

4.- CULTIVO *IN VITRO*

4.1. CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES: GENERALIDADES

Debido al incremento de la población mundial, en los últimos años se ha acentuado el interés por la biotecnología vegetal con el propósito de producir alimentos, mejorar cultivares, adaptarlos a diferentes condiciones climáticas y edafológicas y obtener metabolitos de interés comercial (Pérez Ponce, 1998).

En este contexto, el cultivo de tejidos vegetales ha merecido especial atención debido a que comprende un grupo heterogéneo de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos o células en un medio de composición química definida e incubados en condiciones ambientales controladas (Roca & Mroginski, 1991; Pérez Ponce, 1998).

Las razones que determinan que el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales constituya una tecnología interesante para la producción de plantas y productos naturales de interés, son las siguientes: 1) la producción de plantas de sanidad controlada, lo que permite incrementos en los rendimientos, 2) la independencia del clima, suelo, distribución geográfica y problemas socio-políticos, 3) la capacidad de establecer un sistema de producción definido, en relación a las demandas del mercado, 4) el cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de cultivar a campo, 5) la conservación del germoplasma de plantas de interés comercial o en vías de extinción, 6) la posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético, más rápidos que en los cultivos tradicionales, por técnicas biotecnológicas e ingeniería genética, 7) la producción de compuestos químicos conocidos provenientes de plantas de crecimiento lento o difíciles de obtener por extracción o por síntesis química, 8) la síntesis de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos *in vitro*, 9) la obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con síntesis química y 10) la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, a herbicidas o a estrés abiótico, con mejor calidad nutricional, que actúen como biorreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos o que secuestren metales pesados de suelos contaminados, entre otras aplicaciones.

4.1.1. Medios de cultivo

Aunque actualmente se cuenta con una literatura detallada de técnicas de cultivos vegetales *in vitro*, con los protocolos correspondientes a muchas especies vegetales (Dixon, 1985; Vidalie, 1986; Conger, 1987; Bajaj, 1988; Pollard & Walker, 1990; Roca & Mroginski, 1991), existen especies en las cuales el establecimiento, multiplicación y/o

enraizamiento de los cultivos es dificultoso y se requiere una intensa tarea experimental para lograr su micropropagación o para obtener callos o suspensiones capaces de producir los metabolitos deseados.

Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados en forma más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción (Krikorian, 1991).

Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Heller, 1953, 1954; Murashige & Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk & Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento.

La **composición mineral** se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular.

Los requerimientos de nitrógeno son generalmente provistos por una mezcla de nitrato y amonio en concentraciones variables entre 3 y 50 mM. Cuando estas fuentes son suplementadas en forma individual se afectan, generalmente en forma negativa, tanto el crecimiento del cultivo como la producción de metabolitos (Ertola *et al.*, 1994). Pero, dado que el uso de nitrato exige una mayor demanda energética para la asimilación del nitrógeno si se compara con el amonio, algunos explantos crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido (Krikorian, 1991), recomendándose en este caso la adición de un ácido orgánico como el succinato como agente bufferante. En el *ítem 5.2.2.* se presentan ejemplos de la influencia de las concentraciones de nitrato y amonio sobre la producción de metabolitos secundarios.

Muchas células vegetales son sensibles a los niveles de fosfatos en el medio. Precisamente, el mantenimiento de los niveles de fosfato por debajo del óptimo para el crecimiento estimula entre 3 y 4 veces la acumulación de cinamoil-putrescina en cultivos de suspensiones de *Nicotiana tabacum* (Schiel *et al.*, 1984) e incrementa la síntesis de alcaloides en *Catharanthus roseus* (Misawa, 1985). Habitualmente, los fosfatos son almacenados en la vacuola y adquiridos desde allí para el crecimiento, mientras que la

síntesis de metabolitos comienza al agotarse el fosfato vacuolar (Ertola *et al.*, 1994). La concentración necesaria de fosfato indicada en los diferentes medios de cultivo varía entre 0,1 y 1,5 mM.

