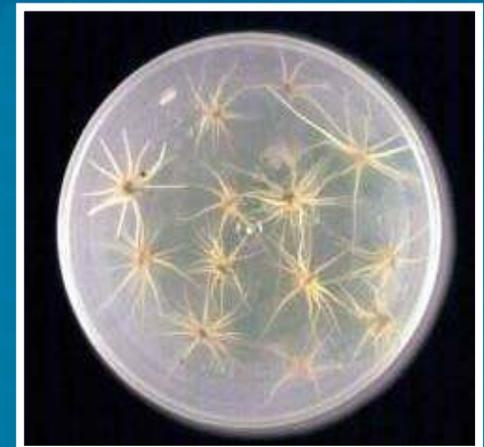
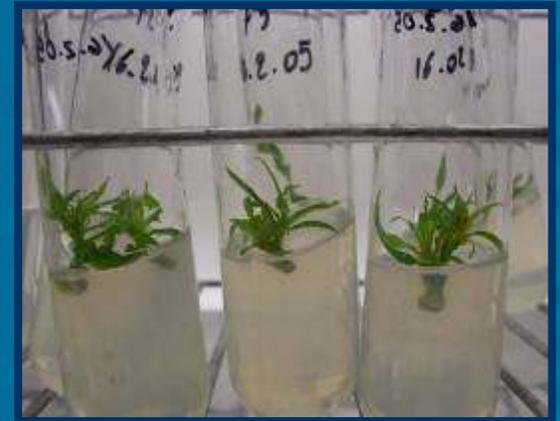


# CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES

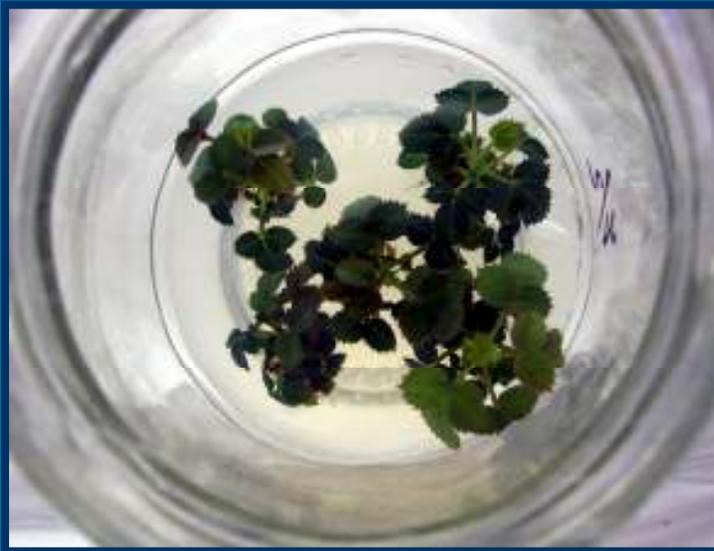
María Elena Daorden

E.E.A. INTA SanPedro



# CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES

Conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento y/o crecimiento de células o tejidos en un medio nutritivo y en condiciones ambientales controladas.



**Los tejidos vegetales pueden cultivarse  
*in vitro***

**La célula vegetal es totipotente**

**La célula retiene toda la información para  
regenerar una planta completa**



# Diferenciación celular

---

La célula adquiere propiedades diferentes a las de la célula que la originó

## Desdiferenciación

Célula diferenciada  Célula desdiferenciada

Célula diferenciada  Retiene información



**Totipotencialidad**

# CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES

**Conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento y/o crecimiento de células o tejidos en un medio nutritivo y en condiciones ambientales controladas.**



# Medio nutritivo

Las porciones del vegetal que se cultivan *in vitro*: “explantos”

No son autotróficos



# Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales

## Agua

### Sustancias orgánicas

### Macro

### Micro

### Nutrientes

**Azúcares**  
**Aminoácidos**  
**Vitaminas**  
**Auxinas**  
**Citocininas**  
**Giberelinas**

**N**  
**P**  
**K**  
**Ca**  
**Mg**  
**S**

**Fe**  
**Zn**  
**B**  
**Mn**  
**Cu**  
**Ni**  
**Co**  
**Al**  
**Mo**  
**I**

# Medio nutritivo: Fitohormonas

## Auxinas

**0.01 a 10 mg/l**

Acido indol Acético (AIA)  
Acido Indol Butirico (IBA)  
Acido Naftalén Acético (ANA)

**2-4 D**

**Se disuelven en  
NaOH 1N**

## Citocininas

**0.03 a 10 mg/l**

Bencil adenina-(BA)  
Bencilaminopurina (BAP)  
2ip  
Zeatina  
Tridiazuron

**Se disuelven en  
HCl 1N**

## Giberelinas

**En cultivo de meristemas y  
para elongación: Acido Giberélico  
(GA<sub>3</sub>)**



Estación Experimental Agropecuaria  
San Pedro

# Medio nutritivo



**Auxinas Citocininas**



**Parte aérea**



**Auxinas Citocininas**



**Enraizamiento**



# Modalidades de cultivo *in vitro*

Cultivo de meristemas

Cultivo de yemas

Cultivo *in vitro* de plantas superiores

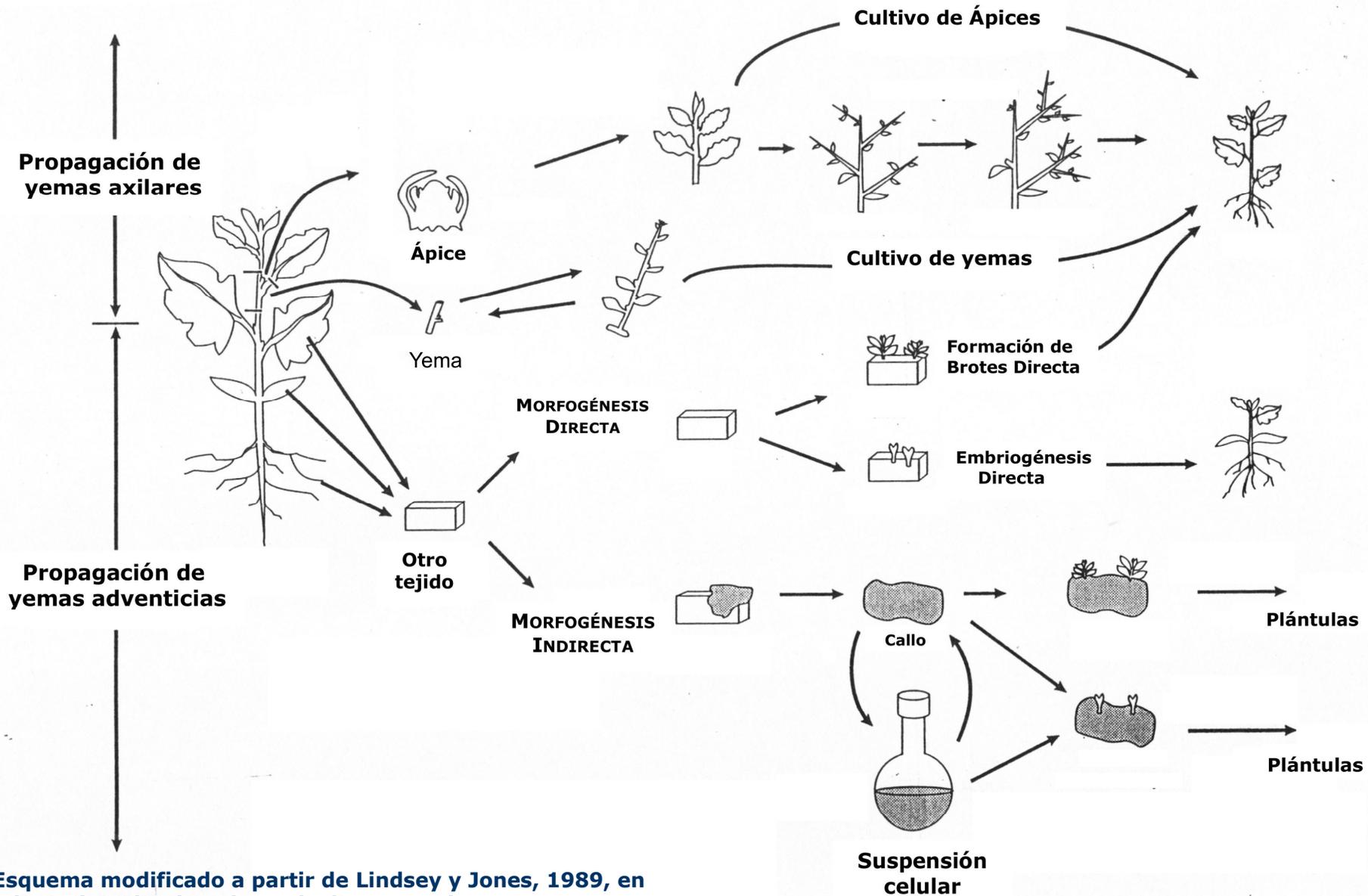
Cultivo de anteras

Cultivo de embriones

Cultivo de protoplastos



# Tipos de cultivo *in vitro*



Esquema modificado a partir de Lindsey y Jones, 1989, en *Plant Biotechnology in Agriculture*. p 59)

