



Micropropagación

Apellidos,
nombre

Gisbert Doménech, Carmina (cgisbert@btc.upv.es)

Picó Sirvent, María Belén (mpicosi@btc.upv.es)

Departamento de Biotecnología

Universitat Politècnica de València

1 Resumen de las ideas clave

En este artículo vamos a presentar en qué consiste la **micropropagación** y sus ventajas respecto a la propagación vegetativa estándar.

La micropropagación es una de las aplicaciones del cultivo *in vitro* de plantas, con la que se pretende la obtención de **clones**, es decir de plantas genotípicamente idénticas a la planta de partida. Esta técnica suele utilizarse con fines comerciales para obtener una producción masiva más rentable que la obtenida con los métodos de multiplicación tradicional. Utilizando esta técnica se suele acortar el tiempo de **multiplicación**, incrementar el rendimiento, almacenar mayor cantidad de plantas en espacios reducidos y controlar mejor el estado sanitario y la distribución de materiales. A escala comercial se utiliza comúnmente para la propagación de plantas ornamentales, como por ejemplo las orquídeas o el clavel, y también se ha extendido su uso para la propagación de portainjertos de árboles frutales, como por ejemplo pies para el injerto de melocotoneros.

La micropropagación de plantas requiere de condiciones de **asepsia** y del desarrollo de protocolos adecuados que permitan el establecimiento del cultivo, la multiplicación del material y su posterior aclimatación. Puede realizarse utilizando las yemas de la planta de partida o induciendo la regeneración adventicia. Pueden utilizarse como material de partida distintos tipos de explantes.

Cualquier protocolo de micropropagación incluye la selección y análisis de la planta madre; el establecimiento del cultivo *in vitro* y el desarrollo de un protocolo para su multiplicación, enraizamiento y aclimatación. Los aspectos básicos de cada una de estas fases se expondrán en el apartado de desarrollo.

2 Introducción

El cultivo *in vitro* abarca un conjunto de técnicas que permiten el cultivo de plantas, explantes (partes de la planta), células y protoplastos en un medio de cultivo adecuado para su crecimiento y en condiciones asépticas. De todas las técnicas que abarca, una de las más importantes a nivel económico es la **micropropagación**, que consiste en la obtención de clones a partir de una planta original.

En un proceso de micropropagación se requiere partir de material sano, llevar a cabo su cultivo *in vitro* y desarrollar una metodología que permita la obtención de clones en el menor tiempo posible. Con este fin pueden utilizarse las yemas de la planta inicial cultivada *in vitro* o explotar lo que se ha denominado la **totipotencia celular**, es decir la capacidad de las células vegetales para, bajo condiciones determinadas, poder desdiferenciarse y reorganizarse de nuevo para formar una planta. Este proceso puede llevarse a cabo siguiendo dos rutas alternativas: **la vía organogénica y la vía embriogénica** (Figura 1) (Gisbert, 2013).

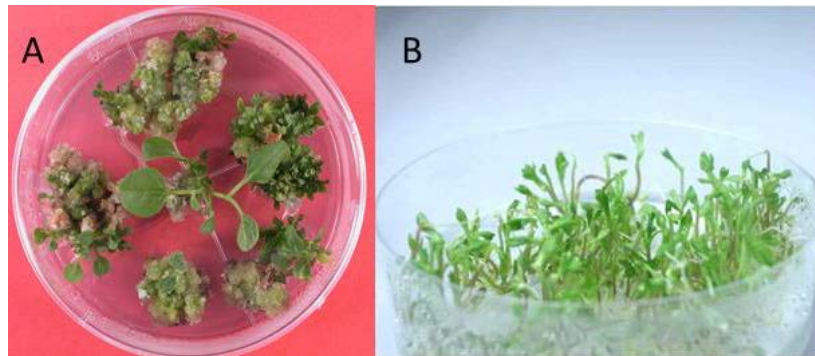


Figura 1. Regeneración de plantas de berenjena a partir de explantes de hoja: vía organogénica (A); Embriones somáticos obtenidos a partir de raíces de zanahoria: vía embriogénica (B).