Generalmente se agrega calcio en mayores concentraciones que en los medios microbianos, variando entre 1 y 3 mM.

El hierro es esencial para el crecimiento celular y se agrega al medio de cultivo en una concentración de 0,01 a 0,15 mM. Se aconseja la utilización del quelato Fe-EDTA que aumenta la solubilidad del hierro.

La naturaleza y concentración de los micronutrientes empleados en los medios de cultivo surgen principalmente de resultados empíricos al evaluar la capacidad de cada elemento de afectar el crecimiento. En general el boro, el manganeso, el yodo y el cinc se utilizan en concentraciones variables entre 1 y 100 mM, mientras que el resto de los micronutrientes se agregan en valores inferiores a 0,1 mM. No hay un estudio sistemático de su influencia en el crecimiento y la productividad, aunque existen varios trabajos puntuales como los referidos a la estimulación de la producción de shikonina al aumentar 30 veces el ión cobre (Fujita *et al.*, 1981), al incremento de la producción de compuestos fenólicos por deficiencia de boro (Ertola *et al.*, 1994) y a la mejor formación y calidad de callos de caña de azúcar al incrementar el calcio y el magnesio (Gomez Kosky, 1998a).

Huang y Murashige (1977) y Dixon (1985) realizaron estudios comparativos de la composición salina de varios medios comerciales de cultivo de tejidos vegetales, destacando que: 1) el medio MS (Murashige & Skoog, 1962) presenta altas concentraciones de nitrato, potasio y amonio; 2) el medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) se caracteriza por una alta concentración de nitrato de potasio; 3) los medios MS y SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) presentan altas concentraciones de sales comparados con el medio de White (1963); 4) los medios MS y SH contienen hierro formando un quelato con EDTA, mientras que en los medios de White (1963) y de Heller (1953) está como sulfato y cloruro férrico, respectivamente.

Si bien las plantas son autótrofas, puede ser necesario añadir al medio de cultivo algunas **vitaminas** hasta que los cultivos prosperen. Las vitaminas favorecedoras del desarrollo de cultivos *in vitro* y que se añaden rutinariamente en la mayoría de los medios de cultivo son: tiamina (B₁), piridoxina (B₆) y ácido nicotínico (Krikorian, 1991). Otras vitaminas que suelen ser útiles son ácido pantoténico, biotina, riboflavina (B₂), colina, cianocobalamina (B₁₂) y ácido fólico. El ácido ascórbico (vitamina C) se considera benéfico en algunos casos, pero probablemente debido más a su capacidad reductora que a su papel como vitamina.

Otro compuesto orgánico que promueve el crecimiento de algunos cultivos es el **mio-inositol**, que está involucrado en la síntesis de fosfolípidos y por lo tanto de sistemas de membranas. En general se utiliza en una concentración 0,5 mM (Conger,1987).

El papel de los **aminoácidos** en la nutrición de los tejidos y células vegetales es complejo, ya que los tejidos responden en forma diversa a su suplemento. En general, si los aminoácidos corresponden a la forma D son inhibidores, mientras que en la forma L tienen acción benéfica (Krikorian, 1991).

Debido a que las células cultivadas *in vitro* son generalmente heterotróficas respecto de la fuente de carbono, se deben agregar **azúcares** al medio de cultivo. Estos actúan como fuente energética y de carbono e incrementan el potencial osmótico del medio. La sacarosa, en concentraciones del 2 al 4 % (p/v), constituye la fuente más utilizada. Otros azúcares capaces de sostener el crecimiento o incrementar la producción de metabolitos son glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y lactosa. Varios investigadores han estudiado la influencia de la fuente de carbono en el crecimiento y la producción, observando que el nivel de azúcar puede influenciar a ambos pero no siempre es previsible su efecto. En general, el incremento de los niveles de sacarosa favorece el crecimiento y la formación de productos, pero valores superiores al 10 % (p/v) pueden producir represión por catabolitos (Ertola *et al.*, 1994).

