

CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS: HERRAMIENTA FUNDAMENTAL PARA LA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA

Juan Segura

Catedrático (jubilado) de Fisiología Vegetal, Universitat de Valencia

Antonio Ballester

Profesor de Investigación (jubilado) Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC

Araceli Barceló

Investigadora Coordinadora, Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera

RESUMEN

La historia del cultivo *in vitro* es un recorrido fascinante asociado a la evolución de la agricultura y la biotecnología. Desde sus inicios, a finales del siglo XIX, hasta la actualidad, esta tecnología ha revolucionado la forma en que se cultivan las plantas y ha permitido no solo la propagación y conservación de especies difíciles de reproducir por los métodos tradicionales, sino también por ser una herramienta fundamental para la investigación básica y aplicada.

En España, los profesionales de esta tecnología, en Universidades, Organismos Públicos de Investigación (OPIs) y Empresas, se reúnen en la Sociedad Española de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (SECIVTV), que abarca actividades relacionadas con estudios básicos de cultivo *in vitro* y su aplicación en la agricultura y la conservación del medio ambiente. La SECIVTV desempeña un papel fundamental en el avance del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en España, fomentando la colaboración y el intercambio de conocimientos entre expertos en este campo.

1. FUNDAMENTOS DEL CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS

El cultivo *in vitro* lleva consigo el aislamiento de los explantos (células, tejidos u órganos que se pretende cultivar) de la planta madre y su desarrollo, bajo condiciones asépticas, en medios de cultivo definidos. La regeneración de plantas *in vitro* (micropropagación), puede conseguirse mediante tres métodos: 1) Multiplicación a partir de meristemos preexistentes; 2) Regeneración de brotes adventicios; y 3) Diferenciación de embriones somáticos (Figura 1).

En la micropropagación a partir de meristemos preexistentes, los explantos utilizados son, principalmente, los ápices caulinares y los nudos con yemas axilares. Normalmente, estos explantos se cultivan en un medio nutritivo suplementado con citoquininas. Estas hormonas favorecen el desarrollo de los primordios de yemas axilares presentes en ambos tipos de explanto y permiten la obtención de múltiples brotes. Una variante de este método consiste en el cultivo del meristemo apical del tallo. Este procedimiento es de gran utilidad para el saneamiento de plantas infectadas con virus.

