

TEMA 2

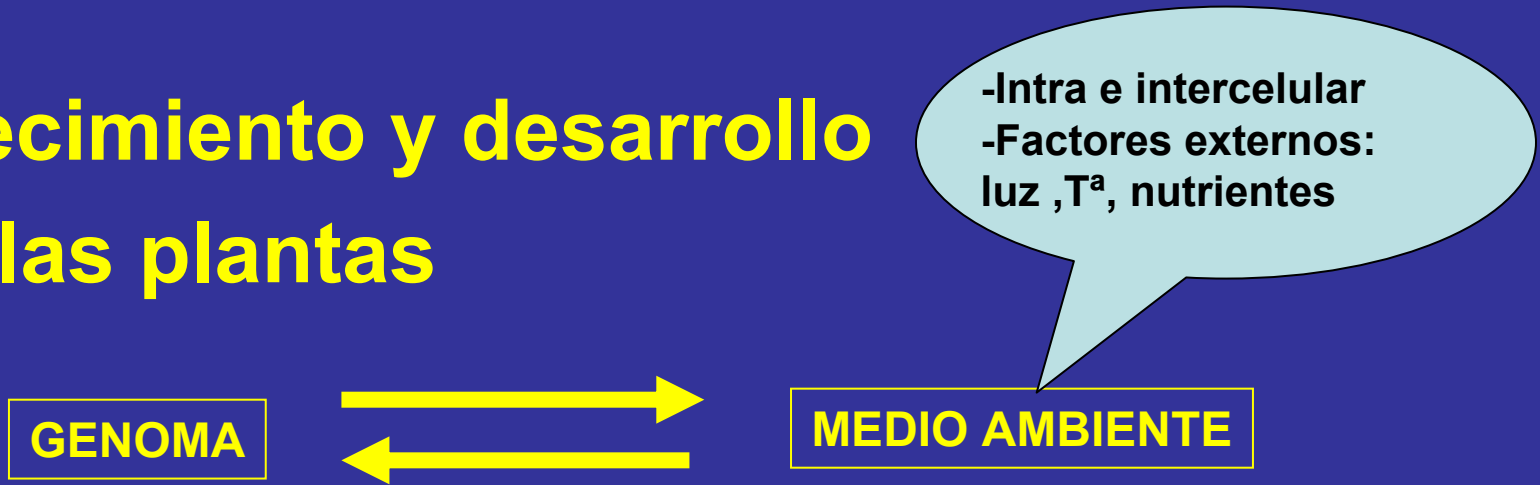
CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS

INDICE

- 1. Introducción
- 2. Historia del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales
- 3. Estudios básicos sobre nutrición y morfogénesis
- 4. Aplicaciones
- 5. Tipos de cultivo *in vitro*
- 6. La biología de las células vegetales cultivadas
 - 6.1. Iniciación de cultivo de callo
 - 6.2. Cultivos celulares
 - 6.3. Manipulación del crecimiento y diferenciación *in vitro*

1. Introducción

• Crecimiento y desarrollo de las plantas



Comunicación intercelular

1. Corta distancia

- plasmodesmos
- sistemas de reconocimiento

2. Larga distancia

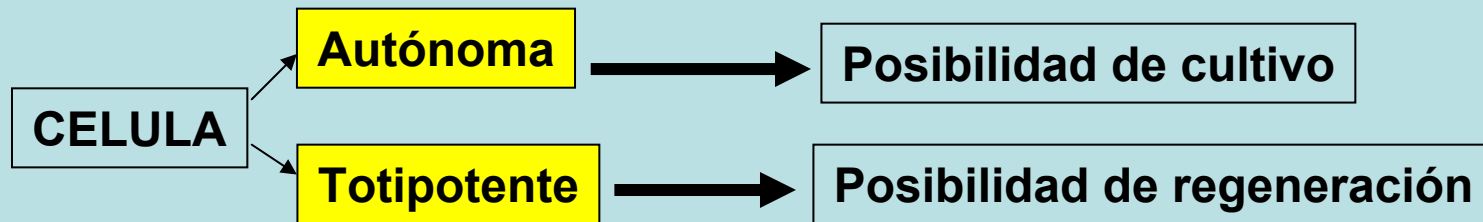
- transporte xilema/floema
- de hormonas, metabolitos, nutrientes

¿Qué grado de autonomía tienen los órganos, tejidos y células vegetales?

El interés por definir la relación funcional de un tejido con otro y por investigar el potencial de desarrollo de las células aisladas de la planta intacta fue lo que dio lugar, a finales del siglo XIX, al cultivo de los tejidos vegetales

2. Historia del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

- 1838-39. Schleiden y Schawnn. Teoría celular.



*Sin evidencias experimentales, salvo cigoto y espora

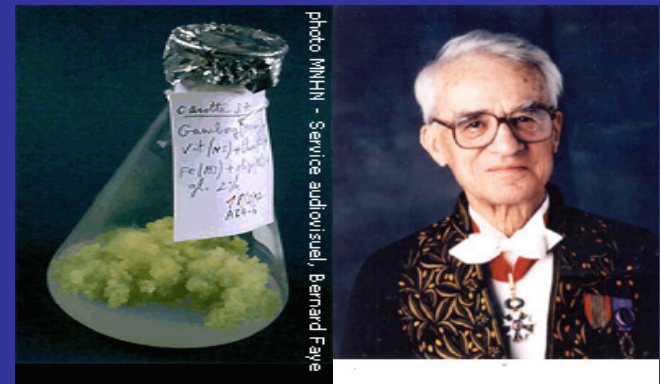
- Trécul (1853), Vochting (1878) y Rechinger (1893).
 - Descripción de cicatrización de heridas y formación de callo en numerosas especies.
 - Callo= masa desorganizada dividiéndose activamente
 - Tamaño mínimo de explante
 - Influencia del sistema vascular