Aunque la composición del medio de Murashige-Skoog da buenos resultados en el cultivo *in vitro* de la mayoría de las especies, se debe seleccionar una combinación de nutriente en función del conocimiento de la fisiología de la especie, de los resultados experimentales obtenidos, del tipo de cultivo a desarrollar (plántulas, callos, raíces, meristemas, embriones) o del objetivo del trabajo (crecimiento, diferenciación u obtención de metabolitos).

Los reguladores de crecimiento cuyo tratamiento se presenta en el ítem 4.1.2. son componentes exclusivos de los medios de cultivos vegetales.

El **pH** inicial de los medios de cultivo se regula, en general, entre pH 5,5 y 6,0, dado que afecta tanto el crecimiento como la producción.

4.1.2. Reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1 mM.

A medida que se fueron identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo

evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto es riesgoso generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury & Ross, 1994).

Los reguladores del crecimiento que resultan útiles para el establecimiento y crecimiento de los cultivos de tejidos vegetales como así también para la producción de metabolitos se agrupan en varias categorías, de acuerdo a su estructura, tal como se describe en los ítems siguientes.

4.1.2.1. Auxinas

Es una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*. En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies, 1995). Las auxinas más utilizadas son el AIA (ácido indol-3-acético), el ANA (ácido α -naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácido indolbutírico), el pCPA (ácido *p*-clorofenoxiacético) y el BTOA (ácido benzotiazol-2-oxiacético).

En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula (Abel & Theologis, 1996). La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros (Cleland, 1995).

4.1.2.2. Citocininas

Son derivados de la adenina que promueven la división celular. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: BA (bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea

(zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citocininas sintéticas y las dos últimas naturales.

Las citocininas *in vivo* incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas (Salisbury & Ross, 1994).

La eficiencia comparativa de dos citocininas (BA y 2-iP) en igual concentración sobre la propagación *in vitro* de *Paeonia suffruticosa* fue estudiada por Bouza *et al.* (1993). Los explantos cultivados en BA desarrollan nuevas hojas y yemas axilares asegurando una buena multiplicación vegetativa, mientras que el desarrollo de los explantos cultivados en 2-iP fue escaso. Las respuestas anteriores fueron correlacionadas con los niveles endógenos de AIA y ABA (ácidos abscísico), observando que altas concentraciones de BA se asociaron con baja producción de AIA y que el ABA se produce más tardíamente en los explantos tratados con BA que en los cultivados con 2-iP. Estos resultados indican que un mismo tejido reacciona de modo diferente ante el estímulo hormonal, aún cuando se trate de compuestos relacionados.

La inclusión de citocininas en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que regiones meristemáticas multicelulares se diferencien en estructuras organizadas.

La proporción entre auxinas y citocininas permite regular la organogénesis o la desdiferenciación, por lo que se deben programar las concentraciones de auxinas y citocininas a través de diseños factoriales para cada especie y variedad vegetal y según el objetivo del trabajo. En general, cuando la relación auxina/citocinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1 se producen callos (Krikorian, 1995).

Además de las citocininas derivadas de adenina, se han detectado una serie de fenilureas sustituidas que tienen similar actividad y son utilizados como citocininas en algunos protocolos de cultivo de tejidos vegetales (Krikorian, 1995; Christianson & Hornbuckle, 1999). Tales compuestos son el tidiazuron (TDZ), la N,N'-difenilurea (DPU) y la cloropiridilfenilurea (CPPU).

El hecho que no se hayan obtenido mutantes de ninguna especie vegetal que sean auxina- o citocinina-deficientes indica que estos dos reguladores de crecimiento son indispensables para el crecimiento vegetal, lo que llevó a Gray & Estelle (1998) a postular que tales mutantes serían embriogénica y/o gametofíticamente letales.

4.1.2.3. Giberelinas

Las giberelinas (GA_s) constituyen una familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray & Estelle, 1998).