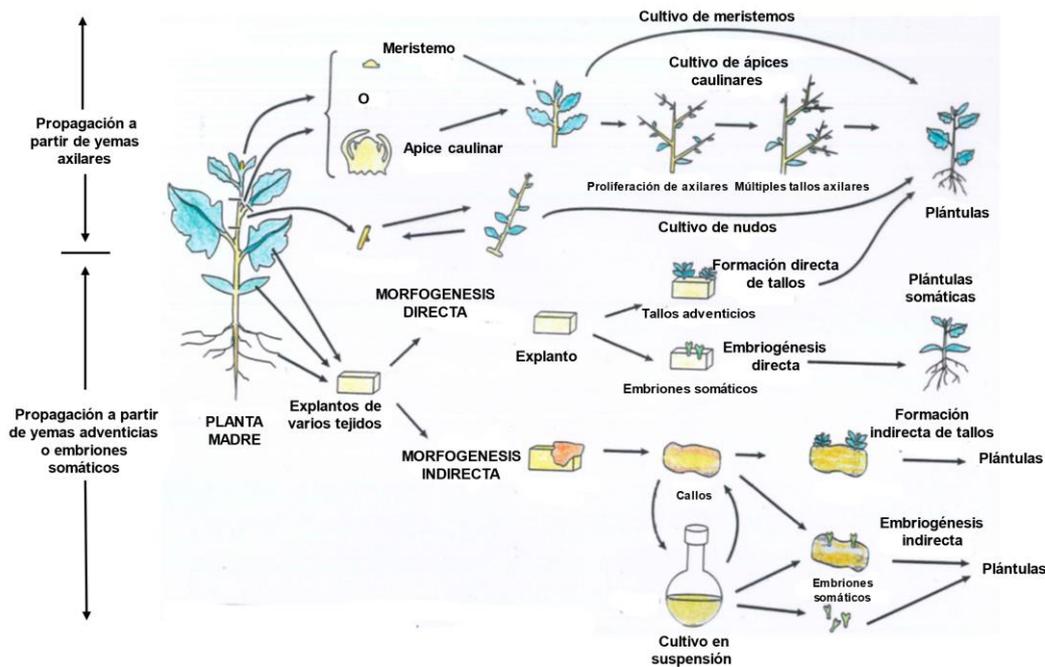


Figura 1. Métodos principales de propagación vegetativa in vitro o micropropagación (la denominación hace referencia al pequeño tamaño de los explantos). Adaptado de: George (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture*, 2nd Edition. Exegetics Limited, England

La micropropagación mediante producción de brotes adventicios o embriones somáticos requiere la neoformación de estas estructuras a través de organogénesis o embriogénesis somática respectivamente. La organogénesis conduce a la diferenciación de estructuras monopolares (meristemos adventicios) que, al desarrollarse, originan los brotes adventicios. En contraste con los meristemos adventicios, los embriones somáticos son estructuras bipolares (poseen los meristemos apicales de tallo y raíz). Por lo tanto, al desarrollarse, originarán una planta completa. Históricamente, las bases científicas que propiciaron el desarrollo de la micropropagación se establecieron en la década de los años 50 del siglo XX. Los trabajos, ya clásicos, de Skoog y Miller (1957) sobre la diferenciación de brotes y raíces en cultivos de médula de tabaco, y los de Steward y col (1958) y Reinert (1959) sobre la formación de embriones a partir de células somáticas de zanahoria, fueron el punto de partida para establecer los protocolos que permiten la regeneración *in vitro* de plantas mediante organogénesis o embriogénesis somática.

La regeneración de meristemos adventicios o de embriones somáticos puede seguir una ruta de morfogénesis directa, en la que las estructuras organizadas se originan directamente del explanto, en ausencia de proliferación de callo (masa celular sin diferenciación aparente), o una ruta de morfogénesis indirecta, en la que formación de callo es previa a la regeneración de estructuras organizadas.

El que los explantos formen tallos adventicios o embriones somáticos depende de un gran número de factores, entre los que cabe citar el genotipo, la edad de la planta y, especialmente, la composición hormonal del medio de cultivo. En general, la diferenciación de tallos adventicios es promovida por un balance auxina/citoquinina favorable a la segunda hormona. Con muy pocas excepciones, la inducción de embriogénesis somática requiere únicamente la presencia de auxina en el medio de cultivo.

Los dos primeros métodos de micropropagación conducen a la regeneración de plantas a través de tallos unipolares, que deben ser enraizados antes de proceder a su trasplante al suelo. En contraste, los embriones somáticos originan directamente plantas completas.

Las plantas desarrolladas a partir de explantos meristemáticos presentan, en general, una mayor estabilidad genética que las regeneradas mediante organogénesis adventicia o embriogénesis somática, especialmente cuando la ruta de desarrollo seguida es la indirecta. La variabilidad fenotípica de las plantas regeneradas a partir de callo, denominada variación somaclonal, es un grave inconveniente cuando se pretende la propagación clonal de genotipos seleccionados. No obstante, la variación somaclonal es de gran utilidad en los programas de mejora genética ya que puede permitir la selección de variedades con características de interés agrícola, ornamental, etc.

La micropropagación se ha convertido en la alternativa más importante a la mayoría de los métodos convencionales de propagación vegetativa de las plantas (estaquillado, por ejemplo), existiendo una gran industria basada en esta tecnología. Además, es de gran utilidad para la multiplicación de especies en peligro de extinción o para la clonación de genotipos de élite (variedades con características de gran interés agronómico, forestal u ornamental). Aunque teóricamente la tecnología del cultivo *in vitro* no es un prerrequisito para la obtención de plantas transgénicas, el éxito en la transformación genética de la mayoría de las especies vegetales es dependiente de la existencia de sistemas eficaces de regeneración *in vitro* de plantas.

La tecnología del cultivo *in vitro* presenta un valor añadido ya que también puede ser utilizada para obtener plantas haploides (mediante el cultivo de anteras, microsporas aisladas u óvulos) o híbridos somáticos (mediante fusión de protoplastos y posterior regeneración de plantas a partir de las células híbridas).