La adición de **reguladores de crecimiento** a los medios de cultivo *in vitro*, en las combinaciones y concentraciones adecuadas, es determinante para inducir la regeneración de brotes o embriones a partir de los explantes cultivados (Gisbert et al. 2006; Trujillo Molla y Gisbert, 2012; Trujillo-Molla et al. 2014; Peiró et al. 2015). Los reguladores utilizados comúnmente son las auxinas y las citoquininas que se muestran en la Figura 2. Encontrar un balance adecuado de este tipo de reguladores es clave para obtener una buena respuesta. Otro factor que va a influir enormemente en la capacidad de regeneración es el **genotipo** de la planta. El control de la capacidad de regeneración suele ser multigénico y los alelos que contenga un genotipo determinado para los genes involucrados van a determinar su capacidad de responder a los estímulos organogénicos o embriogénicos (Trujillo-Molla et al. 2011).

Teniendo en cuenta que en un recipiente de cultivo se pueden cultivar muchos explantes y, que de cada explante se obtendrán numerosos brotes o embriones somáticos (si se dispone de unas condiciones adecuadas), la tasa de multiplicación que se consigue con este tipo de propagación se incrementa enormemente, sobre todo si se compara con una micropropagación que utilice las yemas ya formadas de la planta inicial o con la propagación vegetativa convencional. Ahora bien, para poder llevar a cabo esta técnica se requiere de instalaciones, conocimientos y protocolos adecuados que permitan realizar con éxito las distintas fases de este proceso.

Tipo auxina

- Ácido 3 indolacético (IAA)
- Ácido 1-naftalenacético (NAA)
- Ácido 3-indolbutírico (IBA)
- Ácido 2,4-di-clorofenoxiacético (24-D)

Tipo citoquinina

- Zeatina (Z)
- 6-Bencil aminopurina (BA)
- Isopentil adenina (iP)
- Kinetina (K)
- Tidiazuron (TDZ)

Figura 2. Reguladores de crecimiento de tipo auxina y citoquinina frecuentemente utilizados en programas de micropropagación.

3 Objetivos

Una vez que el alumno se lea con detenimiento este documento, será capaz de:

- Formular en qué consiste la micropropagación y saber para que se utiliza.
- Describir y explicar los diferentes factores que influyen en la tasa de multiplicación
- Explicar las distintas fases de la micropropagación y la importancia relativa de cada una.
- Conocer la metodología básica para poder aplicar esta técnica.

4 Desarrollo

La micropropagación consiste en la obtención de clones utilizando metodologías de cultivo *in vitro*. **¿Por qué se utiliza una metodología de micropropagación si se puede realizar la propagación *in vivo*?** La micropropagación *in vitro* presenta una serie de ventajas frente a la propagación vegetativa tradicional destacando que: se puede obtener una mayor tasa de multiplicación para un mismo periodo de tiempo, permite el cultivo de gran cantidad de plantas en un espacio reducido y el control del estado sanitario de los clones y, facilita una mejor planificación y distribución de los materiales propagados. Ahora bien, este tipo de propagación requiere de instalaciones adecuadas, mano de obra cualificada para llevar a cabo estos procesos y del desarrollo de protocolos de micropropagación que proporcionen las ventajas anteriormente mencionadas.

Un protocolo de micropropagación incluye diferentes fases:

1. La selección y análisis del material de partida

Los genotipos a multiplicar muestran generalmente unas características visuales diferenciales. Por ejemplo, una planta ornamental con tamaño/forma de las hojas distinto al comúnmente encontrado en el mercado, o genotipos que muestran resistencias o tolerancias de interés, como un portainjerto de frutales que crezca muy bien en suelos básicos o ácidos y/o que tolere el estrés hídrico.