Se han identificado 64 GA_s exclusivos de plantas superiores, 12 GA_s que están presentes sólo en hongos del género *Gibberella* y 13 tipos de GA_s que se aíslan de ambos grupos. Tanto en *Gibberella* como en angiospermas se han aislado varios tipos de GA_s simultáneamente (Sponsel, 1995).

Las GA_s se sintetizan a partir de ácido mevalónico en tallos jóvenes y en semillas en desarrollo. Permiten superar la latencia de semillas y brotes, promueven la floración y retardan la senescencia.

Los variados efectos de las giberelinas sugieren que tienen más de un sitio de acción primario. Así, si sólo se considera la elongación del tallo en plantas completas, ésta es el resultado de al menos tres acontecimientos coadyuvantes: 1) estímulo de la división celular de las células meristemáticas del ápice del tallo, 2) promoción de la hidrólisis de almidón, fructanos y sacarosa originando monosacáridos que proporcionen energía vía respiración, contribuyan a la formación de la pared celular y disminuyan el potencial hídrico de la célula y 3) incremento de la plasticidad de la pared celular, permitiendo la elongación celular (Salisbury & Ross, 1994).

A pesar de la gran cantidad de efectos fisiológicos de las GA_s, su uso en los medios de cultivo no está muy difundido. En algunos casos, como en cultivos de zanahoria, se ha demostrado que el GA₃ afecta más la división que el crecimiento celular (Krikorian, 1995). En cultivos productores de metabolitos secundarios puede afectar la producción tanto en los niveles como en su concentración relativa; tal es el caso de los cultivos de raíces transformadas de *Brugmansia candida*, en los cuales el suplemento de GA₃ reduce la acumulación de alcaloides del tropano y altera significativamente la concentración relativa (Rhodes *et al.*, 1994).

4.1.2.4. Acido Abscísico

El ácido abscísico (ABA) es un regulador de crecimiento cuya tasa de biosíntesis se modifica significativamente frente al estrés fisiológico ocasionado por falta de agua, salinidad del suelo, bajas o altas temperaturas, etc. El ABA provoca respuestas que ayudan a proteger a las plantas contra estos factores, como el cierre de estomas y la producción de proteínas protectoras. También participa en la embriogénesis normal y en la formación de proteínas de almacenamiento en semillas. Estas características pueden utilizarse en cultivo *in vitro* para producir metabolitos de reacción al estrés, para retrasar

el crecimiento y para moderar los efectos de auxinas y citocininas (Salisbury & Ross, 1994).

4.1.2.5. Etileno

El etileno es un compuesto gaseoso reconocido como hormona de maduración de los frutos pero que además regula diversos procesos fisiológicos como la germinación de las semillas, la senescencia de hojas y flores, la abscisión de hojas y frutos y la floración de algunas especies. El modo de acción del etileno no es aún conocido aunque se han detectado cambios en la expresión genética de algunas proteínas (McKeon *et al.*, 1995).

Es producido en cultivos *in vitro* de todo tipo y se acumula en la fase gaseosa de los recipientes de cultivo en concentraciones variables según la clase y peso del tejido, el volumen y la cubierta del recipiente y las condiciones de cultivo. La acumulación de etileno induce la formación y el crecimiento de callos en algunos cultivos *in vitro*, como en tabaco, dalia y tomate, mientras que inhibe o tiene escaso efecto en la dediferenciación de otras especies. En la morfogénesis se han observado efectos variables en diferentes especies, tanto estimulantes como inhibidores o sin efecto en la formación de vástagos y raíces (George, 1987b; Krikorian, 1995).

4.1.2.6. Poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y brasinoesteroides

Los compuestos mencionados en los ítems anteriores son los reguladores de crecimiento corrientemente utilizados en cultivos *in vitro*, especialmente las auxinas y citocininas. Sin embargo, en los últimos años se han descrito otros grupos de compuestos químicos producidos por las plantas, que afectan su crecimiento y desarrollo y cuya acción *in vitro* se ha ensayado, especialmente, en la producción de metabolitos. Entre ellos cabe mencionar a las poliaminas, los jasmonatos, los brasinoesteroides y el ácido salicílico.