2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS EN COMPARACIÓN CON OTROS MÉTODOS DE PROPAGACIÓN VEGETAL

Ventajas

- a) *Rapidez*: El cultivo *in vitro* permite la propagación rápida de plantas. Se pueden obtener miles de plantas genéticamente idénticas en poco tiempo.
- b) *Sanidad*: Las plantas cultivadas *in vitro* son libres de enfermedades. La desinfección y las condiciones asépticas garantizan su salud.
- c) *Uniformidad*: Las plantas generadas son genéticamente uniformes, lo que es beneficioso para la producción comercial.
- d) *Conservación de especies*: El cultivo *in vitro* ayuda a conservar especies amenazadas o raras.
- e) *Obtención de plantas transgénicas*: Facilita la introducción de genes exógenos para obtener características específicas.
- f) *Obtención de plantas editadas genéticamente (CRISPR)*: La edición de genes permite la realización de cambios genéticos de forma precisa para obtener características deseables.

Desventajas

- a) *Costos*: El cultivo *in vitro* puede ser costoso debido a los medios de cultivo, instalaciones y personal especializado.
- b) *Contaminación*: Mantener un ambiente estéril es difícil y la contaminación puede afectar el crecimiento.
- c) *Dificultad en la regeneración de plantas completas*: A veces, lograr la regeneración *in vitro* de plantas completas a partir de células o tejidos es complicado.
- d) *Variabilidad genética no deseada*: Puede haber cambios genéticos no deseados con el tiempo.
- e) *Adaptación al mundo exterior*: Las plantas cultivadas *in vitro* deben aclimatarse cuidadosamente al entorno exterior.

3. DESAFÍOS TÉCNICOS DEL CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS

- a) *Contaminación*: Mantener un ambiente estéril es crucial en el cultivo *in vitro*. La contaminación por bacterias, hongos o virus puede afectar negativamente el crecimiento de las células y tejidos vegetales.
- b) *Selección de Medios de Cultivo*: Elegir los medios de cultivo adecuados es esencial. Los nutrientes y reguladores del crecimiento deben estar equilibrados para promover el desarrollo óptimo de las células y tejidos.
- c) *Regeneración de Plantas Completas*: A partir de células o tejidos, el objetivo es regenerar plantas completas. Sin embargo, este proceso puede ser complicado y requiere una combinación precisa de factores de crecimiento y condiciones ambientales.
- d) *Variabilidad Genética*: El cultivo *in vitro* puede generar variabilidad genética no deseada. La selección de células o tejidos homogéneos y la aplicación de técnicas de micropropagación son esenciales para mantener la uniformidad genética.
- e) *Estabilidad Genética*: Las células y tejidos cultivados *in vitro* pueden experimentar cambios genéticos con el tiempo. Es fundamental monitorear la estabilidad genética y evitar mutaciones no deseadas.
- f) *Embriogénesis somática y Organogénesis*: Inducir la diferenciación de células en embriones somáticos y órganos específicos (como yemas y raíces) es, muchas veces, un gran desafío. La manipulación de hormonas y factores de crecimiento, así como la selección del explanto más adecuado es crucial para lograr el éxito.
- g) *Costos y Escalabilidad*: El cultivo *in vitro* puede ser costoso debido a los requerimientos de instalaciones, medios de cultivo y personal especializado. Escalar la producción a gran escala es un desafío adicional.
- h) *Adaptación a Condiciones Externas*: Las plantas cultivadas *in vitro* deben adaptarse a las condiciones del mundo exterior una vez que se trasplantan. Esta transición puede ser delicada y requiere aclimatación cuidadosa.

