

Universidad  
Politécnica  
de Cartagena

## MICROPROPAGACIÓN

Biotecnología Vegetal. Curso 2013-2014

## 1. Cultivo *in vitro*: conceptos básicos

2

□ **Conceptos básicos** para comprender el cultivo *in vitro* de plantas:

- Totipotencia
- Plasticidad
- Competencia
- Determinación

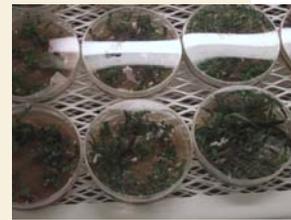
Desdiferenciación/Diferenciación  
Reguladores de crecimiento



## 2. ¿Qué es la micropropagación?

3

- El arte y la ciencia de multiplicar plantas *in vitro*
- “... la propagación asexual o vegetativa (multiplicación) de plantas *in vitro*”
- Implica:
  - ▣ Regeneración
  - ▣ Multiplicación
  - ▣ Uniformidad?



## 3. Etapas de la micropropagación

4

- **Rápido progreso** de las técnicas de micropropagación se debe a **Murashige y Skoog** que:
  - ▣ dividieron el proceso en 4 etapas.
  - ▣ desarrollaron un medio artificial “fiable” para la propagación de plantas (Murashige & Skoog, 1962)



Toshio Murashige. Born 1930



Folke Karl Skoog (1908–2001)

<http://www.nap.edu>  
<http://www.ishs.ir>



## Requisitos para la micropropagación. Composición medio de cultivo

5

### Compuestos inorgánicos

**Macronutrientes:**  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$

**Micronutrientes:**  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{I}^-$

### Carbohidratos

Sacarosa, glucosa,  
Mio-inositol (membranas: fosfatidil-  
inositol; ácido fítico)

### Vitaminas necesarias para ciertos procesos fisiológicos

Tiamina (B1) (metabolismo carbohidratos)  
Piridoxina (B6) (metabolismo de  
aminoácidos; transferencia grupos amino)  
Acido nicotínico (metabolismo energético)  
Biotina (cofactor enzimático)

### Esterilización

1.2 atmósferas, 15-20 minutos en autoclave

### Aminoácidos

Gln, Asn (fuente de N reducido)  
Gly (en el medio original MS; no necesario)  
L-Tyr (estimular la formación vástagos)  
Mezcla de aminoácidos (ej. hidrolizado de  
caseína)

### Reguladores del crecimiento

Auxinas  
Citoquininas  
Giberelinas

Necesarias para  
la proliferación

### Soporte inerte (medios semisólidos)

Agar (0,7 a 1%)  
Gelrite®

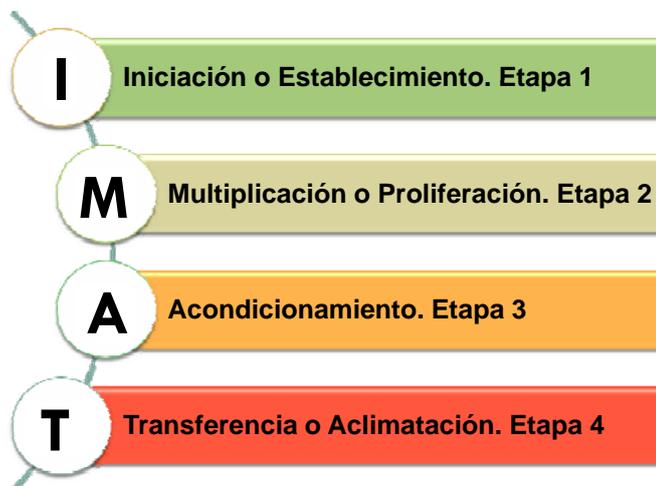
### pH

5,6 – 5,8



## 3. Etapas de la micropropagación

6



### 3. Etapas de la micropropagación

7

#### □ **Iniciación. Etapas 0 y I**

- Elección y acondicionamiento de la planta madre
- Elección del explante inicial y de la formulación del medio de cultivo
- Desinfección superficial de los explantes
- Establecimiento del cultivo *in vitro*

} Etapa 0

#### □ **Multiplicación. Etapa 2**

- Propagación del material

#### □ **Acondicionamiento o preparación para la transferencia *ex vitro*. Etapa 3**

- Enraizamiento
- Elongación
- Biotización
- ...