# Multiplicación en plantas

---

- **Semillas**

- ✓ **Reproducción sexual**
- ✓ **Progenie con distinto genotipo**

- **Vegetativa:** bulbos, esquejes, estacas, tubérculos

- ✓ **Reproducción asexual**
- ✓ **Progenie con idéntico genotipo**
- ✓ **Descendencia uniforme**
- ✓ **Se transmiten enfermedades**

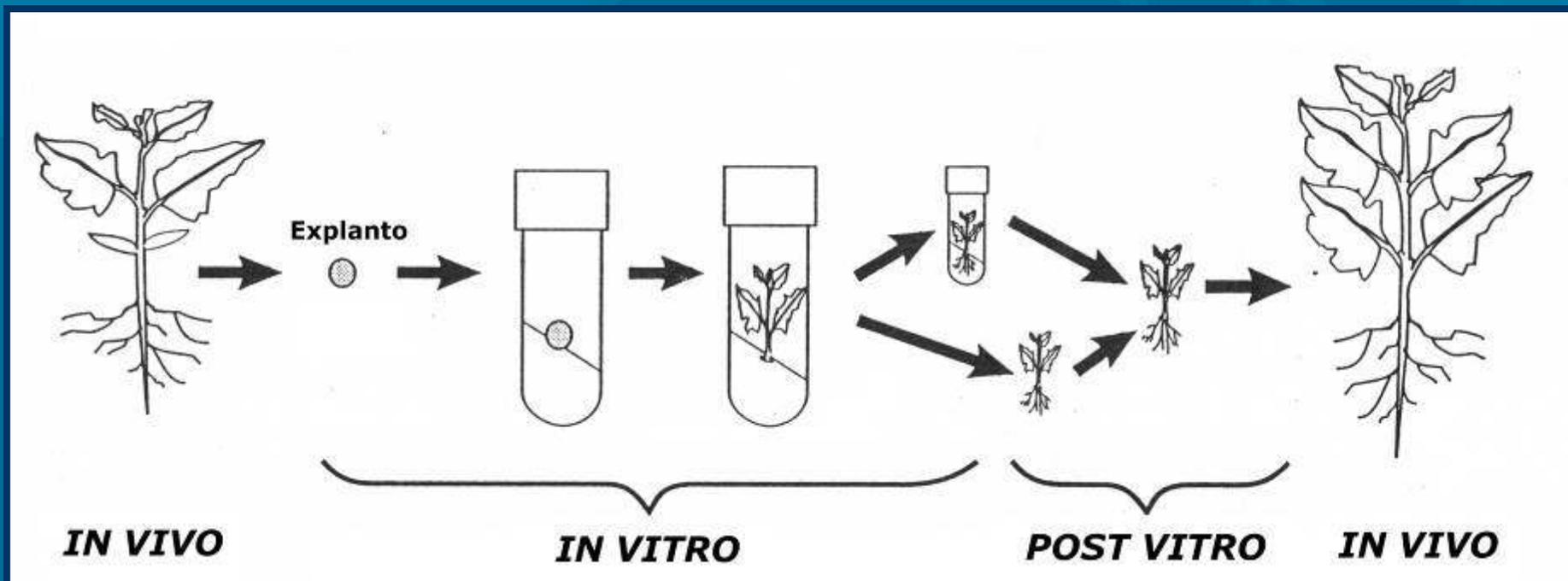
# Producción de plantas libres de enfermedades

---

## Métodos

- ✓ **Tratamientos con calor:** para algunos virus y micoplasmas
- ✓ **Cultivo de meristemas**
- ✓ **Ambos**
- ✓ **Microinjerto: Injerto de meristemas sobre un pie sano.**

# Cultivo de meristemas



Esquema modificado a partir de Lindsey y Jones, 1989, en Plant Biotechnology in Agriculture)

# Obtención de plantas de sanidad controlada (Cultivo de meristemas)

---

*Por qué el meristema?*

**“La concentración del patógeno no es uniforme en la planta infectada”**

## Meristema

- Sistema vascular poco diferenciado
- Elevada actividad metabólica
- Elevada concentración de auxinas



# Esquema para la obtención de plantas de sanidad controlada

- **Extracción del ápice (0.2-0.5 mm)**
- **Cultivo del ápice en un medio adecuado**
- **Planta regenerada**
- **Planta establecida en sustrato** ← **Cuidadoso control de la humedad**
- **Planta saneada** ← **Rigurosas evaluaciones (plantas indicadoras, injertos, serología etc)**
- **Cultivo libre de virus** ← **Mantenimiento, multiplicación, Monitoreo de reinfecciones virósicas**

# Cultivo de meristemas

---

## Consideraciones generales

- **El proceso no ofrece total seguridad**
- **Importancia de las técnicas de diagnóstico**
- **Análisis confiables**
- **Sistemas de detección sensibles**
- **Especificar de qué virus se ha liberado y la técnica de diagnóstico empleada**

# Producción de plantas libres de enfermedades

---

## Métodos

- ✓ **Tratamientos con calor:** para algunos virus y micoplasmas
- ✓ **Cultivo de meristemas**
- ✓ **Ambos**
- ✓ **Microinjerto: Injerto de meristemas sobre un pie sano.**

# Microinjertos

---

## Injertar ápices caulinares en un portainjerto

Etapas:

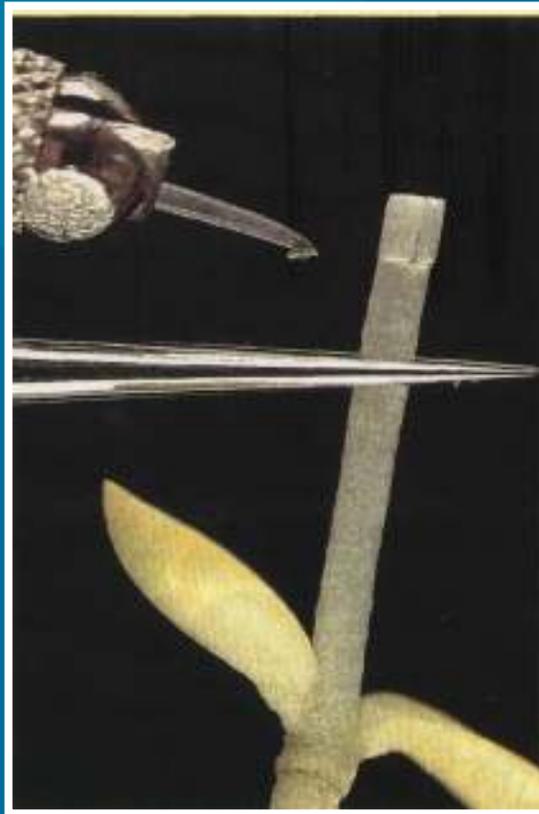
- ✓ Germinación *in vitro* de las semillas del portainjerto
- ✓ Preparación de la plántula para ser injertada
- ✓ Extracción del ápice de la planta infectada
- ✓ Mantenimiento de la plántula injertada en cultivo
- ✓ Mantener la planta obtenida en invernadero
- ✓ Indexar las plantas obtenidas



# Microinjertos



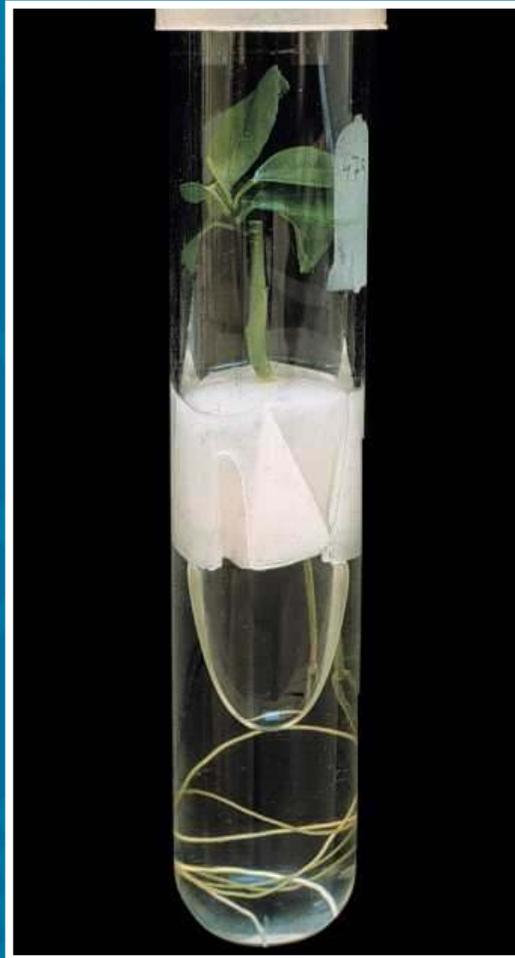
Plántula  
especialmente  
acondicionada