4. PRINCIPALES APLICACIONES PRÁCTICAS DE LA TECNOLOGÍA DEL CULTIVO *IN VITRO*

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales es una herramienta poderosa que transforma la industria agrícola al mejorar la propagación de plantas, su sanidad y su adaptación a las necesidades actuales. Se destacan las siguientes aplicaciones:

- a) *Propagación masiva*: El cultivo *in vitro* permite producir un gran número de plantas a partir de una sola planta madre. Mediante la técnica de micropropagación, se pueden obtener miles e incluso millones de plantas genéticamente idénticas en poco tiempo. Esto es útil para propagar especies raras, amenazadas o de alto valor económico.
- b) *Eliminación de enfermedades*: El cultivo *in vitro* produce plantas libres de enfermedades. Las plantas madre seleccionadas se desinfectan y se cultivan en condiciones asépticas, evitando la presencia de patógenos. Además, se someten a rigurosos controles sanitarios.
- c) *Producción acelerada*: El cultivo *in vitro* promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas. Optimizando las condiciones de cultivo, como la composición del medio y la iluminación, se obtienen plantas jóvenes más rápido que con métodos tradicionales.
- d) *Obtención de plantas transgénicas*: Facilita la introducción de genes exógenos en las plantas, permitiendo obtener plantas transgénicas con características deseables, como resistencia a enfermedades o mayor contenido de nutrientes.
- e) *Obtención de plantas editadas genéticamente (CRISPR)*: El cultivo *in vitro* es la herramienta que permite la obtención de una planta completa a partir de una célula inicial editada.
- f) *Conservación de germoplasma*: Es eficaz para conservar muestras de tejido vegetal en nitrógeno líquido, manteniendo la diversidad genética y evitando la pérdida de especies.
- g) *Producción de metabolitos secundarios*, de interés farmacéutico, cosmético o alimentario.

5. ORIGEN Y DESARROLLO DE LA SECIVTV

El origen y desarrollo de la SECIVTV en España están muy poco relacionados con los de la mayoría de las sociedades científicas que podríamos considerar “clásicas”. La SECIVTV es una Sociedad muy joven y, entre sus miembros, hay destacados representantes del sector productivo, lo que explica la estrecha conexión entre la investigación y el desarrollo desde la fundación de la SECIVTV.

Una razón fundamental de la juventud de la SECIVTV radica en que el principio científico básico que propició la investigación en el campo del cultivo *in vitro* de plantas se postuló a finales del siglo XIX, en 1898. En esa fecha, el investigador austro-alemán Gottlieb Haberlandt publicó el concepto de la totipotencia en plantas: cualquier célula vegetal contiene todo el material genético de la planta y, por tanto, el potencial para regenerar una nueva planta completa genéticamente igual a la progenitora, siempre y cuando las células se cultiven en un medio adecuado. El propio Haberlandt intentó poner en práctica su teoría, pero fracasó debido a que las condiciones de asepsia del momento y los medios de cultivo utilizados no estaban a un nivel de desarrollo adecuados. No obstante, Haberlandt es considerado el padre fundador de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Vasil, 2008).

Durante el período 1930-1931 el investigador americano Philip Rodney White estuvo trabajando con Haberlandt en Berlín y llegó al convencimiento de la utilidad del cultivo de tejidos para el estudio de las plantas. No sería hasta el año 1934 cuando la teoría de la totipotencia da unos pasos definitivos en su consolidación. White (1934) publica el crecimiento indefinido de ápices de raíz de tomate al cultivarlos en medio líquido y en 1939 confirma sus resultados al publicar el crecimiento de callo de plantas en un medio nutritivo artificial (White 1939). Paralelamente en Francia, el Profesor Roger Gautheret (1939) publica la posibilidad de cultivar, también de forma indefinida, callo de zanahoria. Finalmente, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se consolida de forma definitiva con la publicación de Murashige y Skoog (1962) en donde se describe el primer medio de cultivo químicamente definido. Esta publicación es una de las referencias más citadas internacionalmente dentro de todas las relacionadas en el campo de la biología vegetal. El afán de White por expandir el conocimiento del cultivo *in vitro* y dar a conocer las enormes posibilidades de su uso en el estudio de la biología de plantas, le llevó a organizar la International Association for Plant Tissue Culture (IAPTC) que, con el paso de los años, adquirió la denominación actual de International Association for Plant Biotechnology (IAPB).