#### □ **Transferencia o Aclimatación. Etapa 4**

- Paso de las plantas crecidas *in vitro* a las condiciones de maceta o a campo



8

#### 3.1. Etapas implicadas en un protocolo de micropropagación



## Etapa 0: selección y preparación de la planta madre

9

- **Éxito del proceso depende de esta etapa**
- **Planta madre: Estado fisiológico de la planta madre** influye:
  - Saludable. Estado sanitario planta madre (primordial)
  - Vigor. Crecimiento activo. Aplicación planta madre: GAs y/o CKs
  - Buen nivel nutricional y tratamiento (hormonal, fotoperiodo, luz, riego, etc)
    - Viabilidad y desarrollo del explante
- **Explante y origen del explante**
  - Totipotencia, competencia y determinación
    - Tipo de célula y tejido
    - Edad del explante
    - Genotipo
  - Genes que regulan la morfogénesis conduciendo a la regeneración de la planta; *KNAT1*, gen homeótico que regula la formación de vástagos adventicios en *Arabidopsis*

### Estado fisiológico:

- Vegetativo/floral
- Juvenil/maduro
- Activo/letargo



## Stock de plantas madre

10

- Plantas madre se mantienen en cultivo *in vitro*
- Plantas sin patógenos, alto vigor
- Cultivo lento
- Sirven como fuente de explantos para la fase 2 de multiplicación



11

### Elección del explanto

□ **Explanto:**  
célula, tejido,  
órgano de una  
planta que se  
utiliza para  
iniciar un cultivo  
*in vitro*

Tamaño explanto

The diagram shows a plant with several parts labeled: Tip bud, Leaf, Axillary bud, Internode, and Root. Red arrows indicate that explants are taken from the tip bud, leaf, axillary bud, and internode, and placed into a test tube containing a growth medium.

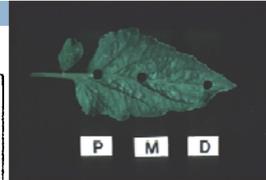
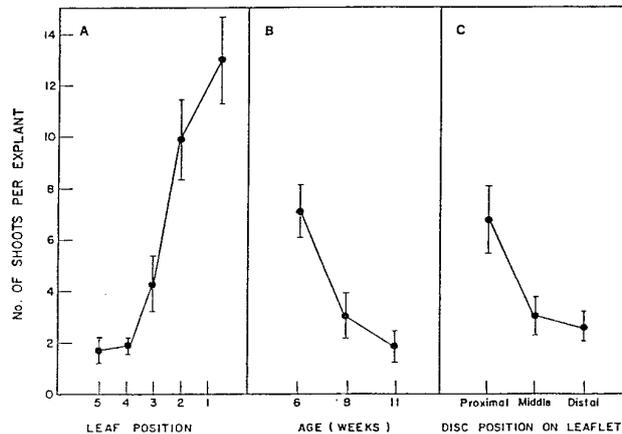
12

### Elección del explanto

Propiedades deseables del explanto	Tipo de explanto
Fácil desinfección	Meristemo apical
Tejido joven	Yemas axilares
Respuesta al cultivo	Semillas
Importancia del stock de plantas	Hipocotilo (de semillas germinadas)
	Hojas
	Raíces

## Efecto del estado de desarrollo sobre la formación de vástagos en discos foliares de tomate

13



## Etapa 1: iniciación de un cultivo aséptico

14

Lavar el material con agua corriente. Varios minutos



Sumergir el material en etanol (70%). 15-30 segundos. Quitar burbujas de aire, sustancias ceras



Sumergir el material en hipoclorito sódico al 5-20% y detergente (2 gotas de Tween-20). 5-30 min. Agitar



Lavar con abundante agua destilada estéril (en cabina de flujo laminar). El primer lavado de pocos segundos e ir aumentando la duración en los restantes lavados (4 ó 5 veces)



## Etapa 1: iniciación de un cultivo aséptico

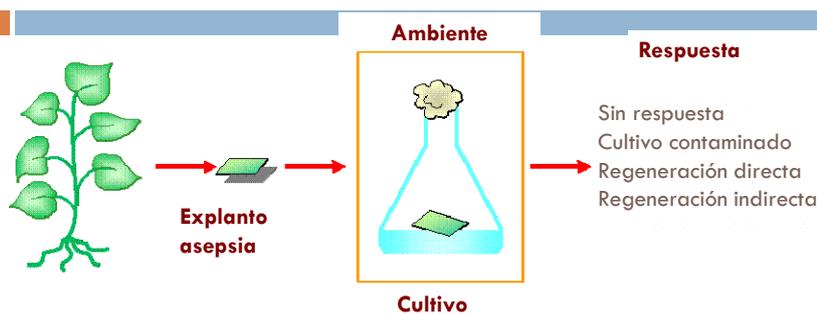
15

- Establecimiento del cultivo *in vitro* (cabina flujo laminar):
  - ▣ Corte del material
  - ▣ Siembra del material (explantos) en medio nutritivo
- Cultivo en cámara en condiciones controladas de luz y temperatura
- Determinación de contaminaciones endógenas