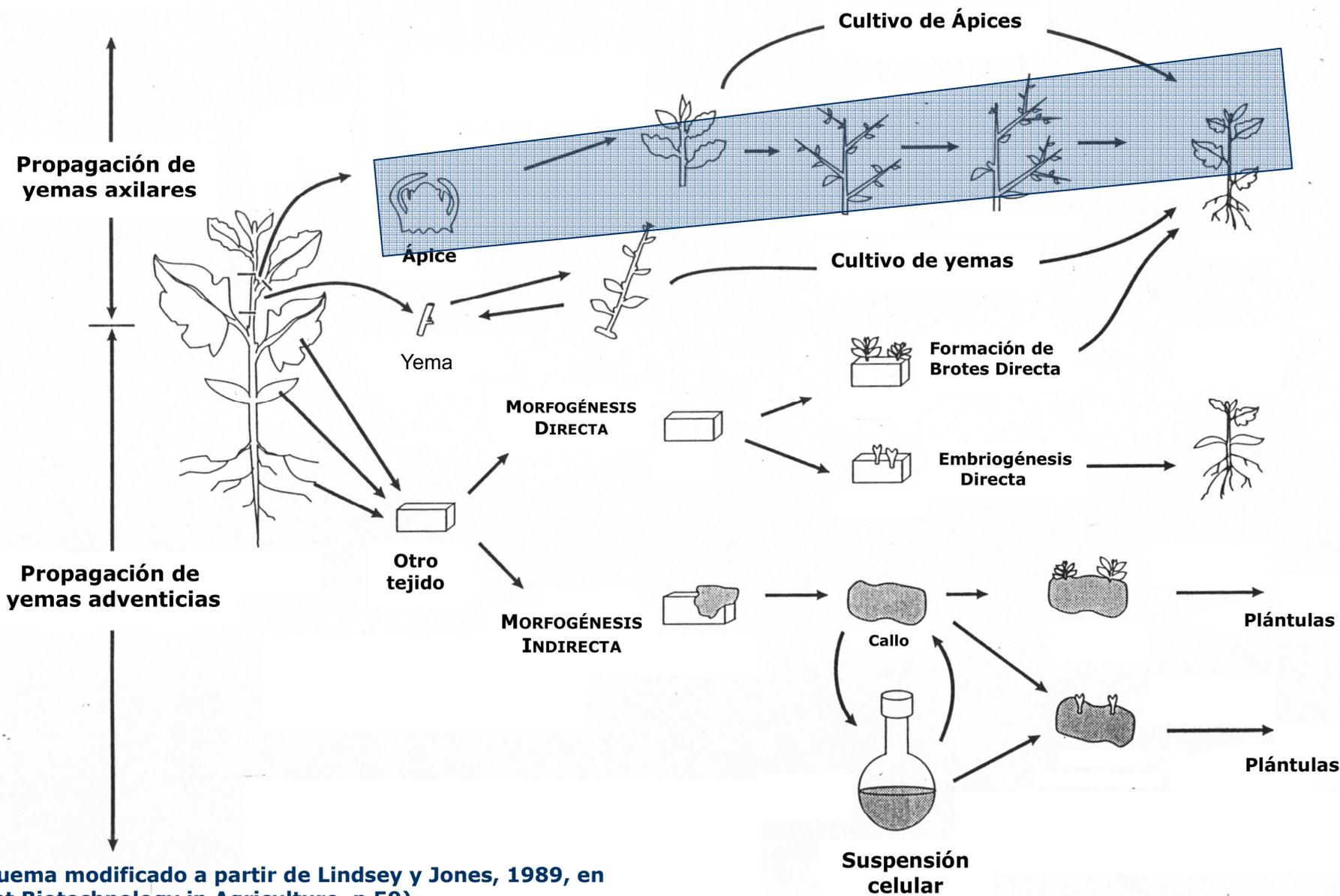
**Dos a cuatro semanas**

Ubicación del ápice en la plántula

# Microinjertos



# Tipos de cultivo *in vitro*



Esquema modificado a partir de Lindsey y Jones, 1989, en Plant Biotechnology in Agriculture. p 59)

# Influencia del material de partida: Planta madre

## Capacidad regenerativa

- ✓ Genotipo
- ✓ Edad
- ✓ Estado del órgano o tejido
- ✓ Estado fisiológico
- ✓ Estado sanitario
- ✓ Año
- ✓ Condiciones de crecimiento
- ✓ Posición del explanto
- ✓ Tamaño del explanto
- ✓ Condiciones fisiológicas

Según Pierik, R.L.M. *In vitro* Culture of higher plants



# Influencia del material de partida: Planta madre

## Capacidad regenerativa

- ✓ **Genotipo:** Dicotiledóneas mejor que monocotiledóneas, y entre ellas las Solanáceas, crucíferas muy fácil regeneración
- ✓ **Edad:** Partes juveniles mejor que las adultas
- ✓ **Estado del órgano o tejido:** Mejor no leñosos
- ✓ **Estado fisiológico:** Partes vegetativas mejor que partes generativas



# Influencia del material de partida: Planta madre

## Capacidad regenerativa

- ✓ **Estado sanitario:** Las más saludables y vigorosas
- ✓ **Año:** sobre todo si el material proviene de campo (inviernos severos ó veranos secos)
- ✓ **Condiciones de crecimiento:** diferente respuesta si crece en campo que en invernadero



# Influencia del material de partida: Planta madre

## Capacidad regenerativa

- ✓ **Posición del explanto:** Hay un gradiente de regeneración en la planta
- ✓ **Tamaño del explanto:** En general a mayor tamaño mayor capacidad regenerativa



# Preparación de la planta madre

- ✓ Recomendable que crezca en invernadero o cámara de crecimiento
- ✓ Usar material homogéneo
- ✓ Elegir plantas vigorosas
- ✓ Promover nuevas brotaciones: podas
- ✓ En maceta con sustrato estéril
- ✓ Programa sanitario
- ✓ Controles y manipulación de intensidad de luz, fotoperíodo y temperatura
- ✓ Aplicación de fitoreguladores



# Preparación de la planta madre

---

**Prevenir insectos de cualquier tipo**

**Prevenir hongos y bacterias**

**Regar sólo en la maceta (evitar riegos por encima)**

**Mantener baja la humedad**



# Obtención de explanto y desinfección

## En invernadero

- ✓ Elementos limpios en la colección
- ✓ Ubicarlos en bolsas identificadas
- ✓ En conservadoras



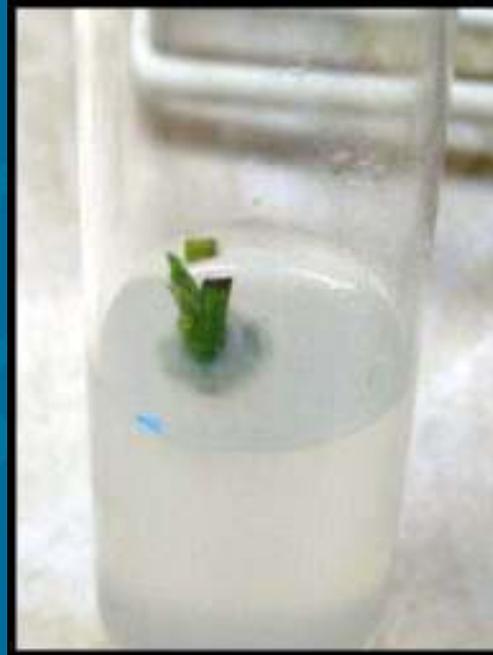
# Obtención de explanto y desinfección

## En laboratorio

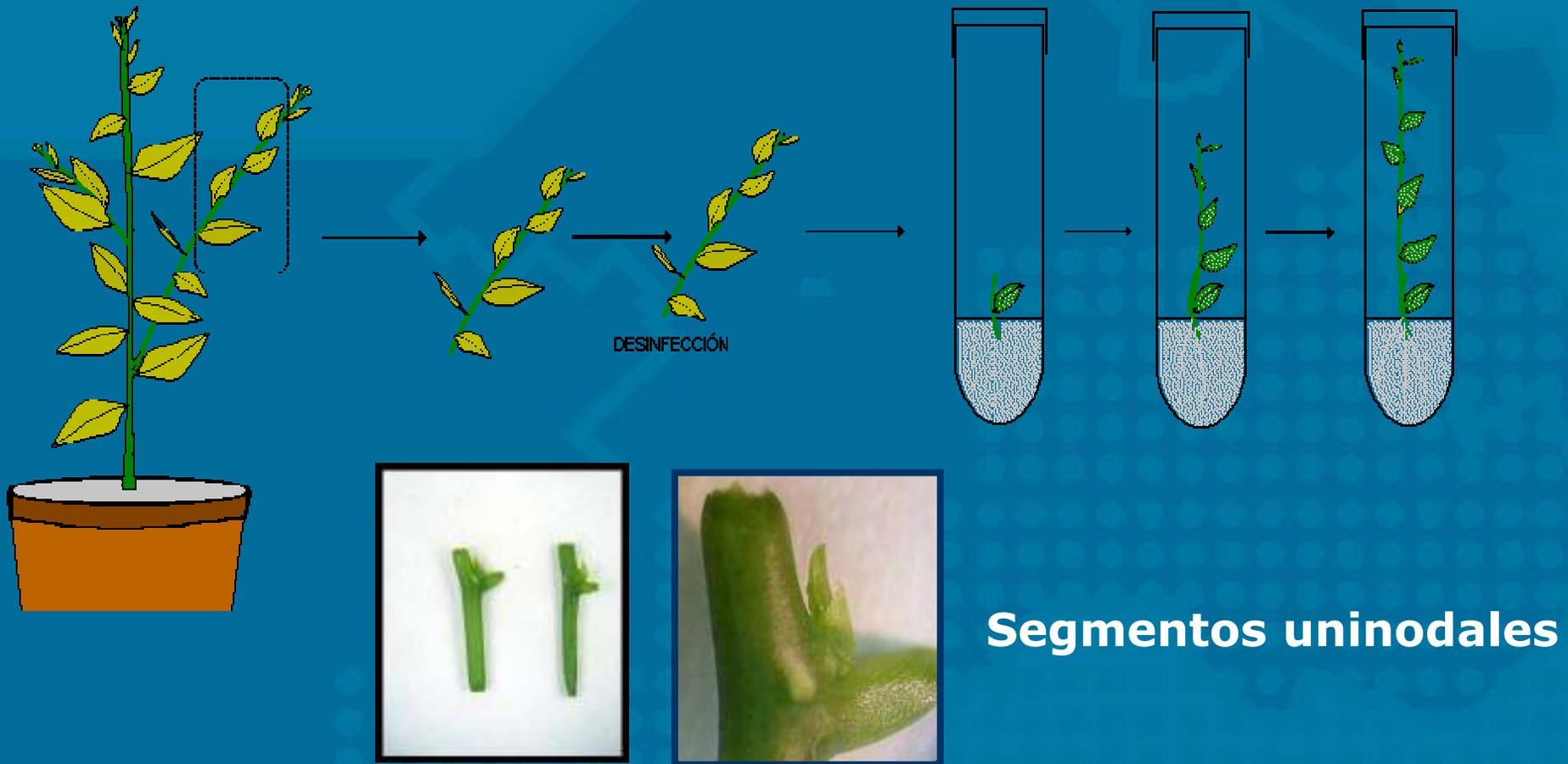
- ✓ Agua corriente
- ✓ Se retiran hojas
- ✓ Soluciones desinfectantes (etanol-hipoclorito de sodio)
- ✓ Enjuagues con agua estéril en cabina de flujo laminar
- ✓ Antibióticos y/o fungicidas