Las **poliaminas** (putrescina, espermidina, cadaverina) ejercen controles regulatorios en el crecimiento y desarrollo de las plantas (metabolismo primario), particularmente en la división celular y en la diferenciación. Las plantas con una alteración genética en el contenido de poliaminas presentan alteraciones en el desarrollo y es así que los cultivos de tejidos de zanahoria con bajo nivel de poliaminas producen callos, mientras que cuando la concentración de poliaminas es alta se forman embriodes. Además, las plantas de tabaco con sobreexpresión de espermidina producen anteras en lugar de ovarios (Davies, 1995).

Los **jasmonatos**, que comprenden al ácido jasmónico y a su metil éster, inhiben el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas. Promueven, además, la senescencia, la abscisión y la formación de tubérculos. Otro rol importante de los

jasmonatos es su participación en los mecanismos de defensa de las plantas, donde inducen la síntesis de inhibidores de peptidasas y de otras enzimas involucradas en la defensa (Davies, 1995). Se conoce también que la aplicación exógena de metil jasmonato induce la producción de metabolitos secundarios en varias especies, incluidas algunas del género *Taxus* (Roberts & Shuler, 1997) y *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez *et al.*, 1999).

El **ácido salicílico** es biosintetizado a partir del aminoácido fenilalanina y su rol fisiológico aún no ha sido determinado. La aplicación exógena induce la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis, incrementa la longevidad de las flores, inhibe la síntesis de etileno y la germinación de las semillas y revierte los efectos del ABA (Davies, 1995).

Los **brasinoesteroides** comprenden un conjunto de más de 60 compuestos esteroideos, el primero de los cuales fue aislado del polen de *Brassica napus* L. Promueven la elongación del tallo, inhiben el crecimiento y desarrollo de la raíz e impulsan la biosíntesis de etileno (Davies, 1995).

4.1.2.7. *Mecanismos de acción de los reguladores de crecimiento vegetal*

El desarrollo de las plantas es el resultado de un intrincado control hormonal múltiple (espacial y temporal) a través de la regulación y expresión de varios sistemas de genes. La complejidad de los efectos pleiotrópicos de los reguladores de crecimiento vegetales pueden ser el resultado de una acción primaria simple del fitorregulador o de un efecto sobre la expresión génica. Aunque las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal sean reconocidas como importantes compuestos señal, que están directa o indirectamente involucrados en el control de la actividad génica, la vía de transducción de señales, los sitios de percepción y los receptores son aún poco conocidos. Recientes estudios genético-moleculares con mutantes hormonales, especialmente de *Arabidopsis thaliana*, han demostrado la participación de quinasas y fosfatasa en las vías de transducción de algunos reguladores de crecimiento de plantas (Barendse & Peeters, 1995).

Han sido identificadas algunas proteínas específicas que se unen a los reguladores de crecimiento y que actuarían como receptores. Varias proteínas ligantes de auxinas (ABPs) han sido halladas en diferentes localizaciones celulares tales como el retículo endoplásmico, la membrana plasmática, el núcleo y también como ABPs solubles. Las ABPs del retículo producirían proteínas de la membrana plasmática y de la pared celular; las de la membrana plasmática podrían estar involucradas en la percepción de auxinas; las del núcleo, en la regulación de la expresión génica y las solubles podrían

estar comprometidas en mantener gradientes de concentración (Jones, 1994). En este sentido, Marten *et al.* (1991) encontraron en frijoles una interacción directa de las auxinas con la cara extracelular de los canales aniónicos de la membrana plasmática de las células oclusivas de los estomas.