## Posibles respuestas

16



## Etapa 2: Multiplicación

17

### Origen de los nuevos vástagos :

- A partir de yemas pre-existentes:
  - ▣ Yemas apicales y axilares/laterales
- Mediante morfogénesis directa
  - ▣ Formación de centros meristemáticos directamente a partir de células del explanto
  - ▣ Formación de embriones somáticos
- Mediante morfogénesis indirecta
  - ▣ Los centros meristemáticos se forman a partir de tejidos desorganizados *in vitro* (callos)
  - ▣ Los embriones somáticos se forman a partir de callos

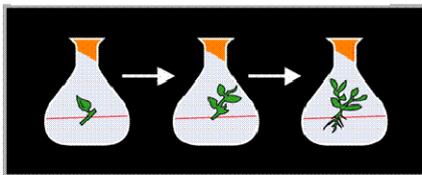
### Papel de los reguladores del crecimiento:

- División celular
- Expansión celular
- Diferenciación

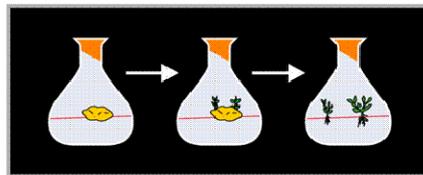


## Sistemas de micropropagación vegetal

### A) Yemas apicales y/o axilares

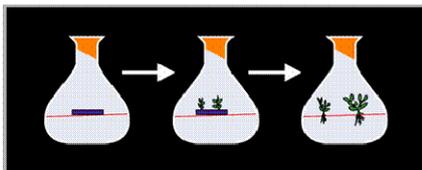


### C) Formación de yemas indirecta (callo)



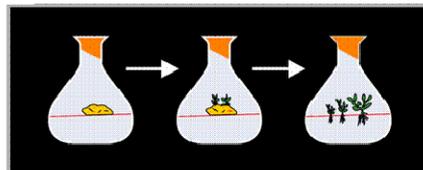
Formación de yemas indirecta. Fase de callo previa. Ej. tabaco, patata

### B) Formación de yemas sobre explantes



Formación de yemas de forma directa sobre un explanto. Ej., begonia, *Violeta africana*

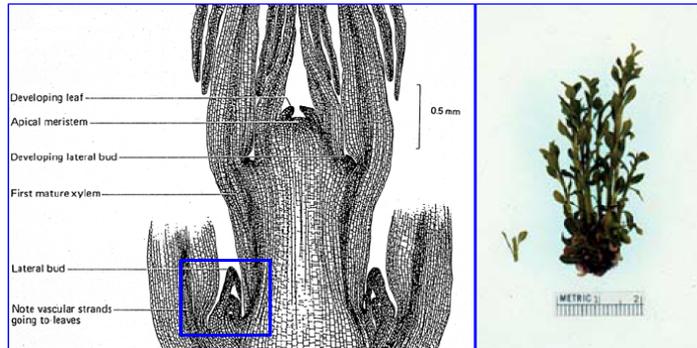
### D) Embriogénesis somática



## Métodos de multiplicación a partir de yemas pre-existentes

19

- La diferenciación de los meristemas del vástago lleva a la **formación y desarrollo de vástagos**; las células/tejidos son competentes y determinados para desarrollarse en vástagos



Las CKs promueven el desarrollo de yema axilares

## Tipos de explanto

20

The diagram shows a plant stem with labels: 'Meristemo' (apical meristem), 'Meristemo más primordios foliares' (axillary meristems), and 'Uno o más nudos' (one or more nodes). It illustrates the development of a new shoot from these meristems. To the right, three numbered photographs (1, 2, 3) show a person using a scalpel to excise explants from a stem. Below the diagram, a legend identifies 'hoja' (leaf), 'entrenudo' (internode), 'nudo' (node), and 'Yema axilar' (axillary bud).