# Contaminaciones



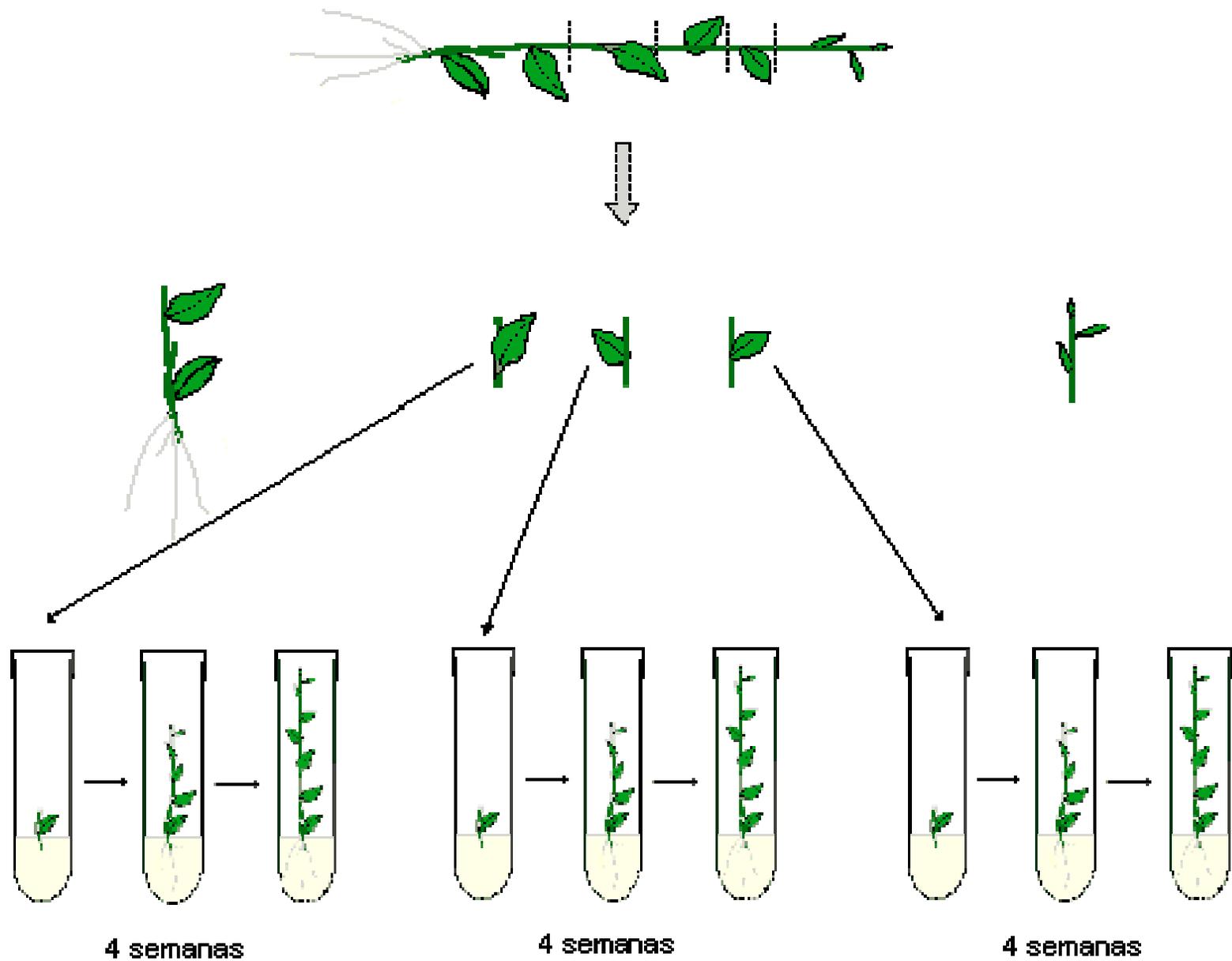
# Micropropagación



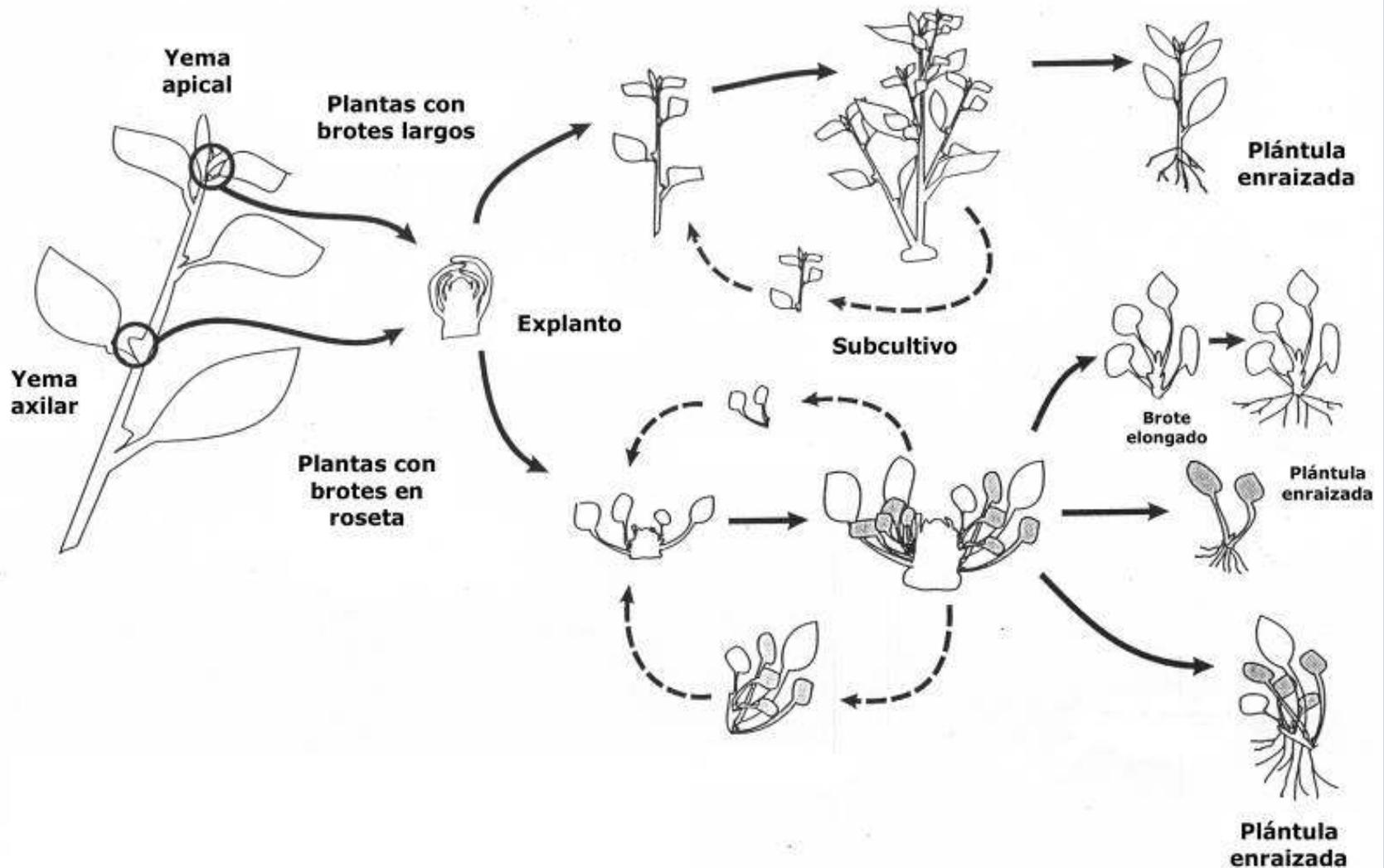
**Segmentos uninodales**

Fuente: <http://www.etsea2.udl.es>

# Micropropagación

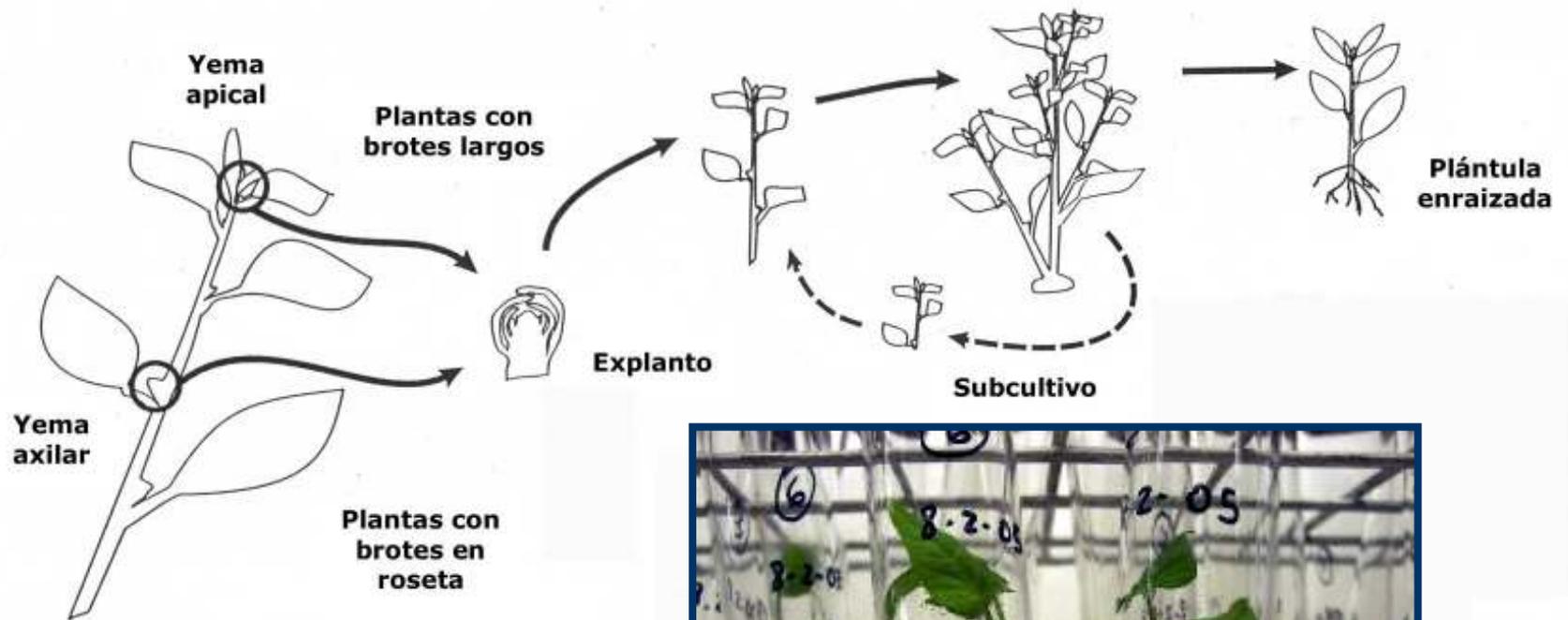


# Tipos de micropropagación



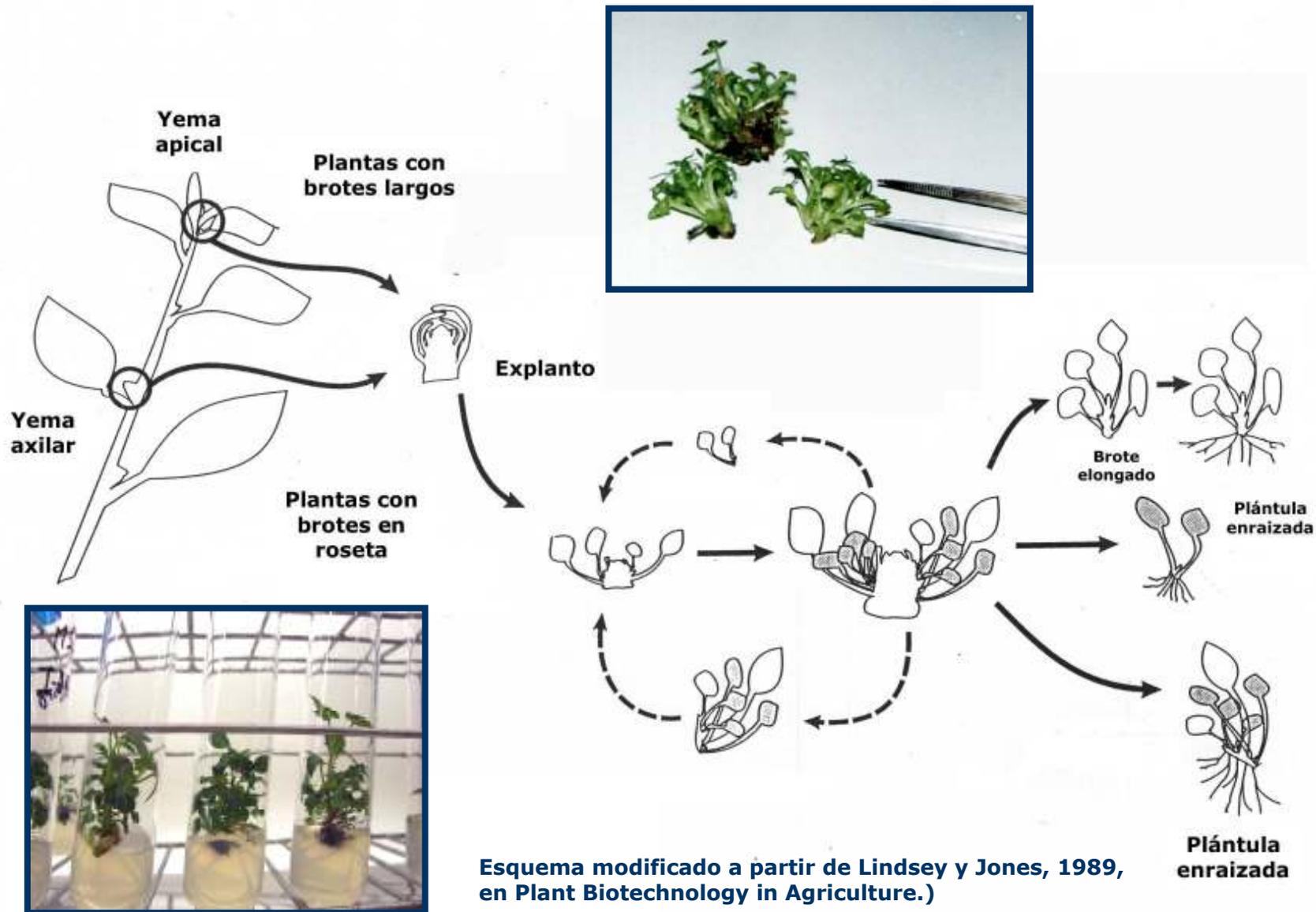
Esquema modificado a partir de Lindsey y Jones, 1989, en Plant Biotechnology in Agriculture. p 59)

# Tipos de micropropagación



Esquema modificado a partir de Lindsey y Jones, 1989, en Plant Biotechnology in Agriculture.)