A nivel nacional y, de acuerdo con la documentación disponible, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales nace en Santiago de Compostela. Vázquez y Vieitez (1962) publican el primer trabajo sobre el tema, consecuencia de una Tesis Doctoral dirigida por el Prof. Ernesto Vieitez (Catedrático de Fisiología Vegetal de la Universidad de Santiago) y amigo personal del Prof. Gautheret, quien le sugirió el uso del cultivo *in vitro* para el estudio de la fisiología de plantas. Pero el verdadero impulso de la especialidad surgió en España en la década de los años 1970. El grupo del CSIC de Santiago, dirigido por la Dra. Ana M. Vieitez, se consolidó en el estudio de especies forestales y gracias a becas de la Fundación March y del Banco Mundial tres investigadores españoles (Angel Mingo, Luis Navarro y Fernando Pliego Alfaro) trabajaron en la Universidad de California Riverside, bajo la dirección del Prof. Murashige, líder, sin ninguna duda por aquél entonces, del cultivo *in vitro* internacional. A su vuelta, formaron grupos de investigación altamente reconocidos, sobre todo los de Valencia (IVIA) y Málaga (IFAPA). Paralelamente, otros grupos nacionales fueron desarrollándose paulatinamente, aunque la interacción entre ellos era mínima.

En el año 1974 se celebra en Leicester (UK) el tercer congreso de la IAPTC bajo la dirección del Prof. H.E. Street y al que asisten 700 investigadores de 40 países. Entre los asistentes está el Prof. José Luis Guardiola, Catedrático de Fisiología Vegetal de la Universidad Politécnica de Valencia. José Luis contacta con el Prof. Street sobre unas cuestiones profesionales y éste, al final, le propone que sea el representante de la IAPTC en España. José Luis acepta el reto y contacta con alguno de los grupos dispersos que en aquél entonces habían comenzado a trabajar en cultivo *in vitro* en España. Lo único que había que hacer en aquella época era pagar la cuota anual que imponía la IAPTC y, como

contrapartida, ésta enviaba un NewsLetter en el que aparecían noticias relacionadas con la misma, así como algún trabajo de investigación. Esta situación se mantuvo durante muchos años dándose la paradoja de que los grupos españoles eran los únicos que, perteneciendo a la IAPTC, no estaban agrupados a nivel nacional. Incluso, algunos investigadores nos conocimos personalmente en congresos científicos internacionales.

Al objeto de paliar la anomalía en que estaban los investigadores de la especialidad en España, se fue tomando conciencia en la necesidad de un cambio y crear una Sociedad similar a las establecidas ya en otros países y, desde luego, similar al camino seguido por las sociedades científicas españolas de otras especialidades científicas perfectamente asentadas. A principios de los años 1990 algunos investigadores nos pusimos en contacto con el Prof. José Luis Guardiola, representante español ante la IAPTC, no sólo para informarle de nuestras inquietudes sino también para pedirle que fuese él mismo quien pilotase la operación de la génesis de una Sociedad científica en la que poder agruparnos. José Luis declinó amablemente el ofrecimiento y dio todo su apoyo para que la Sociedad fuese una realidad.

El 10 de noviembre de 1992 se celebró, en el Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG, CSIC) en Santiago de Compostela, la reunión fundacional de la SECIVTV a la que asistieron 12 de los científicos invitados y 2 personas interesadas en utilizar el cultivo *in vitro* para producir plantas en los viveros que regentaban. Por consenso entre los reunidos, los doctores Luis Navarro (IVIA, Valencia) y Antonio Ballester (IIAG, Santiago) actuaron como presidente y secretario, respectivamente. El acta fundacional recoge que la nueva Sociedad tendrá por objeto “*promover el desarrollo del cultivo in vitro de células, órganos y tejidos vegetales; promocionará la organización de reuniones científicas y de cualquier otro tipo que sirvan para establecer y mantener un contacto entre todos aquellos que estén interesados en el desarrollo del cultivo in vitro de vegetales y que todos los presentes desarrollan su actividad en campos afines y que es la forma idónea de progresar de forma conjunta y defender intereses comunes; también se hace notar la necesidad de asociarse con sociedades internacionales afines a través de la Internacional Association for Plant Tissue Culture*”. Se decide también que el nombre será Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales, y el acrónimo SECIVTV.