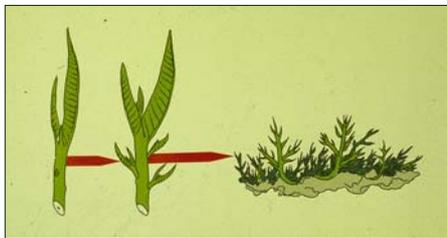
## Métodos de multiplicación a partir de yemas pre-existentes

21

### □ Proliferación de yemas pre-existentes

- ▣ Método muy empleado (>95%).
- ▣ Ventajas
  - Estabilidad genética
  - Simple y rápido
  - Tasa de multiplicación alta (3-8/mes)

Representa la aceleración *in vitro* del crecimiento natural de dichos meristemas.



El crecimiento de las yemas axilares estimulado por el tratamiento de CKs.

Los vástagos proceden de meristemas pre-existentes.



## Métodos de multiplicación a partir de yemas pre-existentes

22

### □ Proliferación de yemas pre-existentes

- ▣ Desventajas
  - Poco eficiente (mayor eficacia la embriogénesis somática o morfogénesis directa)
  - Puede haber dificultades con enraizamiento
  - En algunas especies, las CKs no promueven la formación de yemas axilares
  - Requiere mucho trabajo (subcultivos)
  - Uso de CKs puede provocar alteraciones génicas



## Métodos de multiplicación a partir de yemas pre-existentes

23

- **Cultivo de segmentos nodales** – No CKs o baja concentración de CKs en el medio



Ruptura de la dominancia apical.  
Crecimiento lento



## Métodos de multiplicación: morfogénesis directa



24

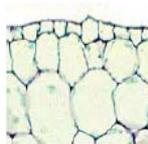
PRIMARY EXPLANT



MERISTEMOID



SHOOT MERISTEM



### □ Organogénesis directa

- Propagación a partir de explantes mediante la producción de vástagos adventicios (no a partir de meristemas pre-existentes)
- Los vástagos adventicios surgen a partir de una única célula que adquiere la competencia para la formación de un centro meristemático
- Cada centro meristemático es capaz de producir un nuevo vástago

## Métodos de multiplicación: morfogénesis directa

25

### Morfogénesis directa

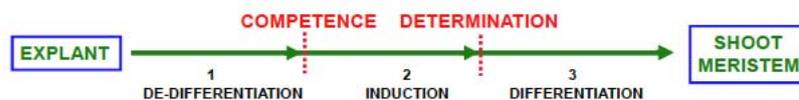
- **Ventajas**
  - ▣ Eficiente
- **Desventajas**
  - ▣ Alta probabilidad de inestabilidad genética



## Métodos de multiplicación: morfogénesis directa

26

- Origen de los vástagos adventicios. 4 fases:
  - ▣ 1. **Des-diferenciación** de células diferenciadas, lo que las hace **competentes** para **re-determinar** su "destino"
  - ▣ 2. Inducción de la división celular
  - ▣ 3. Formación del meristemo (**diferenciación**)
  - ▣ 4. Formación del vástago



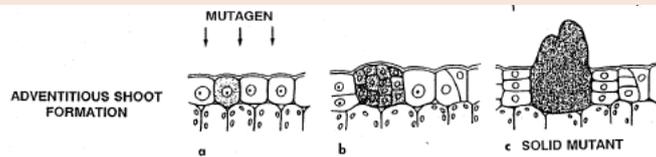
## Métodos de multiplicación: morfogénesis directa



27

- Origen de los vástagos adventicios.
  - ▣ Vástagos se originan a partir de una única célula
  - ▣ Células epidérmicas de hojas y tallos