También hay evidencias de la presencia en la membrana plasmática de proteínas ligantes de GA_s que al interactuar inducen la síntesis de α -amilasa y de ligantes de ABA que regulan el cierre de los estomas (Libbenga & Mennes, 1995). En general, si ABA y GA₃ son percibidas por receptores de la cara externa de la membrana se producen respuestas rápidas de las células, mientras que la percepción citoplasmática produciría efectos tardíos y prolongados (Allen & Trewavas, 1994).

Los reguladores de crecimiento además pueden interactuar directamente con el ADN e influenciar la transcripción (Barendse & Peeters, 1995). Por este mecanismo parecen actuar las proteínas nucleares y citoplasmáticas ligantes de auxinas identificadas en células del tabaco y las proteínas que unen citocininas en hojas de cebada (Libbenga & Mennes, 1995).

4.1.3. Condiciones ambientales de cultivo

Los cultivos de tejidos vegetales deben mantenerse en condiciones ambientales semejantes a las naturales más favorables. La luz, la temperatura y la humedad relativa son los principales factores del ambiente que inciden sobre los cultivos (Vidalie, 1986).

El comportamiento de muchos cultivos depende de la calidad, intensidad y fotoperíodo de la luz que reciben, dado que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario son influenciadas por la luz. La mayoría de los cultivos desarrollan a una intensidad luminosa entre 5 a 25 W/m² (1000 a 5000 lux). Si bien la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfogénicas, en general se utiliza luz blanca, pobre en longitudes de onda larga. El fotoperíodo habitualmente utilizado es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, aunque algunos cultivos requieren oscuridad (Marín, 1993).

La temperatura de las cámaras de cultivo se regula en general entre 22 y 28°C, permitiendo así el desarrollo tanto de especies de climas templados como de plantas tropicales. Es de destacar que durante el período iluminado, la temperatura en el interior de los frascos de cultivo es 1-2°C superior a la de la cámara, debido al efecto invernadero; se crea así un termoperíodo suave (Marín, 1993).

La velocidad de síntesis y de degradación de distintos compuestos y por ende el nivel de producción y acumulación de metabolitos también es influenciado por la

temperatura. Así, *Nicotiana tabacum* acumula entre un 100 a 200 % más nicotina a 27°C que a 21°C o a 31°C (Mantell & Smith, 1983).

En cuanto a la humedad relativa, ésta se mantiene en alrededor del 70 % en las condiciones en las que se realizan habitualmente los cultivos, aunque varía con la temperatura de la cámara y el tipo y cierre de los recipientes. El porcentaje de humedad relativa no es reportado en la mayoría de los trabajos sobre cultivo *in vitro* de vegetales (George, 1987a).

4.2.- TIPOS DE CULTIVOS

La producción de plantas y de metabolitos puede realizarse mediante cultivos de tejidos vegetales diferenciados o indiferenciados.

4.2.1. Cultivos diferenciados

Los métodos de regeneración de plantas por cultivo *in vitro* incluyen la embriogénesis somática y la organogénesis.

4.2.1.1. Embriogénesis somática

Los embriones que no resultan de la fusión de gametos se definen como embriones somáticos, asexuales o adventicios. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, no poseen conexión vascular con el tejido materno y son capaces de crecer y formar plantas normales (Litz & Jarret, 1991; Jiménez González, 1998). La embriogénesis somática se puede obtener directamente a partir de células aisladas o utilizando callos.

Si bien implícitamente todas las células vegetales tienen la información genética para formar una planta completa y funcional, se usan comúnmente cotiledones e hipocótilos para producir embriones somáticos (Gómez Kosky, 1998b).

Generalmente se utilizan medios con altas concentraciones de sales, de sacarosa o de manitol y se necesita la presencia de una auxina para la iniciación del callo embriogénico, habitualmente 2,4-D. Como la maduración y la germinación de los embriones no ocurren en presencia de esta auxina, se debe remover o usarla en bajas concentraciones para permitir el desarrollo. Además, tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de los estados subsiguientes dependen de la presencia de nitrógeno reducido (Litz & Jarret, 1991).