# Tipos de micropropagación



Esquema modificado a partir de Lindsey y Jones, 1989, en Plant Biotechnology in Agriculture.)

# Micropropagación: Etapas (Murashige)

## Etapa I

Selección y desinfección de explantos  
Cultivo en medio nutritivo



## Etapa II

Multiplicación a través de subcultivos



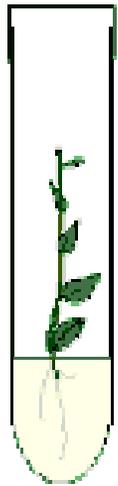
## Etapa III

Enraizamiento

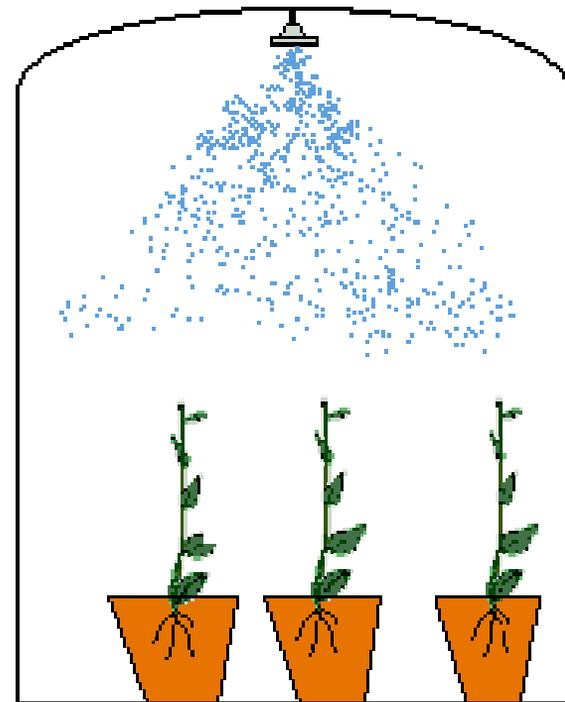
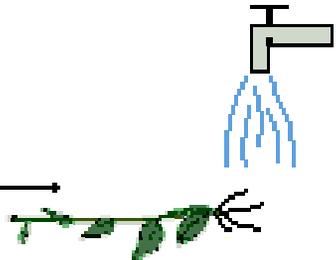