Antes de iniciar el protocolo de micropropagación, estas plantas seleccionadas se analizan para determinar su estado sanitario y descartar que sean portadoras de virosis u otras enfermedades que afecten al cultivo. Si este fuera el caso, se procede al saneamiento del material, que dependerá del tipo de material de partida y del patógeno. Una metodología comúnmente empleada para la obtención de plantas libres de virus es el cultivo de meristemos, combinado en algunos casos con tratamientos térmicos de la planta original.

2. Establecimiento del cultivo *in vitro*

Para el establecimiento del cultivo de una planta sana, procedente de un cultivo de campo o de invernadero, se desinfectarán las yemas de la planta de partida



antes de su introducción en recipientes con medios de cultivo que permitirán su desarrollo. El proceso detallado del establecimiento del cultivo a partir de semillas o material de campo se puede visualizar en el siguiente vídeo: <http://hdl.handle.net/10251/9798>. Si la desinfección no se ha realizado correctamente, en el medio de cultivo aparecerán a los pocos días hongos y/o bacterias que nos indicarán la necesidad de modificar las condiciones de desinfección.

3. Multiplicación

A partir de la planta cultivada *in vitro* se pueden obtener yemas, que cultivadas en el medio de cultivo nos generarán nuevas plantas. Si al medio de cultivo se le añaden citoquininas, se generarán nuevos brotes que aumentarán la tasa de multiplicación.

También se puede optar por utilizar protocolos de regeneración adventicia utilizando distintos tipos de explantes en los que se formarán brotes, o inducirán embriones somáticos (según la vía de regeneración), si las condiciones de cultivo son adecuadas para la inducción de estos procesos. La metodología de multiplicación para cada genotipo dependerá de los protocolos que se hayan desarrollado para el mismo. El desarrollo de estos protocolos es un proceso empírico, pues no todos los genotipos responden de igual modo en un mismo medio de cultivo.

Cuando se opta por protocolos de regeneración adventicia, en numerosos casos se produce formación de callos previa regeneración de las plantas (Figura 1A), incrementando la probabilidad de regenerar algún variante somaclonal. La variación somaclonal es aquella que se produce como consecuencia de un proceso de cultivo *in vitro* (ver Miguel y Marum, 2011) y aunque, en la mayoría de los procesos la aparición de variantes es poco frecuente, es conveniente comprobar la similitud de los clones obtenidos con la planta inicial. Este tipo de comprobaciones suele realizarse utilizando la citometría de flujo, para determinar que no ha habido cambios en el número de cromosomas, aunque también cada vez más se emplean marcadores moleculares que nos permiten detectar posibles cambios en el ADN.

4. Enraizamiento y aclimatación

En algunos protocolos se obtiene plantas ya enraizadas durante la fase de multiplicación. Sin embargo, en numerosas ocasiones la formación de raíces requiere de la transferencia de las plantas a un medio de cultivo distinto que contenga reguladores de crecimiento, de tipo auxina, que induzcan la formación de las raíces. También, en algunos casos las plantas no enraizadas de la fase multiplicativa pueden enraizarse durante el proceso de aclimatación en túneles de enraizado, en los que se utilizan auxinas en la solución de riego.

Las plantas enraizadas necesitan de un proceso de aclimatación que es clave para concluir con éxito el proceso de propagación. La transferencia directa de una planta cultivada *in vitro* a las condiciones de crecimiento *in vivo* supondría la muerte de la planta, pues las plantas cultivadas *in vitro* se mantienen en condiciones muy controladas de humedad y temperatura y se les proporciona todos los requerimientos nutricionales. La fase de aclimatación consiste en el cambio de condiciones ambientales y nutricionales de manera paulatina, para que la planta vaya aumentando su capacidad fotosintética, ejerza la regulación

estomática y se vaya fortaleciendo. Tras este proceso, se podrá cultivar la planta en condiciones estándar de campo o invernadero.

