

TEMA 5

MICROPROPAGACIÓN

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

❖ Rescate de embriones

❖ Cultivo de anteras y microsporas

- Obtención de haploides

❖ Cultivo de protoplastos

- Híbridos somáticos

Producción industrial de compuestos de interés

Propagación

- **Sexual**
 - **Semilla**
- **Asexual**
 - **Soma**

Propagación a partir de semillas

- **Producidas en gran número**
- **Susceptibles de almacenamiento**
- **Saneadas respecto a los parentales**
- **Genotípicamente heterogéneas, excepto:**
 - **Líneas homocigotas autóгамas**
 - **F1 del cruce de dos líneas homocigóticas**
 - **Apomixis**

Propagación vegetativa

- **Mejoras de las técnicas tradicionales:**
 - Evitar la desecación de la estaquilla
 - Composts que favorecen el enraizamiento
 - Control de la temperatura en la zona de enraizamiento

Micropropagación

Definición

Método de propagar plantas usando partes muy pequeñas de ésta, que se desarrollan en cultivos estériles.

Aplicaciones

- Propagación clonal comercial
- Producción de planta sana: cultivo de meristemos
- Almacenamiento de germoplasma: crioconservación

Macropropagación o micropropagación?

- **Ejemplo con patata**
 - **Semilla para obtener nuevas variedades**
 - **Micropropagación**
 - Producción de planta
 - Obtener planta sanas
 - **Macropropagación a partir de tubérculos**
 - Suministro de material para cultivo

Ventajas y desventajas de la micropropagación

Ventajas

- Pequeña necesidad de espacio
- Cultivos asépticos
- Certificación de ausencia de virus
- Condiciones controladas y reproducibles
- Producción continua
- Menor espacio de invernadero
- Plantas en stock (ortets)
- Amplio espectro de especies
- Características deseables
- Mecanización
- Menor laboreo

Desventajas

- Instalaciones muy especializadas
- Personal especializado
- Contaminación
- Protocolos no estandarizados
- Menor tamaño de las plántulas
- Transición heterotrofía/autotrofía
- Inestabilidad genética???
- Costes: producción a gran escala y con valor añadido

Etapas en la micropropagación

Estado O. Selección y preparación de la planta madre

- Elección de plantas vigorosas y sanas
- Puede ser necesaria la detección/eliminación de virus

Estado I. Establecimiento de cultivos asépticos

- Esterilización en superficie y transferencia de los explantes al cultivo

Estado II. Multipliación

- Multipliación de estructuras capaces de dar lugar a plantas intactas con los procedimientos adecuados
- Los cultivos podrán reciclarse varias veces para obtener las tasas de crecimiento necesarias

Estado III. Preparación para la transferencia

- Formación de raíces por parte de los tallos (a veces se transfieren directamente)