2. Historia del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales



- **Haberlandt o la visión de futuro de la Biología celular**
- 1902. “Hasta donde yo se, no se ha hecho ningún intento sistemático de cultivar células vegetativas aisladas de plantas superiores en soluciones nutritivas simples. Los resultados de dichos experimentos conducirían a una importante visión de conjunto de las propiedades y potencialidades que posee la célula como organismo elemental. Además, proporcionaría información acerca de las interrelaciones e influencias complementarias a las que están expuestas las células de un organismo multicelular completo”
- Trabajó con células aisladas del parénquima en empalizada de tejido foliar
 - Células muy diferenciadas y medio de cultivo inadecuado
 - Si hubiera escogido explantes de zanahoria o sauce, que proliferan sin hormona exógena, hubiera obtenido el primer cultivo de tejidos

2. Historia del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales



- Cultivo de órganos. White (1934). Cultivos indefinidos de raíces de tomate en medio nutritivo con extracto de levadura.
- Cultivo de tejidos= cualquier cultivo multicelular creciendo sobre un medio que contiene muchas células en continuidad protoplasmática. Normalmente, consiste en un callo sin homología, ni estructural ni funcional, con ningún tejido de una planta normal.
 - Gautheret, Nobécourt y White (1939) consiguen, por separado, el primer cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Los dos primeros utilizan tejido cambial (c. meristemáticas) de zanahoria y el último, tejido tumoral de tabaco.
 - La adición de auxina AIA (Went, 1927) y de las vitaminas B fue esencial en el éxito de los callos de Gautheret y Nobécourt.
 - Asimismo, el hecho de que hubiera células meristemáticas en el tejido

3. Estudios básicos sobre nutrición y morfogénesis

- Van Overbeek et al. (1941). Calidad nutritiva del endospermo de coco en cultivos de embriones híbridos de *Datura*.
- Descubrimiento de que la adenina derivada de ácidos nucleicos aumentaba la proliferación celular y la formación de yemas en cultivos de callos (Skoog, 1948). Miller (1955) descubre la kinetina en el esperma de arenque.
- Skoog & Miller (1957). Efecto del balance auxina/citoquinina en la inducción de respuestas morfogénicas en callo de tabaco.
- Reinert (1958). Embriogénesis somática en callo de zanahoria.
- Cultivo de células aisladas. Totipotencia. Vasil & Hildebrandt (1965). Consiguen regenerar una planta de tabaco a partir de una célula aislada.
- Kohlenbach consigue finalizar la tarea de Haberlandt en 1966. Cultiva con éxito células de mesofilo de *Macleaya cordata* y obtiene embriones somáticos.

4. Aplicaciones

Propagación industrial de plantas

❖ Micropropagación

-Cultivo de meristemos.

Planta sana

-Embriogénesis somática

Semilla sintética

❖ Conservación de germoplasma

Mejora de plantas

❖ Generación de Variabilidad

-Variación somaclonal

-Mutagénesis

❖ Recuperación de embriones

❖ Cultivo de anteras y microsporas

-Obtención de haploides

❖ Cultivo de protoplastos

-Híbridos somáticos

Producción de compuestos de interés industrial por suspensiones celulares

5. Tipos de cultivo

Desarrollo organizado

- **Desarrollo *in vitro* de la estructura inherente al explanto**
 - Meristemo
 - Primordio foliar
 - Yemas florales
 - Frutos pequeños

Desarrollo desorganizado

- **Ausencia de estructuras reconocibles**
- **Número limitado de tipos celulares especializados, morfológica y funcionalmente**

- **Cultivo de estructuras organizadas**
 - **Explantos meristemáticos**
 - **Raíces**
 - **Embriones...**

- **Cultivo de estructuras no organizadas**
 - **Callos**
 - **Suspensiones celulares**
 - **Protoplastos...**

Iniciando el cultivo...

- **Explanto**
- **Aislamiento e incubación**
- **Contaminación/exudados fenólicos**
- **Medio de cultivo**
- **Subcultivo**
- **Densidad mínima de inóculo**