### Tratamientos con agentes mutagénicos

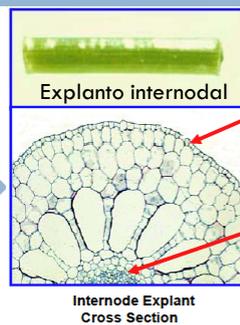


## Métodos de multiplicación: morfogénesis directa

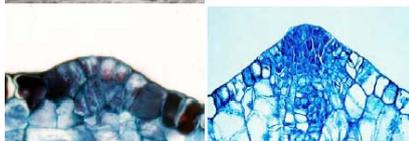


28

*Myriophyllum aquaticum*



10 días de cultivo



Direct Shoot Organogenesis



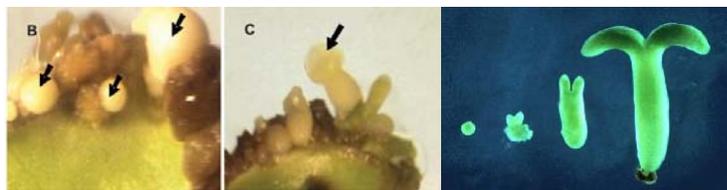
Direct Shoot Organogenesis

## Métodos de multiplicación. Morfogénesis directa: embriogénesis somática

29

### Morfogénesis directa

- Formación de embriones somáticos
  - ▣ Técnica de gran eficiencia



## Métodos de multiplicación. morfogénesis indirecta:

30

- Morfogénesis indirecta



Caulogénesis

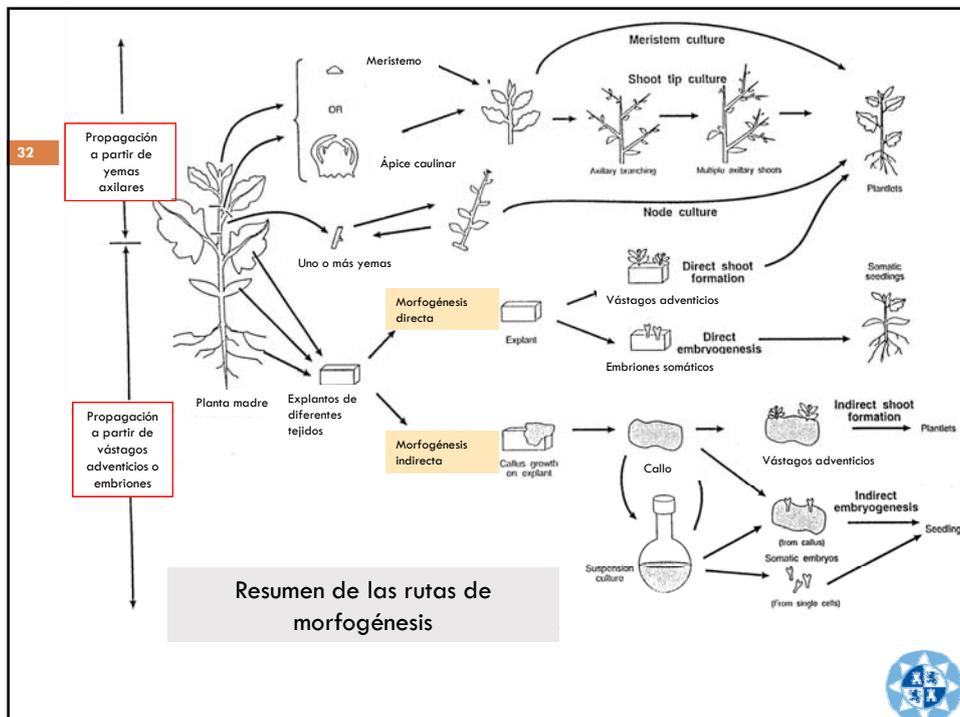
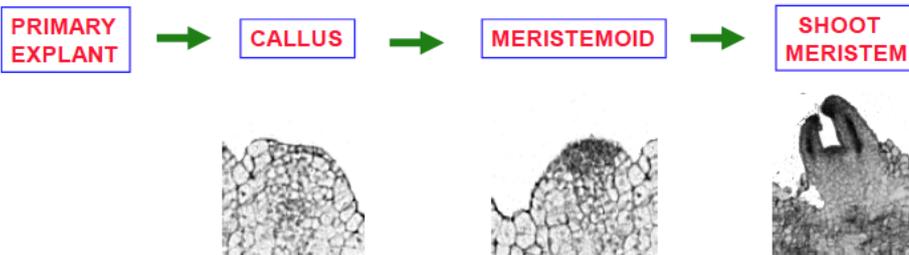
Embriogénesis somática

## Métodos de multiplicación: morfogénesis indirecta



31

- La formación de los centros meristemáticos es indirecta, surgen a partir de un fase previa de callo
- Un callo - masa de células diferenciadas y no diferenciadas que se dividen de forma activa



## Etapa 2: Multiplicación

33



La fase de proliferación. Hay que determinar:

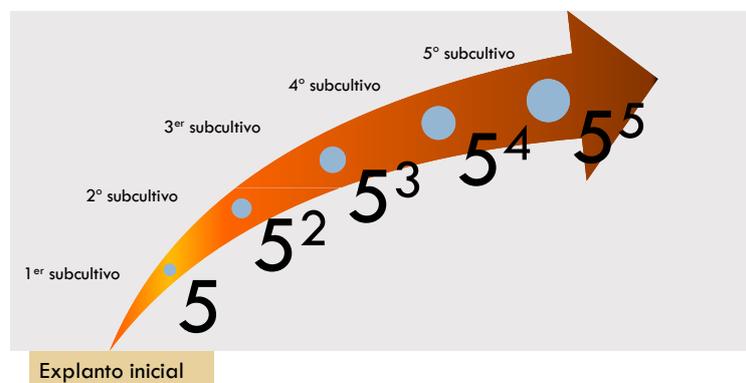
- La tasa de multiplicación (t.m.) se calcula a partir del número de brotes o vástagos obtenidos a partir de un explanto inicial, entre un subcultivo y el siguiente.
  - ▣ Esta tasa puede variar entre 2-20 brotes por mes, dependiendo de la especie en cuestión, entre otras variables.
- Longitud de los vástagos producidos
- Frecuencia de variabilidad genética
- Efecto de las citoquininas sobre el enraizamiento y sobre la tasa de supervivencia