El paso siguiente fue la redacción de unos estatutos que permitiesen legalizar la nueva Sociedad. Lo ideal hubiese sido copiar los estatutos de la IAPTC que se caracterizan por su sencillez y pocos artículos, pero la legislación española parece estar reñida con la simplicidad. Finalmente, *el 1 de diciembre de 1993*, el Ministerio del Interior envió un escrito aprobando los estatutos y legalizando la nueva Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales. Es de destacar el trabajo del primer presidente de la nueva Sociedad, Luis Navarro quien, no sólo gestionó todos los trámites administrativos con el Ministerio de Interior para legalizar la Sociedad, sino también ofreció el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) como domicilio permanente de la nueva Sociedad.

La primera reunión científica tuvo lugar en Valencia en 1995, bajo la organización de Luis Navarro y, desde entonces, la Sociedad se reúne ininterrumpidamente desde entonces cada dos años.

Junta directiva actual de la SECIVTV:

- *Presidenta*: Dra. Araceli Barceló (IFAPA – Málaga)
- *Vicepresidenta*: Dra. Pilar Testillano (CIB – CESIC – Madrid)
- *Secretario*: Dr. Alejandro Atarés (IBMCP – CSIC – Valencia)
- *Tesorero*: Dr. Pablo Aleza (IVIA – Valencia)
- *Vocal 1*: Dr. Manuel Rey (Universidade Vigo – Pontevedra)
- *Vocal 2*: Dra. Ana María Pelacho (Universitat de Lleida – Lleida)
- *Vocal 3*: Dra. Teresa Antón (bayer cropsscience– Almería)

La SECIVTV ha logrado importantes avances en el campo del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en España. Algunos de sus logros más destacados incluyen:

1. *Promoción de Investigación:* La SECIVTV ha fomentado la investigación y el desarrollo en el cultivo *in vitro* de células, órganos y tejidos vegetales. Ha proporcionado un foro para que los científicos compartan conocimientos, presenten investigaciones y colaboren en proyectos relacionados con la biotecnología vegetal.
2. *Organización de Eventos Científicos:* La sociedad ha organizado conferencias, talleres y simposios que reúnen a expertos en cultivo *in vitro*. Estos eventos han permitido la discusión de avances científicos, la presentación de resultados de investigación y la formación de redes de colaboración.
3. *Colaboración Interdisciplinaria:* La SECIVTV ha facilitado la colaboración entre investigadores, técnicos y profesionales de diferentes disciplinas. Esto ha llevado a una mayor comprensión de los desafíos y oportunidades en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.
4. *Aplicación en Agricultura y Conservación:* La sociedad ha promovido la aplicación práctica del cultivo *in vitro* en la agricultura, la conservación de especies vegetales amenazadas y la mejora genética de cultivos. Sus miembros han trabajado en proyectos que benefician tanto al sector agrícola como al medio ambiente.
5. *Intercambio Internacional:* La SECIVTV está afiliada a la International Association for Plant Biotechnology (IAPB), lo que ha facilitado el intercambio de conocimientos a nivel internacional. Sus miembros han participado en conferencias y colaboraciones con científicos de todo el mundo.

6. REFERENCIAS

- Gautheret R. J. (1939): Sur la possibilité de réaliser a culture indefinite des tissus de tubercules de carotte. C. R. Hebd. Seances Acad. Sc. 208: 118–120
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Reinert, J. (1959): Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten. *Planta* 53: 318-333
- Skoog, F., Miller, C.O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131
- Steward, F.C., Mapes, M.O. y Mears, K. (1958): Growth and organized development of cultured plant cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45: 705-709
- Vasil I.K. (2008): History and evolution of the International Association for Plant Biotechnology (IAPB): 1963-2008. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 44: 365-372
- Vázquez, A., Vieitez, E. (1962): Influencia de algunos factores en el crecimiento de embriones de castaño cultivados *in vitro*. *Anal. Edafol. y Agrobiol.* 21: 583-591
- White P. R. (1934): Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9: 585–600
- White P. R. (1939): Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Amer. J. Bot.* 26: 59–64

(Para más información sobre la sociedad, consultar su página web: <http://secivtv.org>)