# Micropropagación

## Transplante y aclimatación



Planta entera

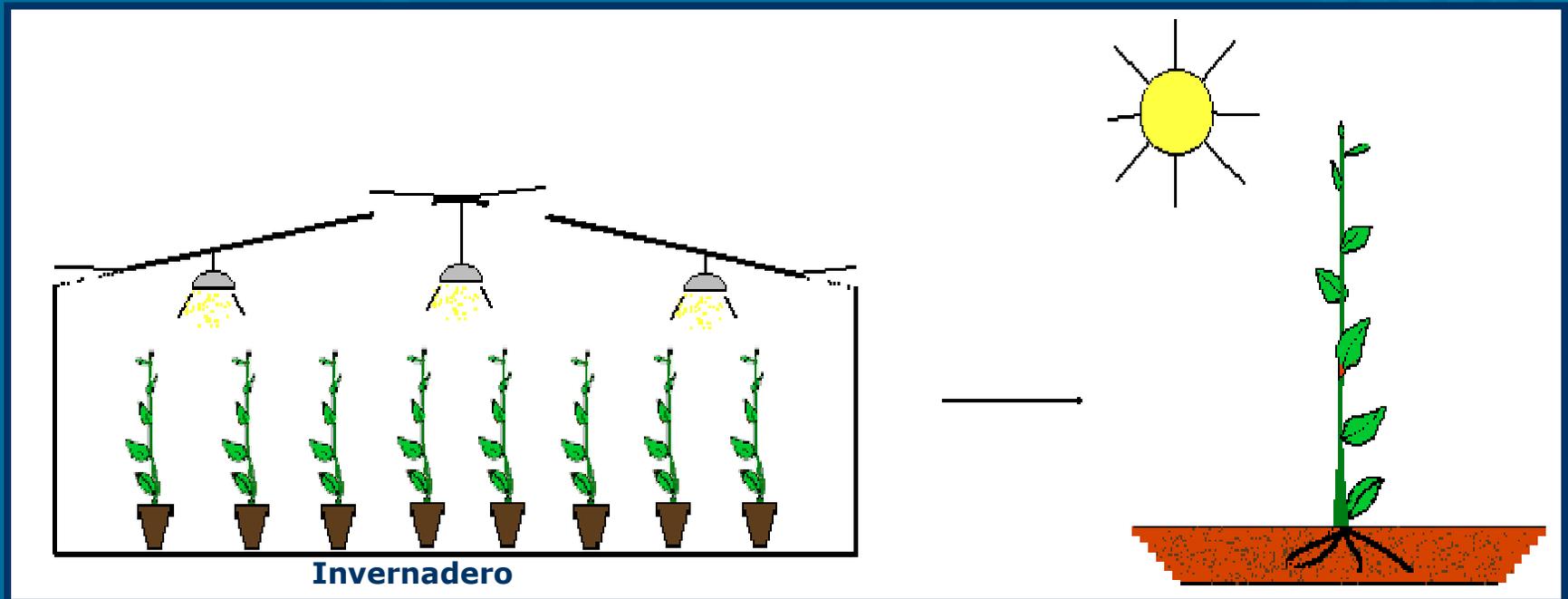


Microtúnel



# Micropropagación

## Transplante y aclimatación





Túnel de aclimatación



1.3

1.6

21.1

21.2

21.8

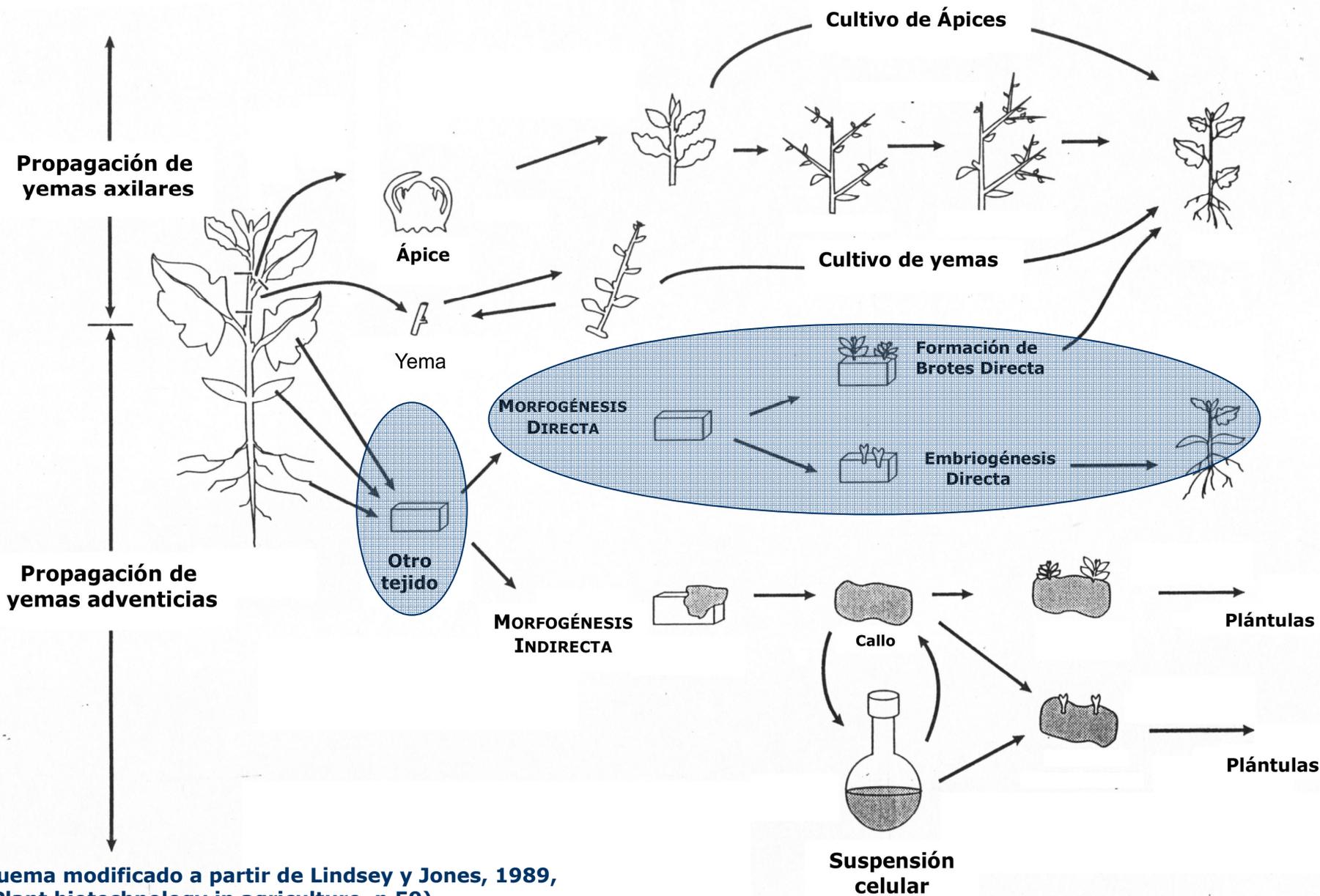
1.10

Plántulas en aclimatación



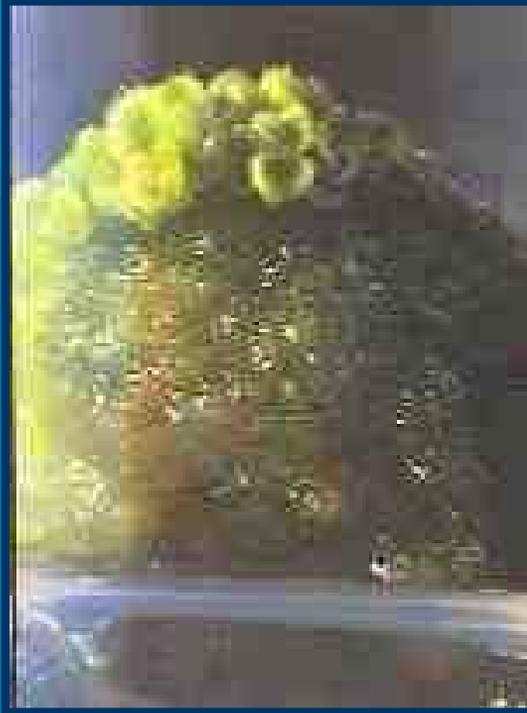
Plántulas aclimatadas

# Tipos de cultivo *in vitro*



Esquema modificado a partir de Lindsey y Jones, 1989, en Plant biotechnology in agriculture. p 59)