## ¿Cuántas plantas se pueden obtener?

34

- Tasa de multiplicación =  $(n^{\circ} \text{ propágulos obtenidos}) / (\text{propágulo inicial} \times \text{tiempo})$



## Etapa 3: Acondicionamiento

35

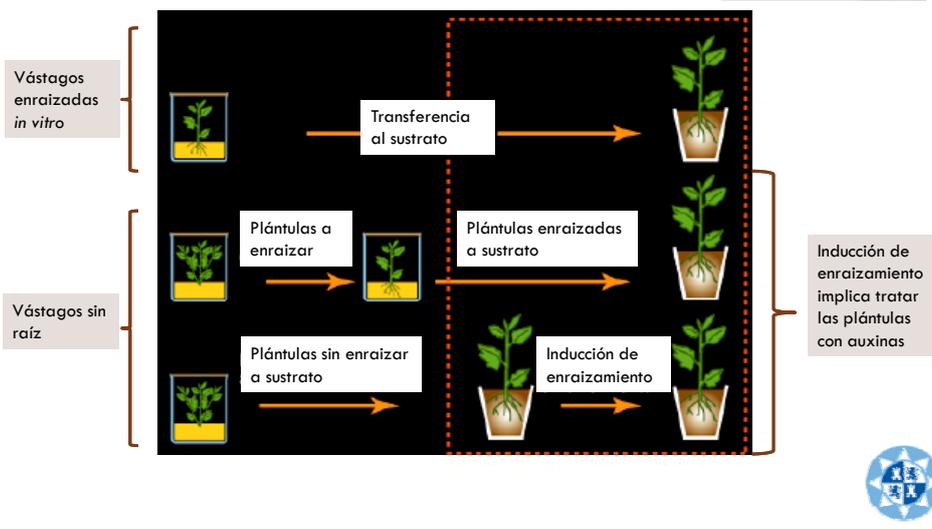
### Enraizamiento:

- Auxinas
- Cofactores
- Relación C:N
- Luz/Oscuridad
- Iniciación vs crecimiento
- Juvenil/rejuvenecido
- Genotipo



## Etapa 3: Enraizamiento

36



## Etapa 3. Enraizamiento *in vitro* vs *ex vitro*

37

### Enraizamiento *in vitro*

- No expone el brote al medio ambiente (ventaja)
- Raíces de distintos tipos según el tratamiento hormonal aplicado (auxinas)
  - No presentan raíces secundarias bien diferenciadas
  - Puede repercutir en la supervivencia del brote
    - En leñosas: raíces no funcionales

VS

### Enraizamiento *ex vitro*

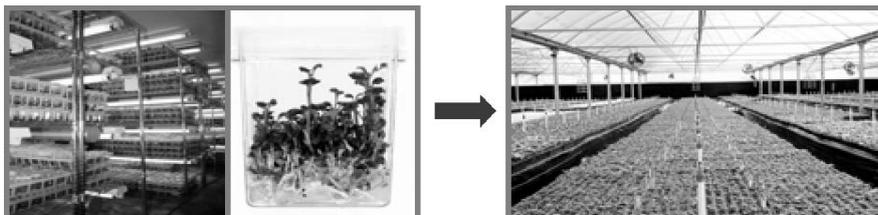
- Fácil manipulación
- Más barato:
  - Enraizamiento y aclimatación simultáneos
- Se evita que el sistema radical *in vitro* no sea funcional
  - Se asegura la continuidad vascular



## Etapa 4: Aclimatación

38

- Éxito de la micropropagación depende de la capacidad para aclimatar plantas vigorosas y de calidad desde condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*