La maduración comienza después que el embrión completa el proceso de histodiferenciación, el crecimiento por mitosis se detiene y la célula comienza a expandirse y a acumular sustancias de reserva. En esta etapa no es necesaria la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, aunque en algunas especies se recomienda el uso de citocininas y en otras la adición de ABA (Gómez Kosky, 1998b).

4.2.1.2. Organogénesis

La organogénesis consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema y el desarrollo de ese primordio en brotes vegetativos que luego enraizan vía la formación y proliferación de meristemas radicales. Los brotes pueden formarse directamente del explanto (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Jiménez González, 1998).

La organogénesis se desarrolla por inoculación de tejido meristemático estéril (yemas axilares o adventicias) en un medio suplementado con niveles óptimos de sales, de compuestos orgánicos y de reguladores de crecimiento. La calidad y cantidad de los componentes del medio dependerá de la especie y del explanto que se quiera cultivar *in vitro* dado que la inducción de un tipo específico de órgano involucra señales aún poco conocidas.

La micropropagación es la tecnología más difundida de propagación masiva de plantas vía organogénesis. Consiste en un conjunto de procedimientos asépticos de cultivo de órganos, tejidos o células que permitan la producción de poblaciones de plántulas idénticas a la planta original de la que se derivan (Krikorian, 1991).

Los cultivos diferenciados son más estables genéticamente que los cultivos indiferenciados. A su vez, los cultivos de yemas axilares que provienen de meristemas preexistentes presentan menores índices de variación genética que el cultivo de yemas adventicias que se originan *de novo* a partir de tejidos somáticos con desarrollo directo o indirecto a través de la formación de callos (Paniego, 1995; Rice *et al.*, 1992).

4.3.- CULTIVOS INDIFERENCIADOS

Los cultivos vegetales indiferenciados se obtienen a partir de órganos o tejidos organizados cultivados en un medio nutritivo apropiado (sólido o líquido) que desdiferencian ante la presencia de auxinas exógenas. En medio sólido se obtienen masas celulares más o menos compactas que constituyen los callos, mientras que en medio líquido se logran las suspensiones celulares formadas por células libres o agregadas. Los cultivos de células vegetales indiferenciadas pueden exhibir una gran variedad estructural, genética y metabólica con respecto a la planta madre.

4.3.1. Tipos celulares presentes en los cultivos *in vitro* indiferenciados

En los cultivos indiferenciados se encuentran células con gran variedad de tamaños y formas, de citoplasma denso, con vacuolas pequeñas y con alto potencial morfogénico que se pueden homologar a las células meristemáticas de las plantas. También se observan células alargadas y células muy grandes con una gran vacuola central y bajo

potencial morfogénico. Sin embargo, debido a que las células en suspensión se dividen en forma asincrónica, los tipos celulares descritos pueden no corresponder a tipos celulares diferentes sino a distintos estadios dentro del ciclo de crecimiento (Warren, 1992), aunque Gómez Kosky (1998a) las clasifica como células meristemáticas, parenquimáticas y gigantes.

A diferencia de los microorganismos, las células vegetales en suspensión en general forman agregados de células individuales de un tamaño ≥ 2 mm. Ello determina una tendencia a la precipitación de los agregados celulares que está influenciada por la composición química del medio de cultivo, la aireación y la agitación. La adición de pectinasas, la reducción de la concentración de calcio y el aumento de la velocidad de agitación permite reducir la agregación (Scragg, 1992).

4.3.2. Crecimiento de callos y suspensiones celulares

Los cultivos de callos son a menudo de crecimiento lento y heterogéneo, debido fundamentalmente a la disponibilidad vectorial de los nutrientes. Son masas celulares cuya morfología raramente provee características que permitan la selección de líneas de interés (Warren, 1992).

Para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en períodos cortos, variables según la especie (30-45 días). La tasa de crecimiento y las características de friabilidad dependen de la especie, del balance hormonal, de la concentración de agar, calcio y magnesio y de la intensidad luminosa (Gómez Kosky, 1998a).

El mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares es un callo friable, formado por células indiferenciadas y con baja cohesividad entre ellas. Si se requiere utilizar otro tipo de callos es necesario romper los agregados celulares por medios mecánicos o enzimáticos. Un cultivo con cúmulos de diferentes tamaños manifiesta comportamientos erráticos debido posiblemente a la diferencia de microambientes (Scragg, 1992).

Aunque los cultivos de células en suspensión son generalmente considerados semejantes a los de los microorganismos, cada tipo de cultivo presenta particularidades (*Tabla 2*). Los cultivos de células vegetales en suspensión presentan una cinética de crecimiento similar a la microbiana pero de desarrollo en mayor espacio de tiempo. Primero existe una fase de retraso o adaptación (1 a 3 días) seguida de una etapa de rápido crecimiento en donde se produce un aumento constante de la biomasa por incremento tanto del número como del tamaño celular, hasta que finalmente el índice mitótico comienza a declinar por limitación de nutrientes, hasta ser prácticamente nulo en

la fase estacionaria. Al inicio de la fase exponencial, el porcentaje de aumento de la biomasa es inferior al que corresponde al aumento en el número de células, pero esta relación luego se invierte debido al incremento del tamaño celular. Además, el peso fresco continúa aumentando después que el peso seco ha alcanzado su máximo, debido a la captación de agua (Szabados *et al.*, 1991; Scragg, 1992).

Tabla 2.- Diferencias entre cultivos de células vegetales en suspensión y cultivos microbianos (Scragg, 1990, 1992; Ertola *et al.*, 1994)

Característica	Cultivos microbianos	Suspensiones vegetales
Tamaño celular	1-2 x 2-10 μm	20-40 x 20-200 μm
Agregados	Generalmente no	Frecuentes
Tiempo de duplicación	< 2 horas	> 24 horas
Contenido de agua	75-80 %	90-95 %
Densidad del inóculo	Baja	Alta (5 – 10 %)
Consumo de oxígeno	Alto (5-200 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Bajo (1-10 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Estabilidad	Generalmente estable	Inestable
Producción espuma	Sí	Sí
Sensibilidad a la fuerza de corte (<i>shear</i>)	No, con excepción de los hongos filamentosos	Sí
Producto	A menudo extracelular	Comúnmente intracelular (vacuola)

4.3.3. Heterogeneidad y variación somaclonal

Al iniciarse un cultivo se produce una división asincrónica de los diferentes tipos celulares que forman el explanto y una selección debida a que las células difieren en su adaptación a las condiciones de cultivo. Esto determina una heterogeneidad inherente al cultivo de tejidos vegetales, aunque es posible, después de varias generaciones, obtener cultivos más homogéneos pero probablemente diferentes a los parentales.

El cultivo de tejidos indiferenciados puede presentar, además, un amplio espectro de variaciones. Es así que se han observado anomalías cromosómicas como deleciones, fusiones, cambios en la ploidía y variaciones en el número y el tamaño. Lee & Phillips (1988) atribuyen estos reajustes cromosómicos a una replicación tardía de la heterocromatina o a un desequilibrio en el *pool* de nucleótidos como consecuencia de los ciclos de transferencia desde medios de cultivo agotados a medios frescos.

4.3.4. Aplicaciones

Las cultivos de suspensiones vegetales tienen un amplio rango de aplicaciones constituyendo una técnica muy valiosa en los estudios sobre: 1) la regulación del ciclo celular, 2) la replicación del ADN y la síntesis de proteínas 3) la transferencia de material genético, 4) la absorción y transporte de nutrientes, 5) los diferentes eventos metabólicos, 6) la producción de metabolitos de interés en las industrias alimenticias, de fragancias y farmacéuticas, 7) el aislamiento y la selección de mutantes, 8) los procesos de diferenciación y desarrollo de los embriones resultantes de la embriogénesis somática, (Szabados *et al.*, 1991).