miles de plantas en un período de tiempo y espacio relativamente cortos bajo condiciones controladas, independientemente de la estación y el clima, durante todo el año (Akin *et al*, 2009).

La tecnología de micropropagación tiene un gran potencial para producir plantas de calidad superior, especialmente de materiales vegetales cuya genética les permite estar bien adaptados a las condiciones productivas, ya sea por tener altos rendimientos, resistencia a enfermedades y/o capacidades de tolerancia al estrés, entre otros. La producción de plantas mediante técnicas de micropropagación tiene varias ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación mediante semillas, esquejes, injertos, acodos aéreos, etc. Es un proceso más rápido que permite la producción y propagación de material vegetal



Figura 1 - Cámaras de flujo laminar utilizadas en el Laboratorio de Biotecnología de INIA Las Brujas para trabajar en condiciones asépticas.



Figura 2 - Cuarto de cultivo *in vitro* del Laboratorio de Biotecnología de INIA Las Brujas. En el mismo es posible regular la temperatura, intensidad de luz y duración del fotoperiodo.

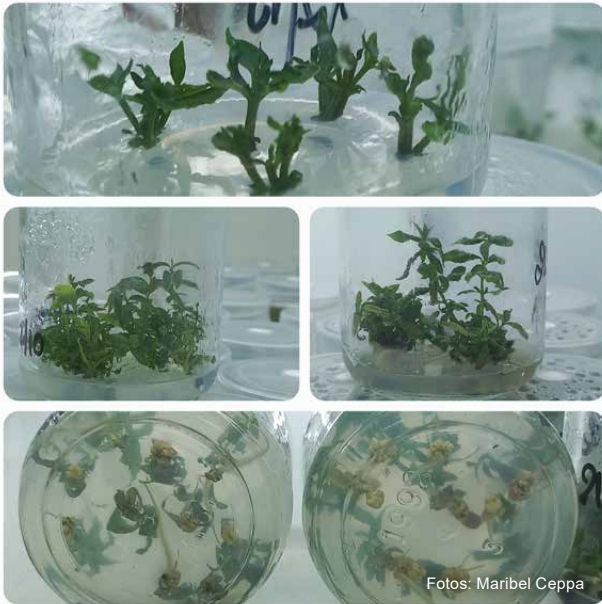


Figura 3 - Propagación *in vitro* de clones de eucaliptus. Luego de la esterilización superficial de las yemas, las mismas se colocan en medio con hormonas para estimular su proliferación. Una vez que se obtiene una cantidad suficiente de explantes se cambian a un medio con hormonas que estimulan la formación de raíces.

genéticamente homogéneo y libre de enfermedades. En INIA se utilizan las técnicas de micropropagación para la producción de plantas de papa, peral, manzano, boniato, arándano y eucaliptus (Figura 3).

BANCOS DE GERMOPLASMA

Un banco de germoplasma es un repositorio de semillas, tejidos o plantas que tiene por objetivo preservar la diversidad genética. Las especies de plantas que no producen semillas o que tienen semillas "recalcitrantes" que no pueden almacenarse durante un largo período de tiempo, pueden conservarse con éxito mediante técnicas *in vitro*. (Morrell y Mayer, 2017).

En INIA Las Brujas se cuenta con un banco de germoplasma *in vitro* donde se salvaguardan 90 clones de papa silvestre, 535 de papa comercial y 334 clones de papa de nuestro programa de mejoramiento y proyectos en conjunto con la Facultad de Agronomía (Udelar). Por otra parte, se cuenta con accesos de eucaliptus, manzano, peral, boniato y arándano.

CULTIVO DE EMBRIONES Y DE ANTERAS

Existen varias técnicas de cultivo de tejidos que son muy utilizadas en los programas de mejoramiento, entre ellas el cultivo de embriones y el cultivo de anteras para la obtención de doble haploides. El cultivo de embriones es un tipo de cultivo de tejido vegetal que se utiliza para crecer embriones a partir de semillas y óvulos en un medio nutritivo. En el mismo, la planta

En INIA se utilizan las técnicas de micropropagación para la producción de plantas de papa, peral, manzano, boniato, arándano y eucaliptus.

se desarrolla directamente a partir del embrión o indirectamente mediante la formación de callos (masa conformada por tejido vegetal no diferenciado) y luego la posterior formación de brotes y raíces. La técnica se ha desarrollado para romper la latencia de las semillas y promover el vigor de las mismas. Es una técnica eficaz que se emplea para acortar el ciclo de reproducción de las plantas mediante el crecimiento de embriones extirpados y da como resultado la reducción del largo período de latencia de las semillas (Rogo *et al.*, 2023).

En INIA, esta técnica se utiliza para la creación y/o selección de individuos triploides de citrus ya que los mismos suelen presentar esterilidad femenina y masculina produciendo, en consecuencia, fruta sin semilla. Una estrategia para la generación de triploides es el rescate de posibles embriones provenientes de hibridaciones convencionales (libres o dirigidas) y otra es la creación de triploides mediante hibridaciones de genotipos diploides ($2n=2x$) con genotipos tetraploides ($2n=4x$) (Rivas *et al.*, 2023)(Figura 4).



Figura 4 - Rescate de embriones de posibles triploides, llevado a cabo en las instalaciones de INIA Las Brujas. Las semillas son esterilizadas superficialmente. Posteriormente, en cámara de flujo se extirpan los embriones y se colocan en medios adecuados para su desarrollo. Finalmente se obtienen plantas que serán analizadas para confirmar su ploidía.