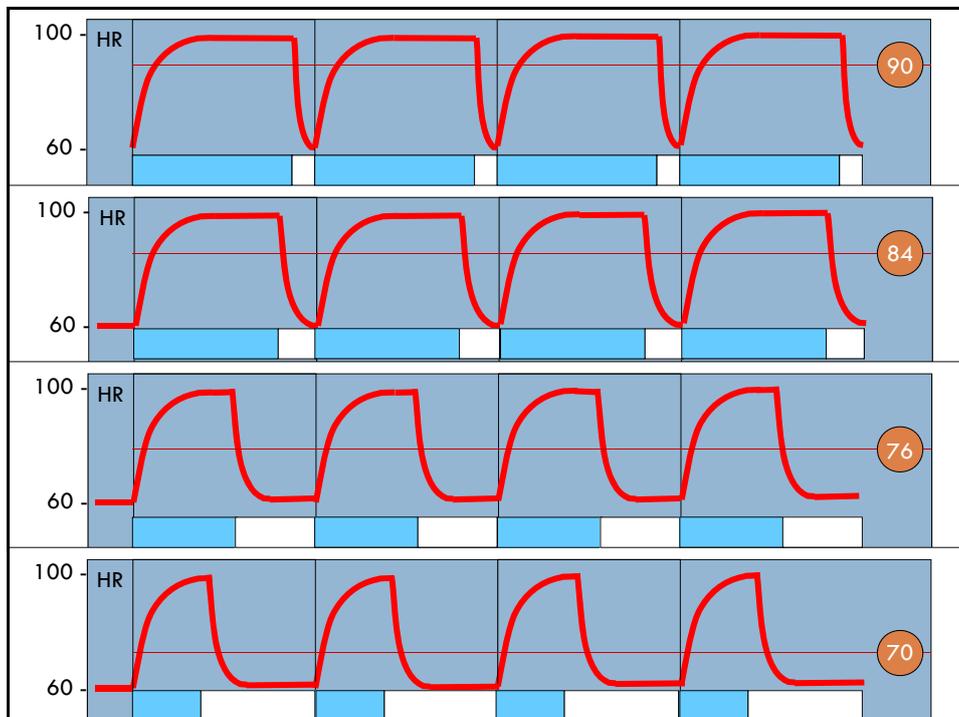


## Aclimatación-Control de la humedad y la iluminación

39



- El proceso de aclimatación consiste en colocar las plántulas procedentes del cultivo *in vitro* en un invernadero, al principio con una humedad relativa elevada que se va reduciendo de forma progresiva.
- Duración aclimatación: 10-20 días. Depende:
  - la especie,
  - el grado de preparación de la planta *in vitro*.
- El control de la humedad se realiza mediante la aportación periódica de agua nebulizada.
  - Fog system
  - Túnel de humedad pulsante. Este sistema consiste en la utilización combinada de:
    - Agua nebulizada (fog) para elevar rápidamente la humedad
    - Un sistema de extractores muy potentes para eliminar la humedad introduciendo aire seco en el túnel



## Túnel pulsante vs clásico

41

### □ Ventajas

- Disminución de la temperatura del túnel
- Mejor control de algas y hongos
- Proceso de aclimatación más corto

Túnel pulsante



Túnel clásico



### Ensayo de aclimatación de *Nephrolepis* sp.

Aspecto general de las plántulas: 20 días de aclimatación.

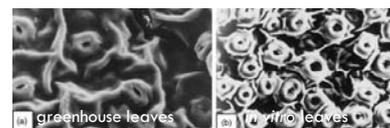
Túnel clásico: es frecuente el crecimiento de algas sobre la turba mientras que en el túnel pulsante las renovaciones de aire lo impiden.



## Etapa 4: Aclimatación

42

- Balance hídrico
  - Cutícula poco desarrollada
  - Función estomática
  - Ausencia de raíces
- Fotosíntesis
  - Sacarosa
  - Luz
  - Intercambio gaseoso (CO<sub>2</sub>)
  - Clorofilas
- Crecimiento radicular y función
- Patógenos latentes
- Biotización



epicuticular wax cover



stomata

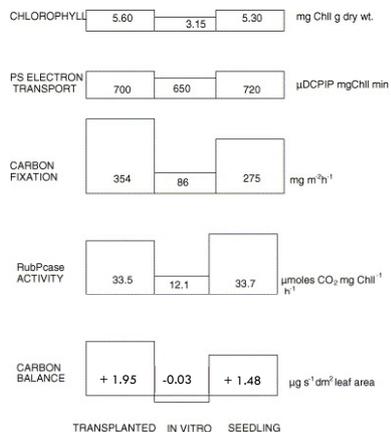
Estomas redondeados, no responden a ABA

Hazarika, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. Scientia Horticulturae 108 (2006): 105-120