Cultivo de estructuras organizadas

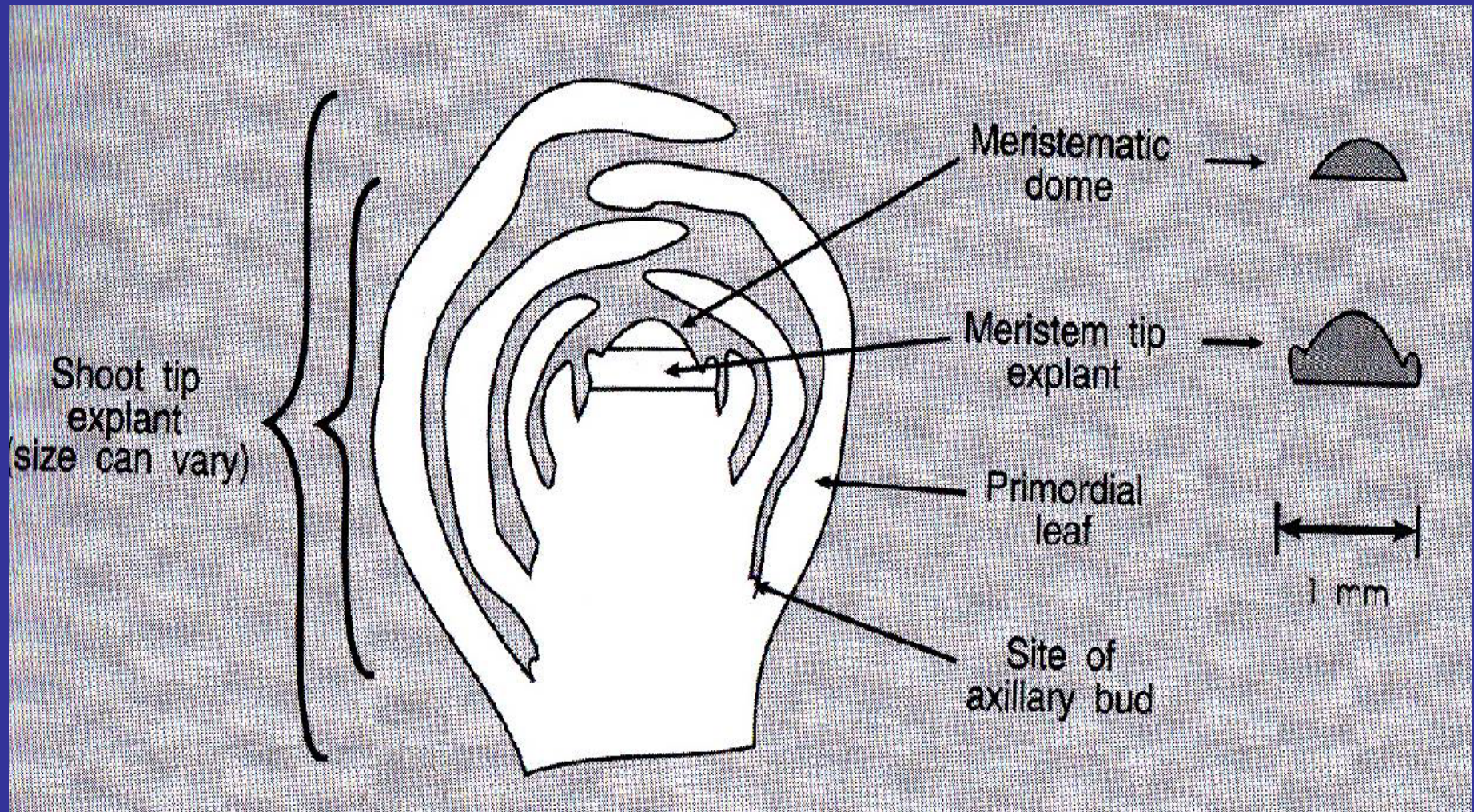
- **Cultivos de órganos**
 - **Determinados**
 - **Destinados a tener tamaño y forma definido (hojas, flores, frutos)**
 - **Indeterminados**
 - **Crecimiento potencialmente ilimitado (meristemo apical caulogénico y radicular)**

Cultivo de órganos determinados

- Ruddat et al. 1979. *Silene alba*.
- Rastogi and Sawhney 1988. *Lycopersicon sculentum*
- Deaton et al. 1980. *Nicotiana offinis*
- Reversion floral meristem to vegetative one

Cultivo de órganos indeterminados

Meristemos



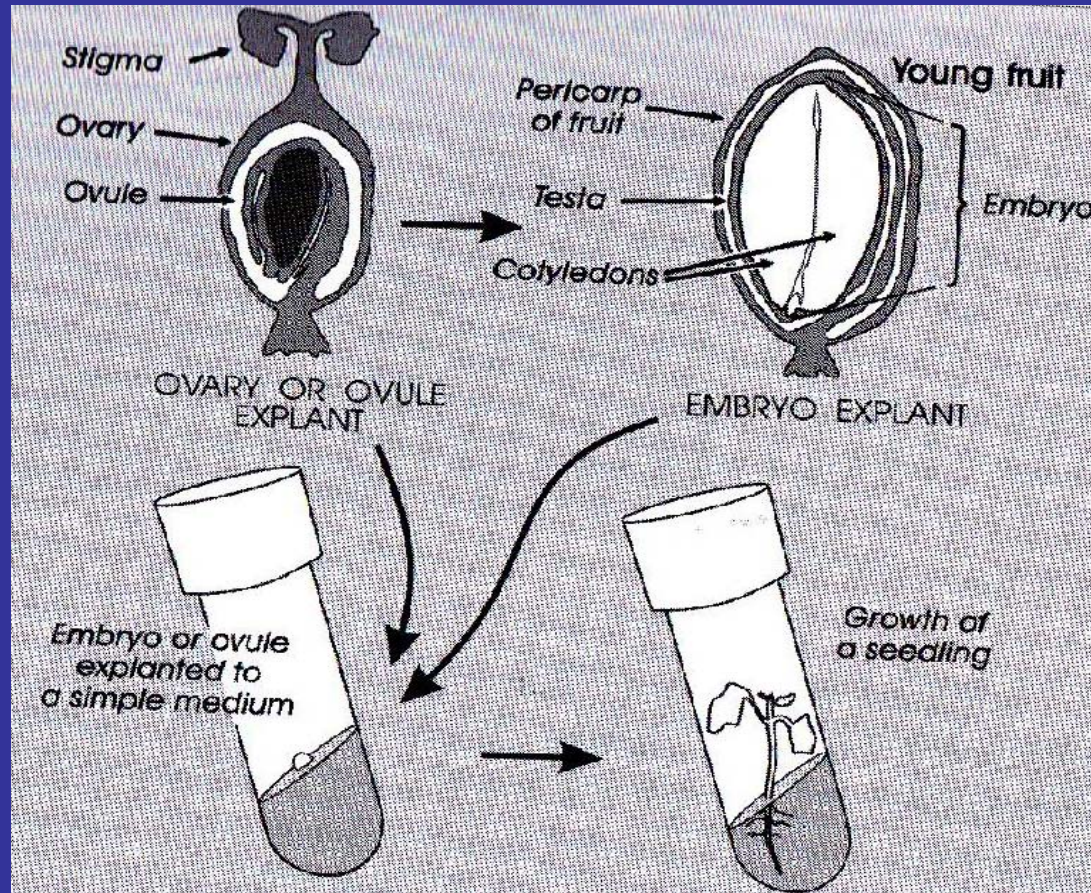
Cultivo de órganos indeterminados

Embriones

- **Cultivo de callo**
 - **Formación de plántula**
 - **Salvar dormición**
 - **Híbridos no viables**
 - **INCOMPATIBILIDAD PREZIGÓTICA**
 - No hay germinación polen/crecimiento tubo polínico
 - **INCOMPATIBILIDAD POSTZIGÓTICA**
 - Nutrición deficiente a partir del endospermo
- RESCATE DE EMBRIONES (EMBRYO RESCUE)**
- Hu and Sussex 1986**