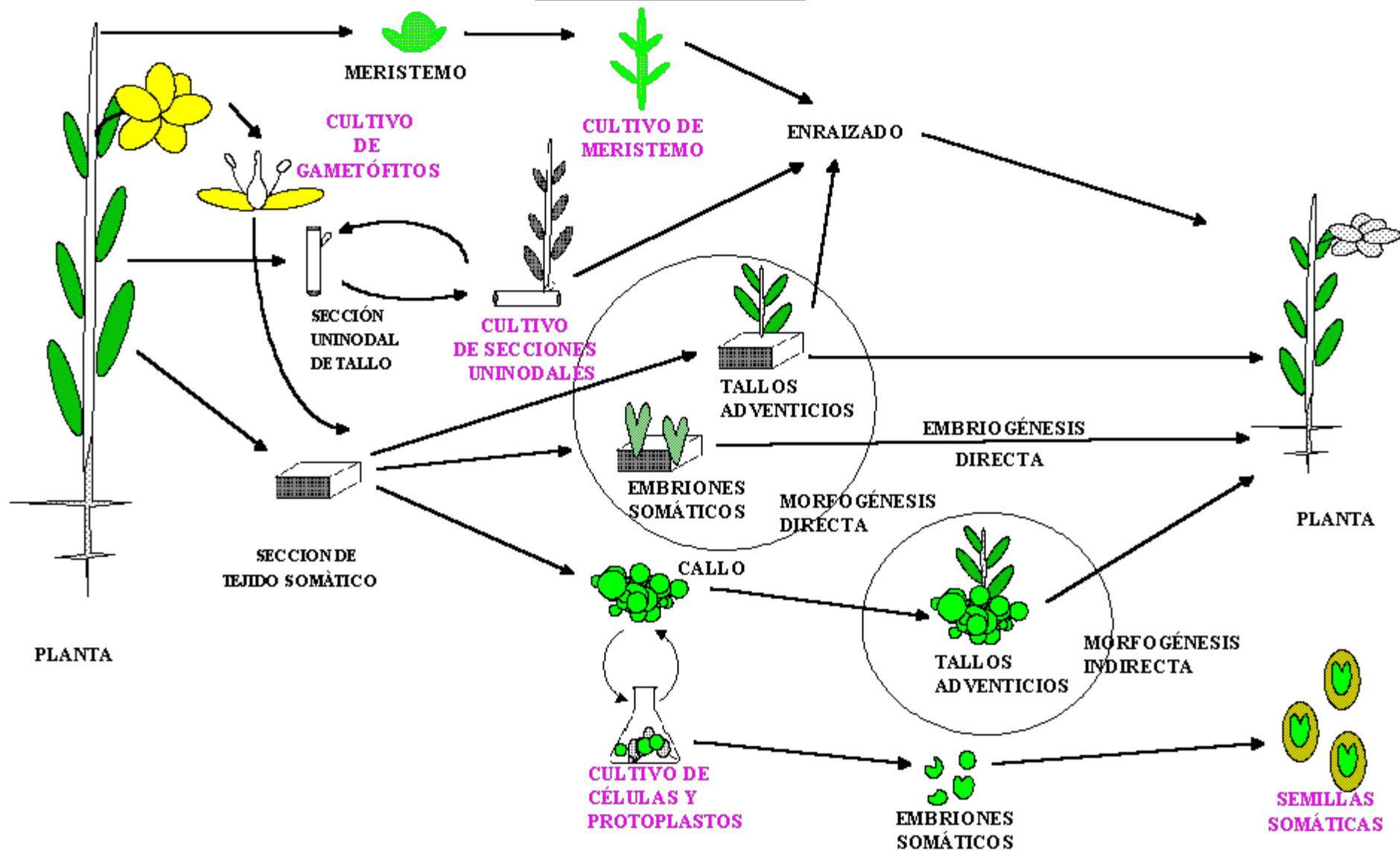
Estado IV. Transferencia al medio natural

- Lavado del agar de las raíces, transferencia a un medio estéril de enraizamiento
- Aclimatación

Principales métodos de micropropagación

- 1. -Formación de tallos a partir de yemas axilares**
- 2. -Organogénesis directa**
- 3. -Organogénesis indirecta**
- 4. -Formación de propágulos vegetativos**
- 5. -Microinjerto**