Las técnicas de cultivo de tejidos permiten producir plantas homocigotas en un período de tiempo relativamente corto a través de cultivos de anteras. Los haploides son plantas estériles que tienen un único conjunto de cromosomas que se convierten en diploides homocigotos mediante duplicación cromosómica espontánea o inducida. La duplicación de los cromosomas restablece la fertilidad de las plantas, lo que da como resultado la producción de haploides dobles con potencial para convertirse en nuevos cultivares de reproducción pura. La tecnología de la haploidía se ha convertido actualmente en una parte integral de los programas de mejoramiento vegetal, al acelerar la producción de líneas endogámicas y superar las limitaciones de la latencia de las semillas y la inviabilidad de los embriones.

En INIA se utiliza esta técnica en el marco de los programas de mejoramiento de arroz para la obtención de líneas doble haploides lo que permite acortar el tiempo de obtención de homocigosis o líneas puras (Figura 5).

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

La transformación genética es el aspecto más reciente del cultivo de células y tejidos vegetales que proporciona el medio para transferir genes con rasgos deseables a plantas hospedantes y recuperar plantas transgénicas. La técnica, además de usarse para producir organismos transgénicos, es necesaria para la generación de plantas editadas genéticamente no transgénicas. La edición génica es una herramienta que permite realizar mutaciones dirigidas en el ADN, produciendo individuos con características productivas deseables y no transgénicas.

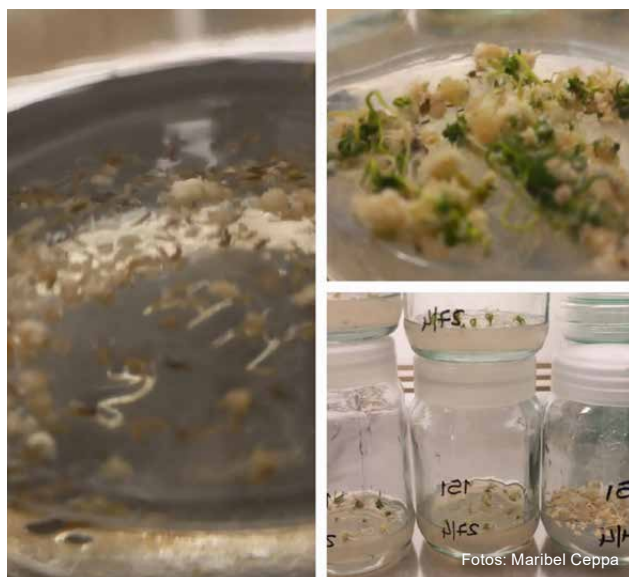


Figura 5 - Obtención de plantas doble haploides de arroz a partir de cultivo de anteras realizado en la estación INIA Las Brujas. Las anteras son cultivadas en un medio que promueve la formación de callos y, posteriormente, estos son trasladados a uno que promueva la formación de tallo y raíz.

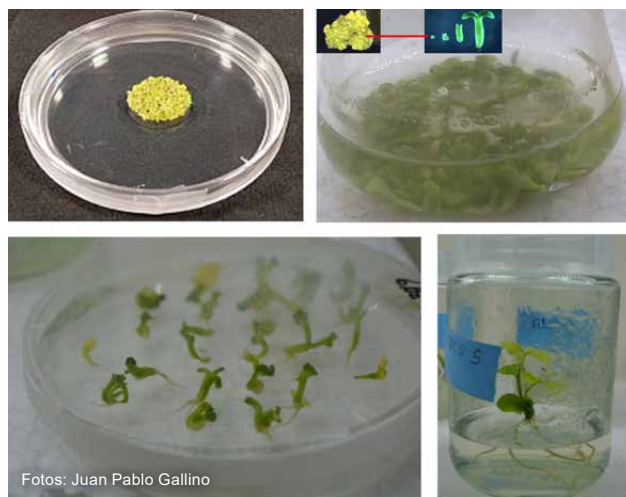


Figura 6 - Obtención de plantas transgénicas de soja utilizando la técnica de biolística. En esta técnica se bombardean embriones somáticos con partículas recubiertas de ADN y posteriormente se induce a la diferenciación y germinación de los mismos, obteniéndose plantas regeneradas.

La transformación genética se puede realizar por medio de vectores biológicos (*Agrobacterium tumefaciens*) o bombardeo de partículas (biolística) permitiendo incorporar características nuevas al genoma. Estas tecnologías han permitido independizarse de la barrera natural impuesta por la incompatibilidad de cruzamientos, y, en consecuencia, ha aumentado en forma casi ilimitada la disponibilidad de genes. En el laboratorio de biotecnología de INIA Las Brujas se utilizan estas tecnologías con el fin de generar plantas editadas no transgénicas, particularmente de soja (Figura 6).

REFERENCIAS

Akin-Ikodu PE, Ibitoye DO y Ademoyegun OT. (2009). Tissue culture as plant production technique for plant horticultural crop. Afr. J. Biotechnol., 8(16): 3782-3788.

Morrell JM, Mayer I. Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. Zygote. 2017 Oct;25(5):545-557. doi: 10.1017/S0967199417000442. Epub 2017 Aug 24. PMID: 28835292.

Rivas F, Bertoni E, Rolón R, De Los Santos A, Britos A, Arruabarrena A y Giambiasi M.

Libro de Resúmenes. X congreso Argentino de citricultura 6 al 9 de junio de 2023, Concordia, Entre Ríos, Argentina.

Rogo U, Fambrini M, Pugliesi C. Embryo Rescue in Plant Breeding. Plants (Basel). 2023 Aug 29;12(17):3106. doi: 10.3390/plants12173106. PMID: 37687352; PMCID: PMC10489947.

Thorpe, T. (2007). History of plant tissue culture. J. Mol. Microbial Biotechnol. 37: 169-180.