Cultivo de órganos indeterminados

Ovario/ovulo



- Semillas de Orquídeas cultivadas *in vitro*
- Protocolo general de Yeung et al. (1981)

Cultivo de órganos indeterminados

- **Cultivo de raíces aisladas**
 - **Meristemo de la raíz principal o laterales**
 - **Indefinidos**
 - **Dormición en los meristemos**
 - **Acumulación de auxinas???**
- **Said and Murashige 1979**

Cultivo de órganos indeterminados

- **Cultivo de raíces aisladas**
 - Infecciones de nemátodos
 - Micorrizas
 - Fijación nitrógeno
 - Alta estabilidad genética
 - conservación germoplasma
 - Micropropagación
 - Tallos adventicios
 - Zelcer et al. 1983
 - Mudge et al. 1986
 - Tallos y/o embriones de callo
 - Conversión del meristemo radicular en caulogénico
 - Philip and Nainar 1986

Cultivo de células desorganizadas

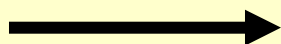
- **Callo**
- **Suspensiones celulares**
- **Células inmovilizadas**
- **Células aisladas**

6.1. Cultivo de callos

- **Cultivo de callos**
 - Herida
 - Insectos
 - Estrés
 - In vitro
 - Colocando un explanto con un balance hormonal adecuado
 - Reversión de la diferenciación y especialización celular previa
 - Formación de células parenquimáticas sin diferenciar
 - Regeneración: formación de planta a partir de callo

6.1. Cultivo de callo

- **Efecto de la lesión**
 - Cicatrización de heridas → **DIVISIÓN CELULAR**
 - Injerto
- **Aislamiento del tejido lesionado**
 - Inhibición de los mecanismos naturales que limitan las divisiones
 - Cultivo en medio nutritivo artificial (nutrientes y reguladores adecuados)
- **Cambios en la ultraestructura y metabolismo celular**
 - Incrementa la respiración celular (número de mitocondrias) y la actividad de enzimas glicolíticas
 - Desaparecen productos de reserva (gránulos de almidón)
 - Síntesis de RNA (aumenta el número de ribosomas y polirribosomas)



DESDIFERENCIACIÓN del tejido organizado

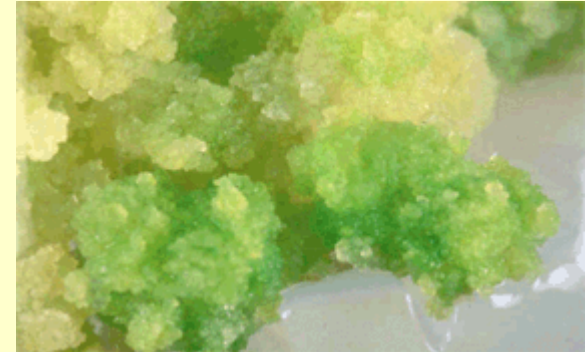
- **Material vegetal o Explanto**

- Parte de la planta de crecimiento rápido o en un estadio temprano de su desarrollo: hipocotilo, hojas jóvenes, embriones e inflorescencias inmaduros
- Pérdida de capacidad con la edad del explante. **-Diferencias epigenéticas.**

• **Meins (1986).** “Cada vez existen más evidencias de que los tejidos cultivados no son una página en blanco. Por el contrario, en ocasiones recuerdan de qué parte de la planta proceden y este recuerdo influye en la morfogénesis y en la estabilidad genética del cultivo”

- **Medio de cultivo**

- Sales minerales
- Vitaminas
- Reguladores del desarrollo (auxina/citoquinina)



- **Habitación**= Las células pueden ser cultivadas en ausencia del regulador (auxina o citoquinina). Otro ejemplo de diferencias epigenéticas.
- Explante próximo al ápice caular. Decece con la edad.
- Espontáneo o inducible. Alta frecuencia (no mutación).
- Fuente de carbono (sacarosa)
- pH=5.8
- Fotoperíodo

CELULAS CULTIVADAS



DESORGANIZACIÓN DEL METABOLISMO



**PESADILLA EN LA OBTENCIÓN DE
PRODUCTOS NATURALES A PARTIR
DE SUSPENSIONES CELULARES**

6.2. Cultivos celulares en suspensión

- Células y agregados celulares dispersos en un medio líquido.
- Se consiguen por transferencia de callos friables a medio líquido con agitación (90-150 rpm): aireación y dispersión. 20-75 ml medio/100-250 ml contenedor
- El incremento en material celular tiene lugar durante un período de tiempo. La dilución de un inóculo en el momento de mayor rendimiento en un volumen = inicial, permite realizar cultivos prolongados-BATCH CULTURES

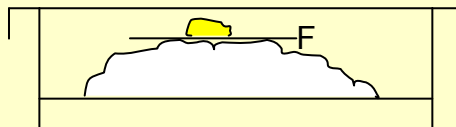
-Densidad mínima efectiva= cantidad mínima de inóculo por unidad de volumen de medio a partir del que puede crecer reproduciblemente un nuevo cultivo

($0.5-2.5 \times 10^5$ cells /ml) *** (4-6 divisiones) *** (18-25 días cultivo)

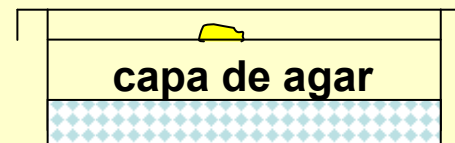
f (clon, historia de cultivo, composición del medio)