# Morfogénesis directa

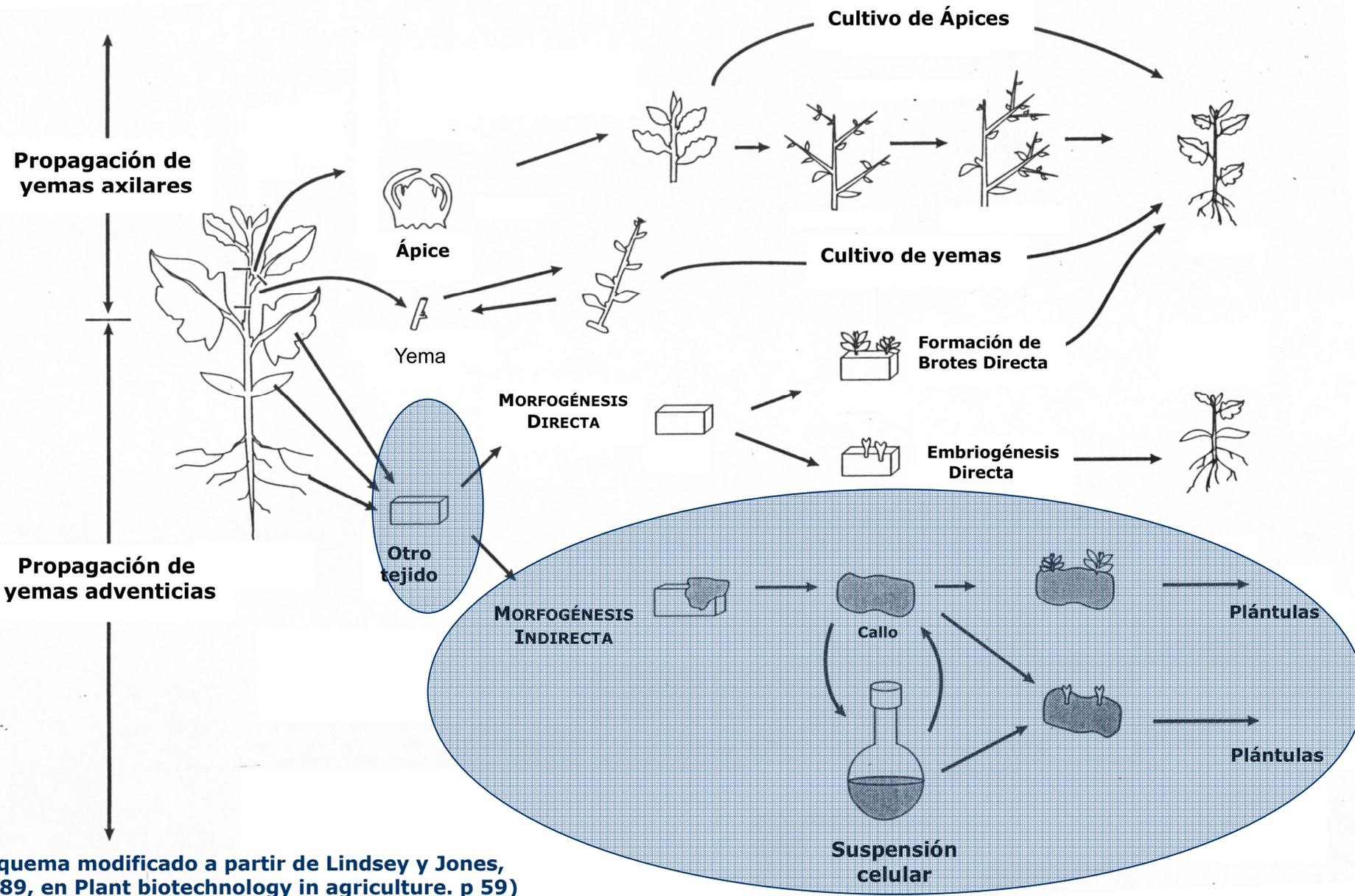


**Regeneración  
en hojas de  
Violeta africana**



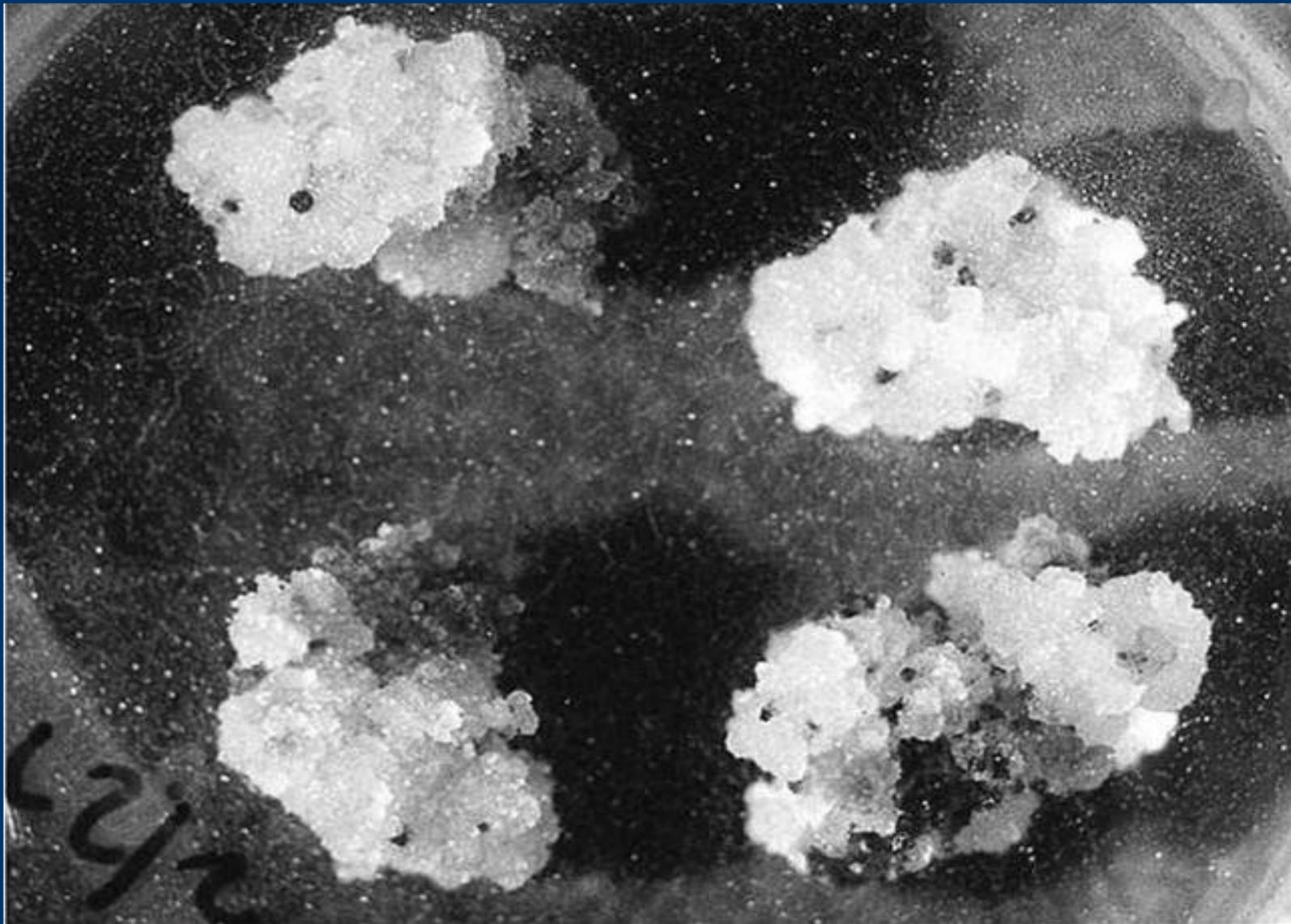
Fuente: <http://www.unizar.es>

# Tipos de cultivo *in vitro*

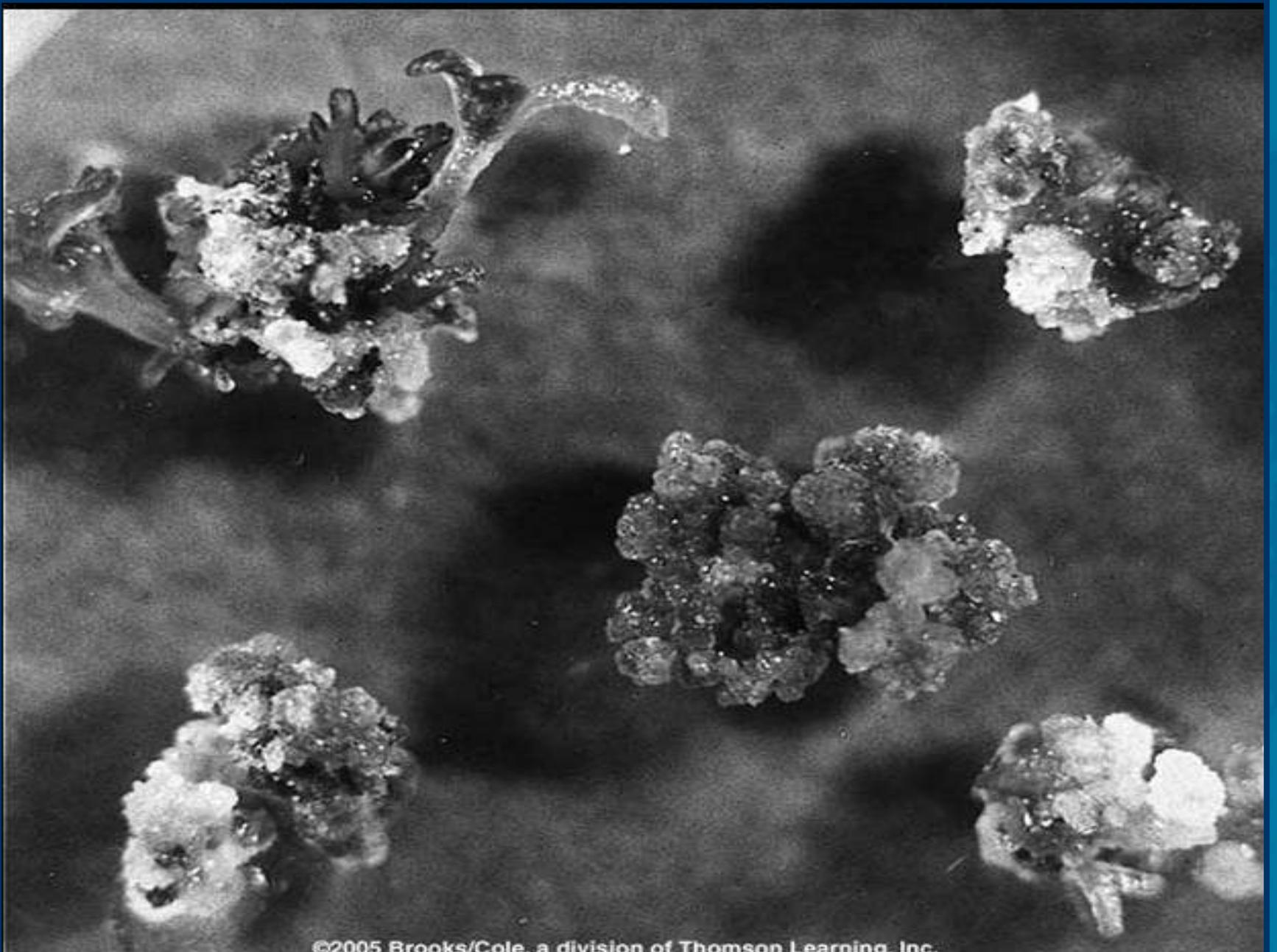


# Morfogénesis indirecta

## Masas de callos indiferenciados



# Regeneración a partir de callos



# Cultivo de Anteras

---

*En qué consiste?*

**Polen inmaduro en medios adecuados para la formación de embriones o callos**



# Cultivo de Anteras

## *Aplicaciones en fitomejoramiento*

Cruzamiento A X B



Plantas F1



**Cultivo de anteras**



Líneas haploides



Selección

# Cultivo de embriones cigóticos

## *Para qué se usa?*

- ✓ Superar dormición
- ✓ Inhibidores en el endosperma
- ✓ Estudios fisiológicos y nutricionales
- ✓ Acortar el ciclo en mejora
- ✓ Rescatar híbridos de cruzamientos



# Recuperación de híbridos

---

## Barreras a los cruzamientos interespecíficos

**Precigóticas:** el grano de polen no germina o no atraviesa el estilo.

**Postcigóticas:** relacionadas con el desarrollo del embrión

**Cultivo *in vitro* de embriones**



# Cultivo de embriones cigóticos

---

**Mejoramiento**



**Cruzamientos interespecíficos**



**Incompatibilidades**



**Embriones abortivos**



**Embriones cultivados *in vitro***



# Cultivo de embriones cigóticos

---