En la siguiente figura (Figura 3) se resumen las diferentes etapas de la micropropagación:

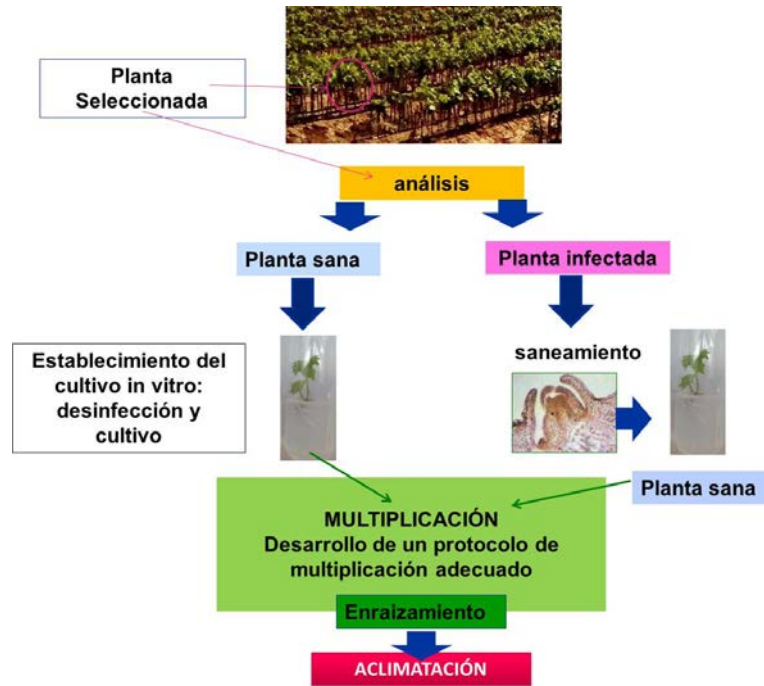


Figura 3. Fases de un proceso de micropropagación

5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto en qué consiste la micropropagación y sus diferentes fases. Se plantean ahora distintas preguntas con el fin de que el alumno pueda comprobar si ha adquirido los conocimientos que se pretendían con este artículo.

¿En qué consiste la micropropagación?

¿Para qué se utiliza?

¿Qué ventajas tiene la micropropagación respecto a la propagación vegetativa tradicional?

¿Por qué se analizan los materiales de partida?

¿Cómo se multiplican los genotipos seleccionados?

¿Qué factores van a influir en la regeneración?

¿En qué consiste la aclimatación?

¿Por qué es importante el proceso de aclimatación?

6 Bibliografía

- Arditti J (2008) Micropropagation of orchids. Blackwell Publishing, Oxford UK.
- Gisbert C, Prohens J, Nuez F. (2006). Efficient regeneration in two potential new crops for subtropical climates, the scarlet (*Solanum aethiopicum*) and gboma (*S. macrocarpon*) eggplants. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 34: 55-62
- Gisbert, C. (2011). Establecimiento de cultivos *in vitro* a partir de semillas o de material de campo. Polimedia ETSIAMN. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/9798>
- Gisbert Doménech, Maria Carmen, (2013). Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica. Colección Artículos Docentes ETSIAMN. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/11526>
- Kyte L, Kleyn J, Scoggins H and Bridgen M (2013) Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation (Fourth Edition), Timber Press, Portland, OR.
- Miguel C, Marum L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*. 62: 3713-3725 doi: 10.1093/jxb/err155.
- Trujillo-Moya C, Peiró R, Gisbert C. (2014). Leaf morphology and shoot regeneration of *in vitro* cultured explants from species of the *S. peruvianum* L. *sensu lato* complex. *Turkish Journal of Botany* 38: 465-476 DOI 10.3906/bot-1305-16
- San Pedro T., Peiró R., Medina A., Yuste A., Olmos A., Gisbert C. 2014. Desarrollo de un protocolo de embriogénesis somática para el saneamiento de las variedades de vid infectadas con GLRaV-3 y GfKV. *Acta Horticultura* 69:133-134
- Trujillo-Moya C, Gisbert C. 2012. The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 111:41-48. DOI: 10.1007/s11240-012-0168-z.
- Trujillo-Moya C, Gisbert C, Vilanova S, Nuez F. 2011. Localization of QTLs for *in vitro* plant regeneration in tomato. *BMC Plant Biology* 11:140.