- » Cultivo nodriza
- » Cultivo condicionante

Monocotiledóneas recalcitrantes: arroz y maíz-



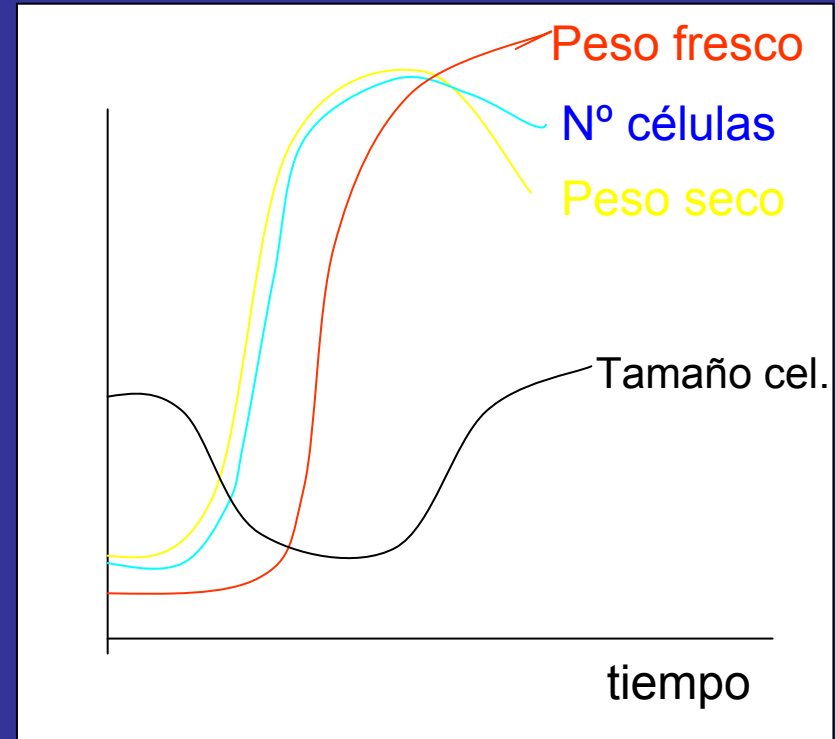
cultivo nodriza



cultivo condicionante

6.2.1. Fases del ciclo de crecimiento

- **FASE DE LATENCIA**
 - Preparación de la célula a la mitosis
 - Poder reductor y ATP
 - Oxidación de carbohidratos
 - Síntesis de proteínas
- **FASE DE DIVISION CELULAR**
 - Aumenta el nº de células
 - Retraso del aumento de tamaño de la célula (peso fresco)
 - Relación peso seco-nº células
 - Descenso del tamaño celular medio
- **FASE ESTACIONARIA**
 - Disminución de la tasa de división celular
 - Comienza la expansión celular
 - Síntesis de metabolitos secundarios



6.2.2. Tipos de cultivos celulares en suspensión

– Tipos

“Batch cultures”

1. Un volumen finito de medio durante todo el ciclo de cultivo
2. Cambio constante
 - Patrón de crecimiento celular
 - Metabolismo
 - Composición medio

$$dx/dt=ux \quad (u=\text{tasa de crecimiento (h}^{-1}\text{)})$$

$$u=1/x \cdot dx/dt$$

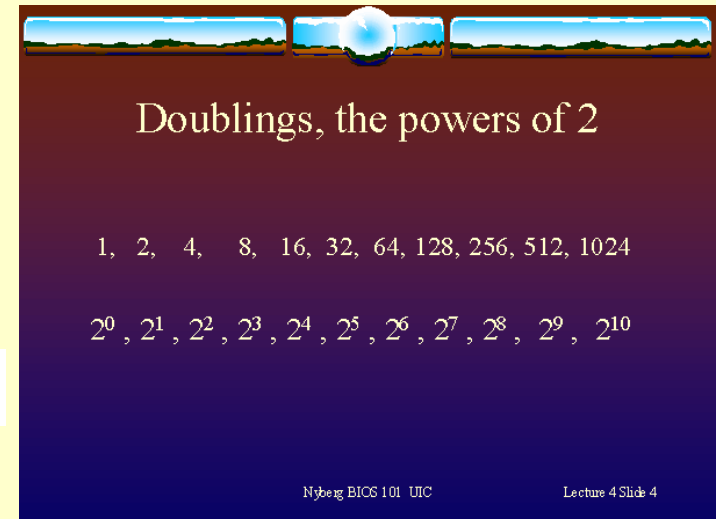
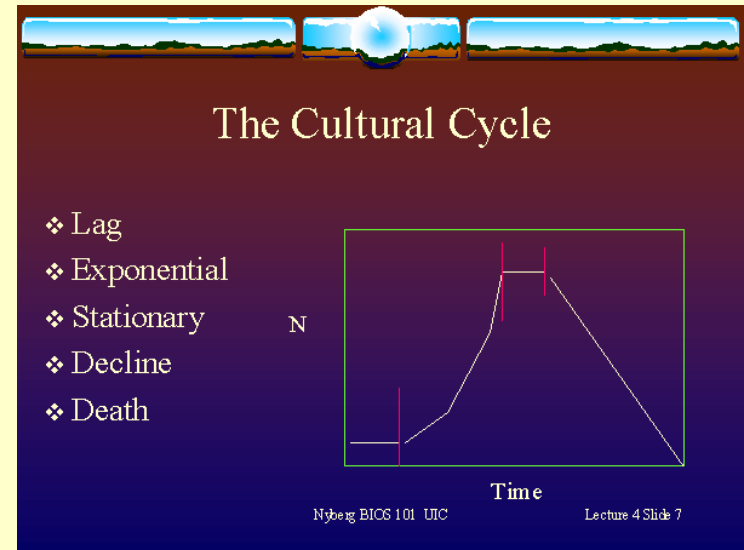
$$\int_{x_0}^x dx/x = \int_{t_0}^t u dt \quad \longrightarrow \quad \begin{array}{l} x_0 = \text{N}^\circ \text{ células a } t_0 \\ x = \text{N}^\circ \text{ células a } t \end{array}$$

$$\ln(x/x_0)=ut \quad \longleftrightarrow \quad X = X_0 e^{ut}$$

Para calcular $t_d = t$ que dobla la población celular

$$x=2x_0 / t= t_d$$

$$x/x_0 = e^{ut} \longrightarrow 2x_0/x_0 = e^{ut_d} \longrightarrow \ln 2 = ut_d \longrightarrow t_d = \ln 2/u = 0.693/u$$



6.2.3. Cultivos celulares en suspensión

Cultivos continuos

Se persiguen estados estables de crecimiento y metabolismo celular, a base de renovar el medio de cultivo.