## En el género *Prunus*

**Duraznero X Almendro**



**Portainjertos  
resistentes a  
nematodes**

***P. cerasifera* X *P. munsoniana***



**Mariana 2624  
Resistencia a  
Ring spot virus**

***P. avium* X *P. pseudocerasus***



**Cultivar Colt  
(Cerezo)**

# En la EEA San Pedro

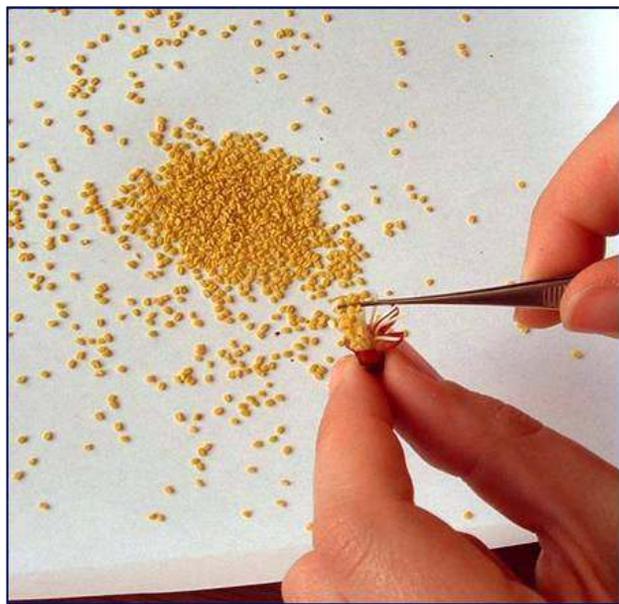


Árboles polinizados

# Cruzamientos: Metodología

**Parental Maculino**

**Recolección de  
flores  
en estado globoso**



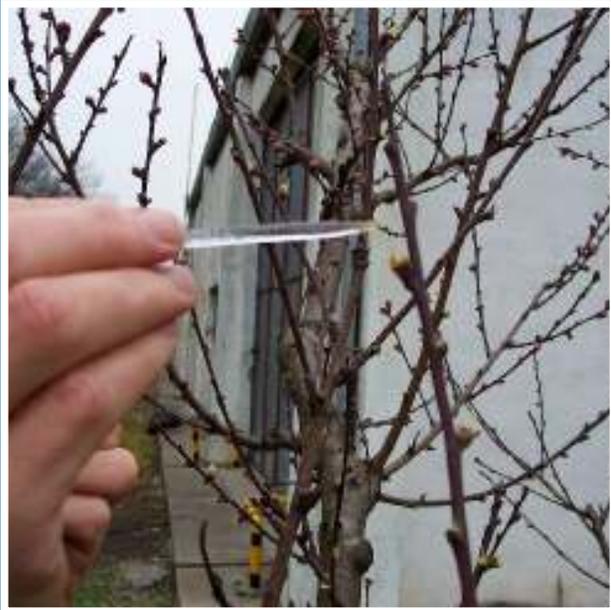
**Extracción y  
tamizado  
del polen**

## Parental femenino

### Ramas con flores emasculadas



# Polinización



Ubicación del polen



# Embolsado de ramas



# Frutos cuajados

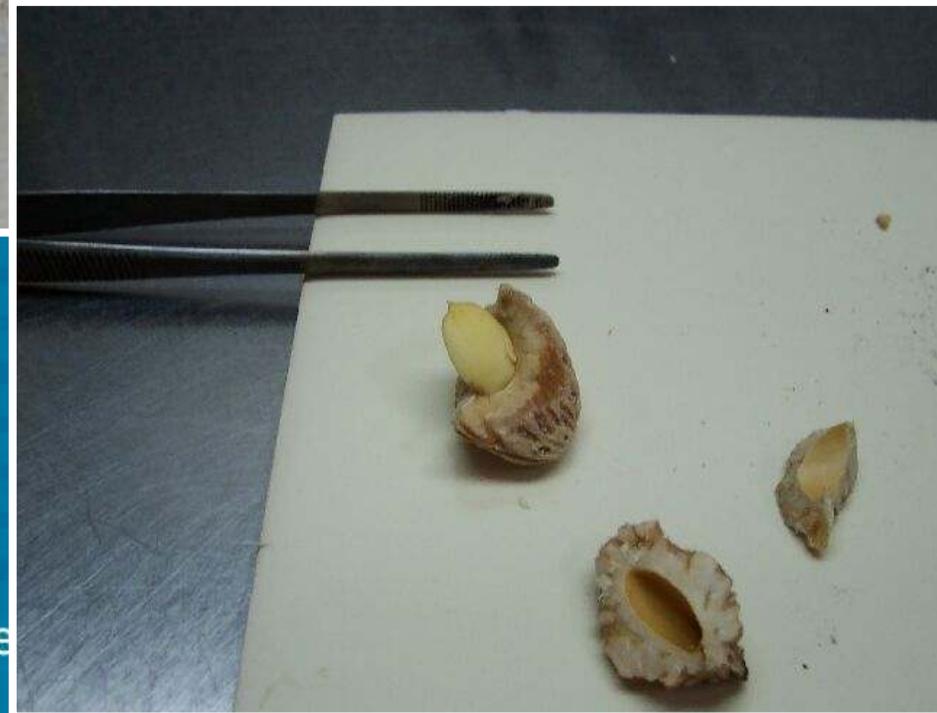


## Desembolsado de ramas a los 40 días de la polinización



# En laboratorio

Acondicionamiento  
del fruto y extracción  
de semilla





**Siembra de  
embriones  
en condiciones asépticas**



# Germinación *in vitro*



# Embrión germinado *in vitro*



Alternativas

*In vitro*



A sustrato

## Híbridos ambientados





## Híbridos injertados sobre portainjertos francos





**Híbridos en campo**



Híbridos en campo





# Gracias por su atención!

[www.inta.gov.ar/sanpedro](http://www.inta.gov.ar/sanpedro)

**Dra. María Elena Daorden** [daorden@correo.inta.gov.ar](mailto:daorden@correo.inta.gov.ar)



Estación Experimental Agropecuaria  
San Pedro