## Aclimatación-Fotosíntesis

43



### *Brassica oleracea* (coliflor)

Comparación de distintos parámetros fotosintéticos en:

Plántulas

Meristemos cultivados *in vitro*

Plantas aclimatadas (1 mes después de la aclimatación; hojas nuevas)

Hazarika, B.N. **Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants.** Scientia Horticulturae 108 (2006): 105-120



## Aclimatación-Fotosíntesis

44

Plántulas de tomate cultivadas bajo condiciones de fotoautotrofia



Elevado PFFD  
Elevado  $\text{CO}_2$   
Elevada ventilación  
Uso de explantos foliares

Plántulas de tomate cultivadas bajo condiciones de fotomixoautotrofia



Bajo PFFD  
Bajo  $\text{CO}_2$   
Baja ventilación  
Uso de explantos no foliares

PFFD, densidad de flujo fotónico fotosintético

Photoautotrophic micropropagation: Importance of controlled environment in plant tissue culture. Kubota 2001



## Aclimatación-Fotosíntesis

45



2% CO<sub>2</sub>



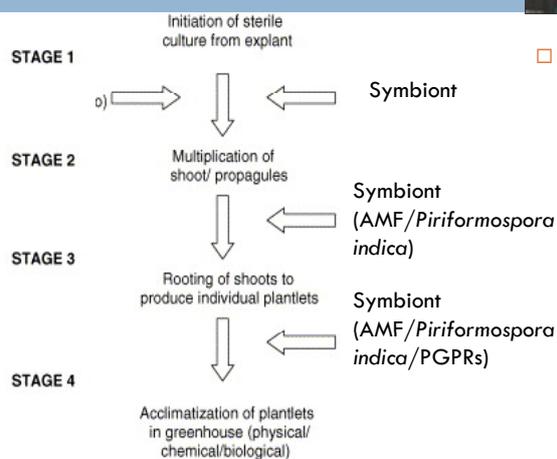
Plantas tratadas con CO<sub>2</sub>

Control



## Aclimatación-Biotización

46



- Los microorganismos pueden estimular el crecimiento mediante:
  - la alteración de los niveles de hormonas
  - secretando sustancias promotoras del crecimiento
  - facilitando la toma de nutrientes
- Micorrizas, facilitan la absorción de P

Steps in biological hardening of in vitro cultured plants (Sahay and Verma, 2000).

Hazarika, B.N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Scientia Horticulturae 108 (2006): 105-120



## Aclimatación-Biotización

47



Control

*P. indica* treated

*Bacopa monnieri* seedlings showing better growth in medium co-inoculated with *P. indica* (right flask)

Varma et al., 2012, Agric Res 1:117-131

## Biotización de plantas *in vitro*

48

- Producción sostenible -uso de inóculos microbianos: reemplazar fertilizantes químicos y pesticidas
  - ▣ Europa: producción 200 millones de unidades/año
  - ▣ Aclimatación: crecimiento en un sustrato sin microorganismos
- Bacterias (PGPRs) y micorrizas: bio-reguladores, biofertilizantes y bioprotectores
- Micorrizas arbusculares:
  - ▣ Toma de agua y nutrientes: mejora de la producción
  - ▣ Reducción de estrés (déficit hídrico, nutricional, metales pesados)
  - ▣ *Glomus* sp: *G. moseeae*, *G. fasciculatum*, *G. etunicatum* y *G. tenue*,
- Problemas asociados con la simbiosis *in vitro*:
  - ▣ Contaminación del inóculo (esterilización y germinación de esporas en agar)
  - ▣ Comportamiento *in vitro* del huésped
  - ▣ Especificidad huésped-endófito



## 4. Micropropagación vegetal-Ventajas

49

- Rápida multiplicación a partir de un único explanto
- Multiplicación en condiciones controladas de laboratorio
- Producción continua
- Potencial para la obtención de propágulos sanos
- Barato una vez establecido el protocolo
- Programa de producción preciso:
  - ▣ Reproducibilidad en la producción
  - ▣ Trazabilidad
- Reduce el espacio de almacenamiento del stock
- Conservación de germoplasma
- Producción de especies difíciles de propagar



Cultivo *in vitro* de  
*Aloe arborensens*



Plantas de arándano



## 4. Micropropagación vegetal-Desventajas

50

- Requiere una infraestructura mínima (equipamiento especializado)
- Personal especializado
- Protocolos no optimizados para todas las especies
- Las plantas producidas pueden no cumplir los estándares industriales
  - ▣ Hiperhidricidad (vitrificación)
  - ▣ Proliferación tisular
- Proceso de establecimiento puede ser caro