– **Sincronización** y **Amplificación** de la respuesta celular.

- Cerrado: Entra medio y sale medio.

Se recuperan las células

- Abierto: Entra medio y salen medio y células
 - » Quimiostatos. Flujo continuo.-Nutriente limitante
 - » Turbidostatos. Flujo intermitente.-Turbidez



6.2.4. Células inmovilizadas

- **Se emplean en la obtención de metabolitos secundarios de interés.**
- **Se trata de cultivos de agregados multicelulares, sostenidos por algún tipo de sustrato biológicamente inerte.**
- **Existen dos técnicas de uso habitual:**
 - **Imbibición: las células están embebidas en un gel polimérico**
 - **Alginato cálcico, agar, agarosa**
 - **Atrapamiento: las células están inmovilizadas en espumas o mallas preformadas o sistemas de membrana de fibra hueca.**
 - **Acetato de celulosa (fibra)**
 - **Policarbonato de silicona (fibra)**
 - **Poliuretano reticulado (espuma)**

6.2.5. Cultivos de células aisladas

Técnicas de cultivo

- **Plating en medio semi-sólido (Bergman, 1960)**
 - A. Suspensión de células en medio líquido, a una densidad doble de la deseada en la placa.
 - B. Medio con agar disuelto (0.6-1%) y mantenido a $T^a=35^{\circ}\text{C}$
 - Mezclar A y B y distribuir uniformemente en placa Petri, una capa de medio de cultivo de 1 mm de espesor.

$$PE = \frac{\text{N}^{\circ}\text{colonias/ placa}}{\text{N}^{\circ}\text{ células /placa}} \times 100$$

- **Separación mecánica**
 - Colman et al. 1979
 - Schwenk (1980,1981)
- **Separación enzimática**
 - Pectinasa
 - polygalacturonasa
 - Dow and Callow (1979)

6.2.6. Aplicaciones de los cultivos celulares

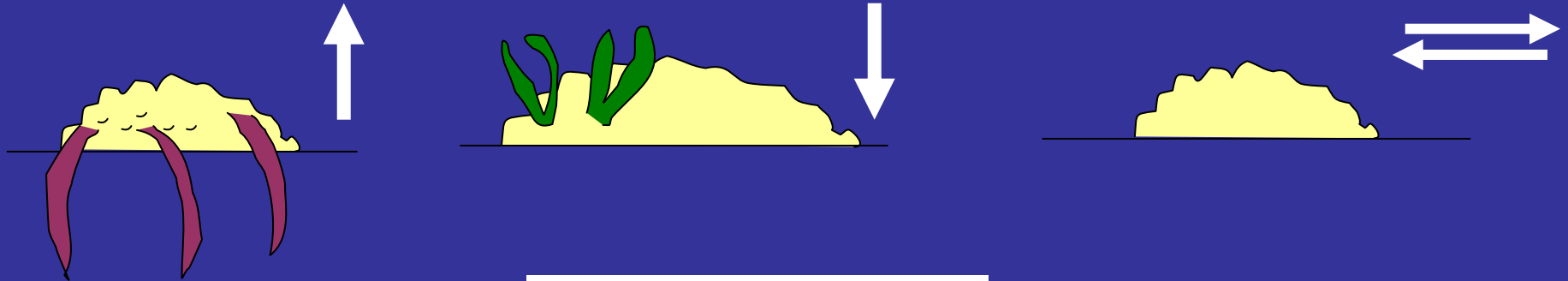
- Selección de mutantes**
- Industrial**
 - Producción de metabolitos secundarios**
 - Biotransformación**
- Inducción de poliploidía**

6.2.7. Citodiferenciación en cultivos celulares

- **Formación de traqueidas**
 - Estados iniciales del desarrollo de tallo
- **Diferenciación de plastos**
 - Amiloplastos
 - Cloroplastos (asociado con morfogénesis)

6.3. Manipulación del crecimiento y diferenciación *in vitro*

Skoog & Miller (1957)

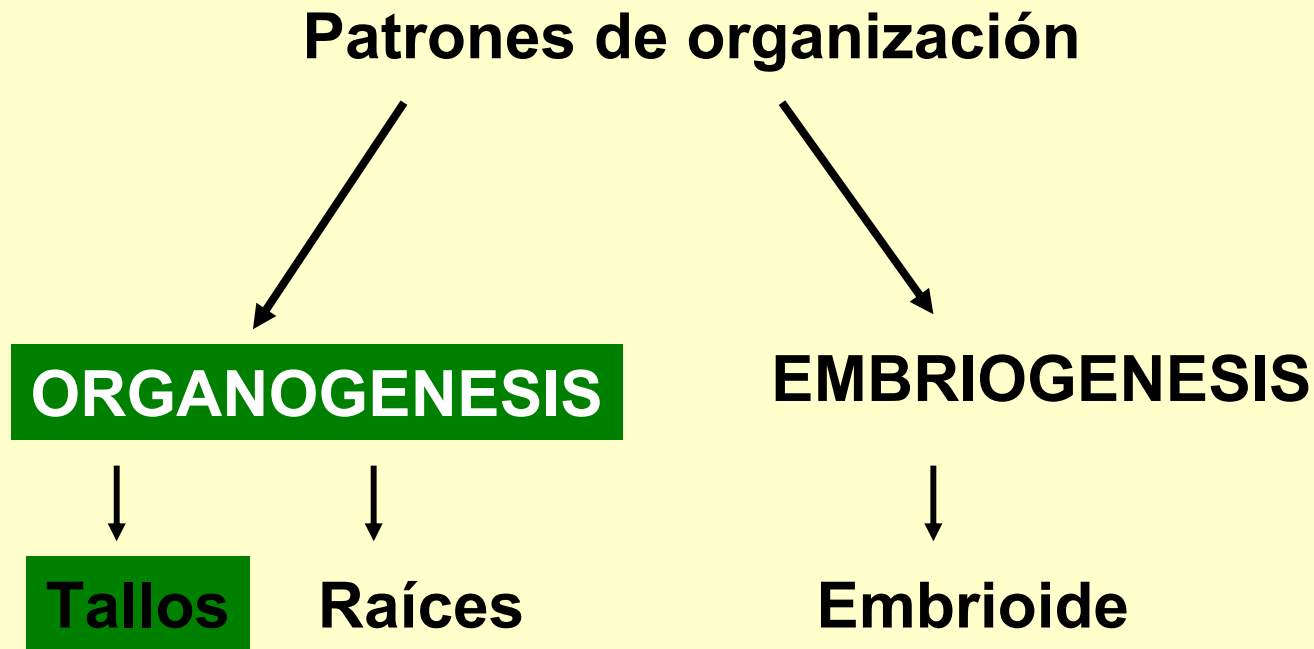


Auxina /Citoquinina

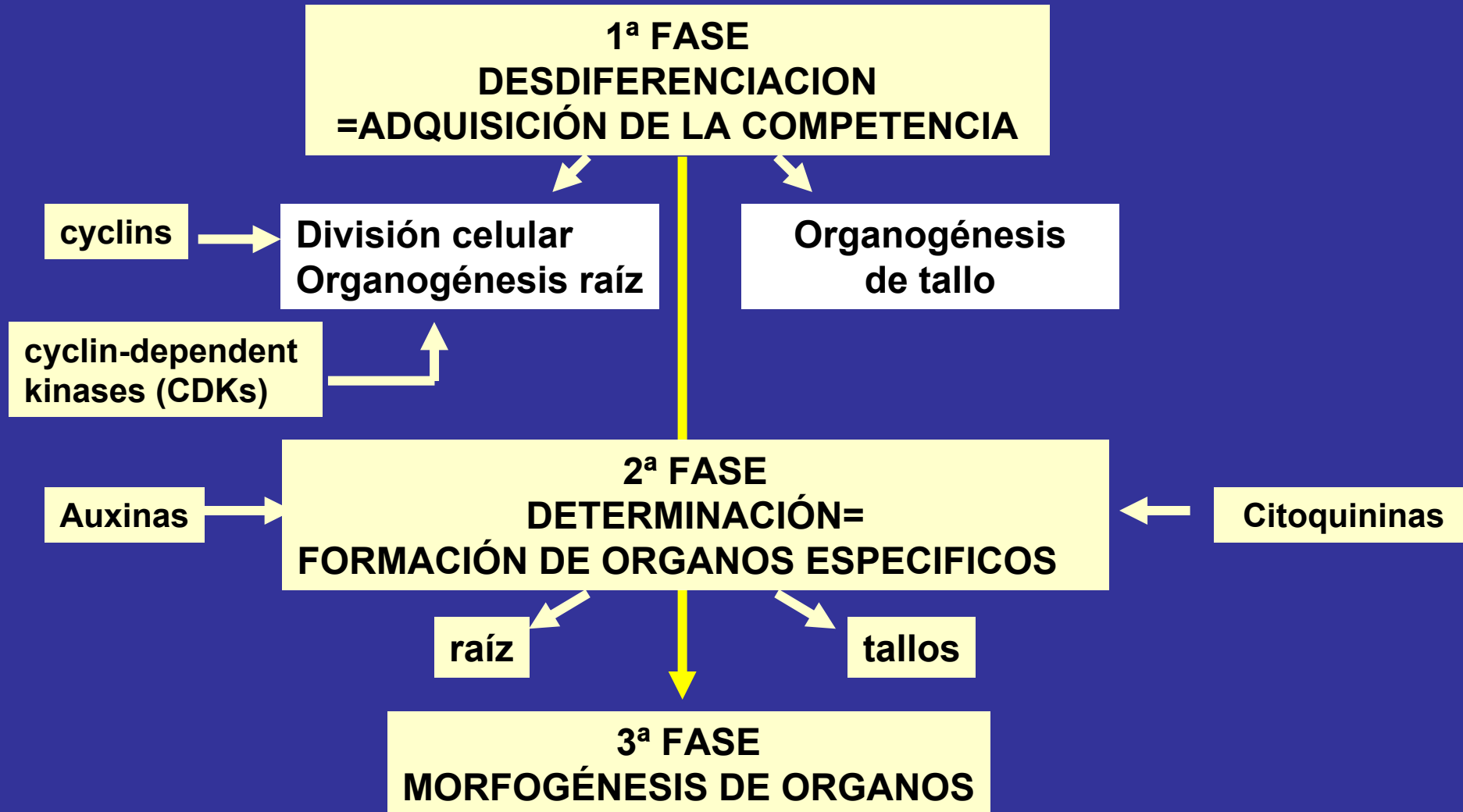
LOS EXPERIMENTOS DE LA CAPA FINA DE Tran Thanh Van. Thin layer

- 1-7 capas de células de tallo y hoja
- Inducción de división celular y organogénesis en las células epidérmicas (tallo, raíz, floral)
 - a) Seguimiento del desarrollo organogénico a partir de una célula
 - b) La ausencia de tejido vascular y cambium reduce el efecto materno

6.3.1. Patrones de organización estructural



6.3.2. Organogénesis *in vitro*

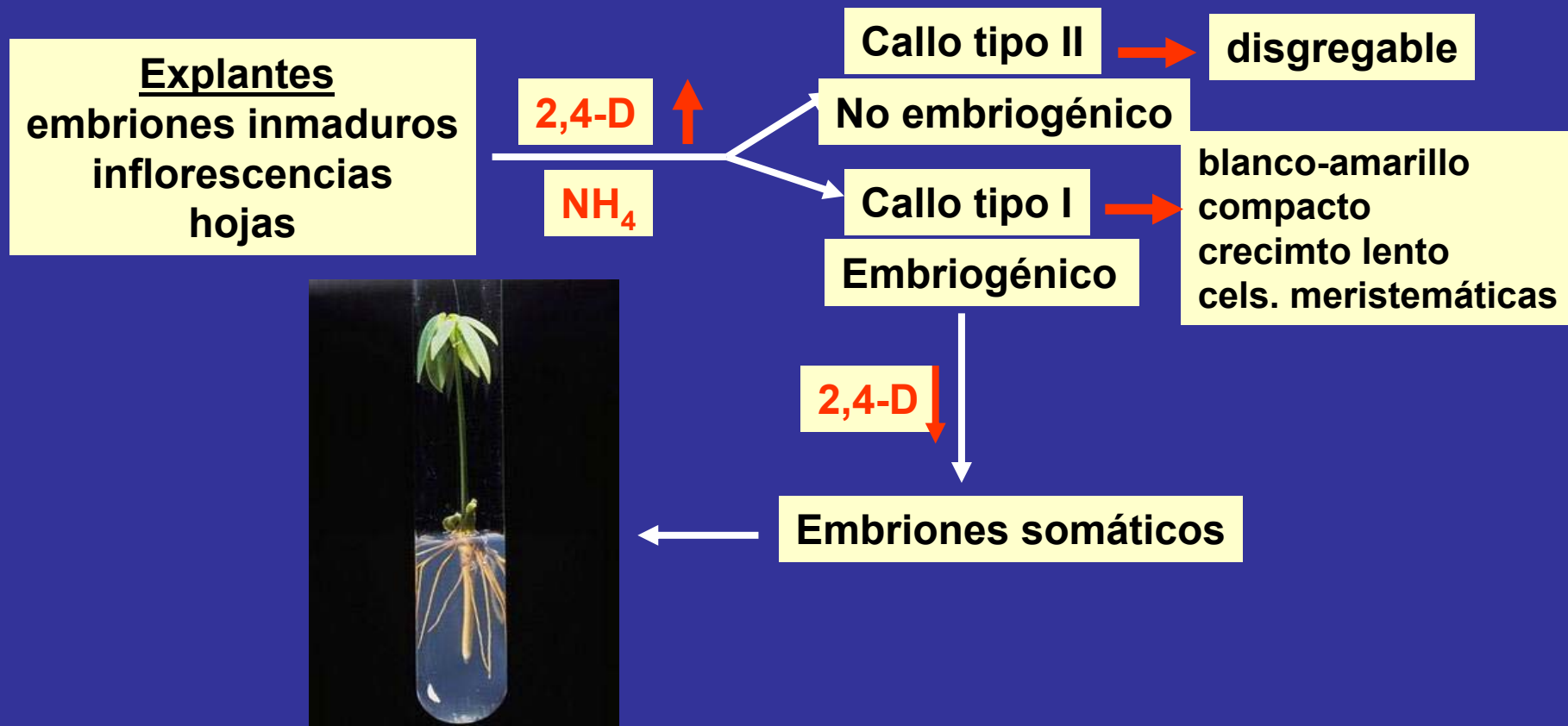


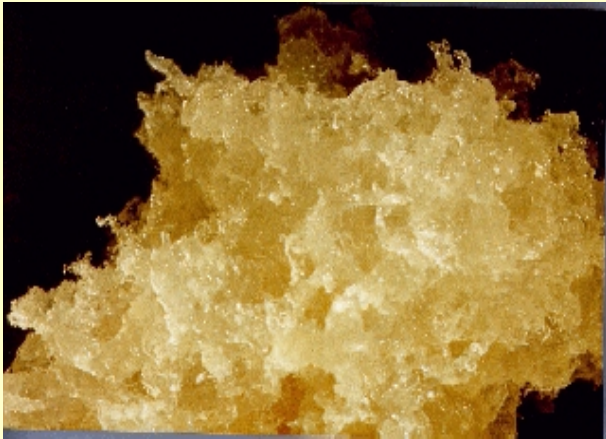
6.3.3. Embriogénesis somática

Especialmente importante en gramíneas (cereales)

- falla el método clásico de Skoog & Miller (1957)

- ver Vasil (1987). Journal of Plant Physiology (1987)

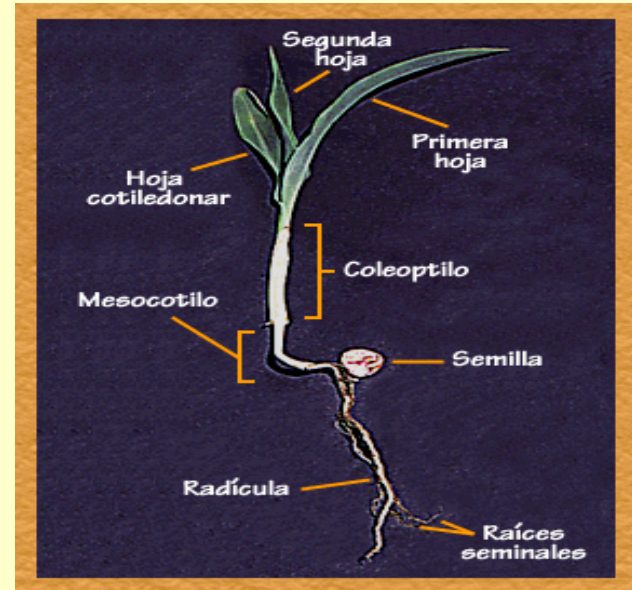




SEEDLING



plántula



plántula de maíz