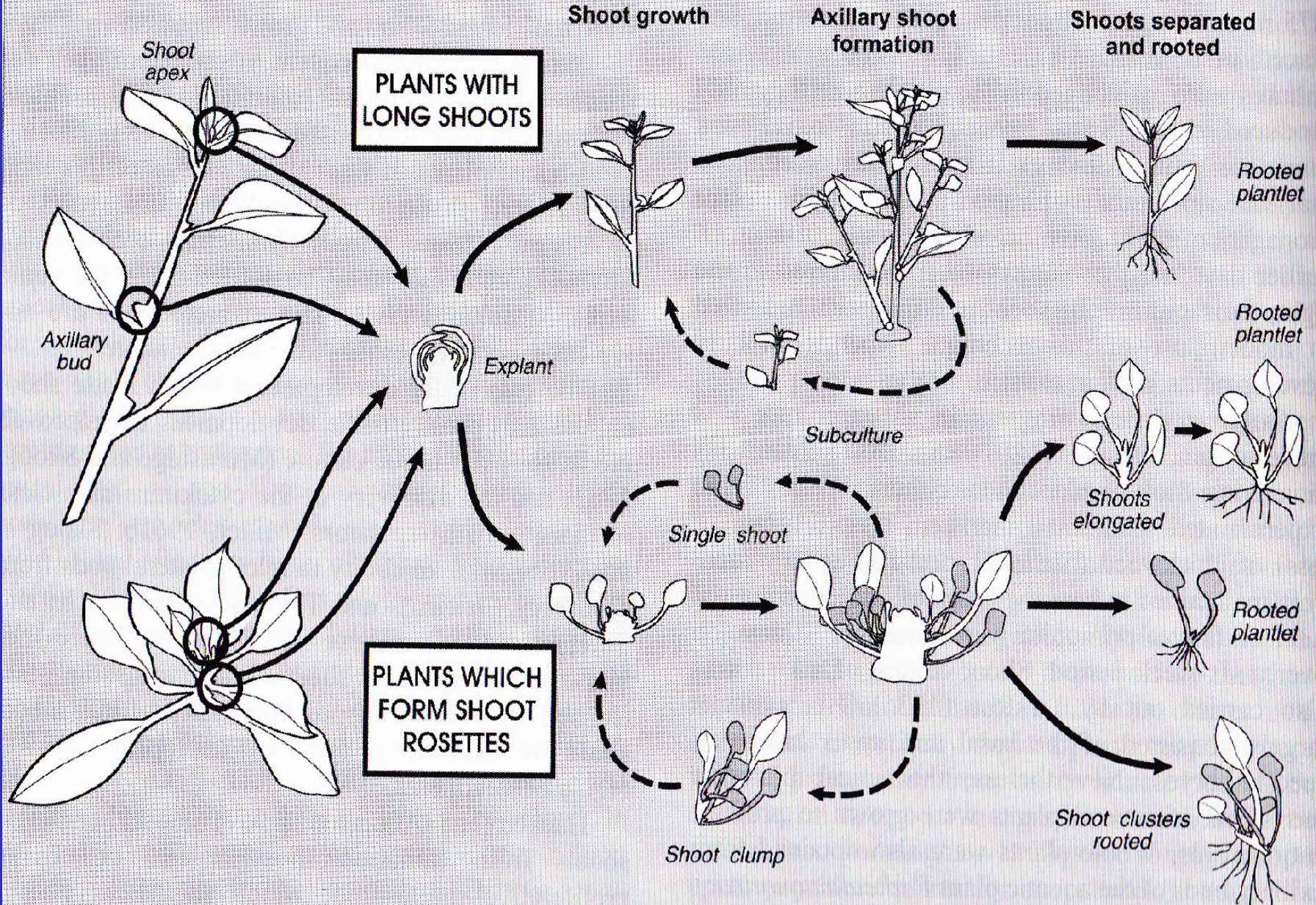
EXPLANTES



1. Formación de tallos a partir de yemas axilares

- **Shoot culture (Meristemos caulinare)**
- **Cultivo de segmentos nodales**

Shoot culture



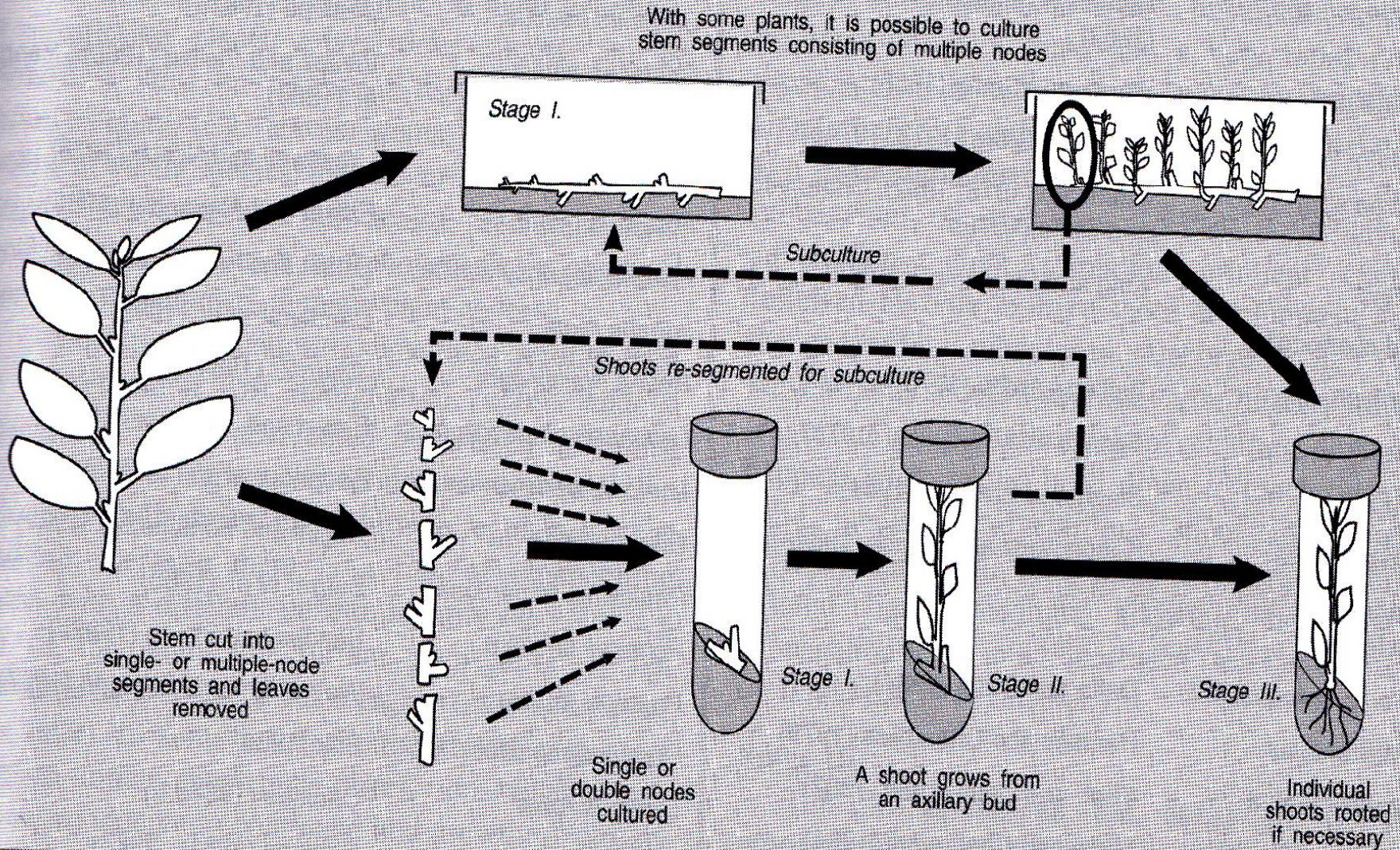
Crecimiento y proliferación de tallos axilares

- **Citoquininas y dominancia apical**
- **Posición horizontal**

Atención al origen de los tallos!!!

- **Meristemático**
- **Adventicio**
- **Callo**

Cultivo de segmentos nodales



Algunas características

ELEVADAS TASAS DE MULTIPLICACION

En fresa se han descrito tasas de multiplicación de 15^6 - 25^6 plantas por año a partir de una planta madre

ESTABILIDAD GENÉTICA

Las células de la yema son uniformemente diploides y son menos susceptibles de sufrir cambios genotípicos durante el cultivo

Método true-to-type

***Las plantas quiméricas se perpetúan mejor con este método

Otros métodos

- **Tallos a partir de semillas**
- **Tallos a partir de meristemos florales**

2. Organogénesis directa

- **Caulogénesis adventicia**
- **Embriogénesis directa**

Tallos adventicios

- Es la formación de tallos a partir de estructuras que no contienen meristemos axilares o apicales.**
- Entre ellos se incluyen: tallo, bulbos, tubérculos, rizomas, hojas, raíces, etc.**
- Los niveles de fidelidad del material propagado no son tan altos como en los casos anteriores**

Embriogénesis directa

-Es la formación de estructuras bipolares o embrioides a partir de:

- tejidos embrionarios (óvulos, nucela, embriones zigóticos, embriones somáticos...)**
- plántulas muy juveniles (hipocotilo y cotiledones)**
- otros materiales**

-Ocurre de forma natural en cítricos: APOMIXIS

-No se obtienen tasas altas de propagación

3. Organogénesis indirecta



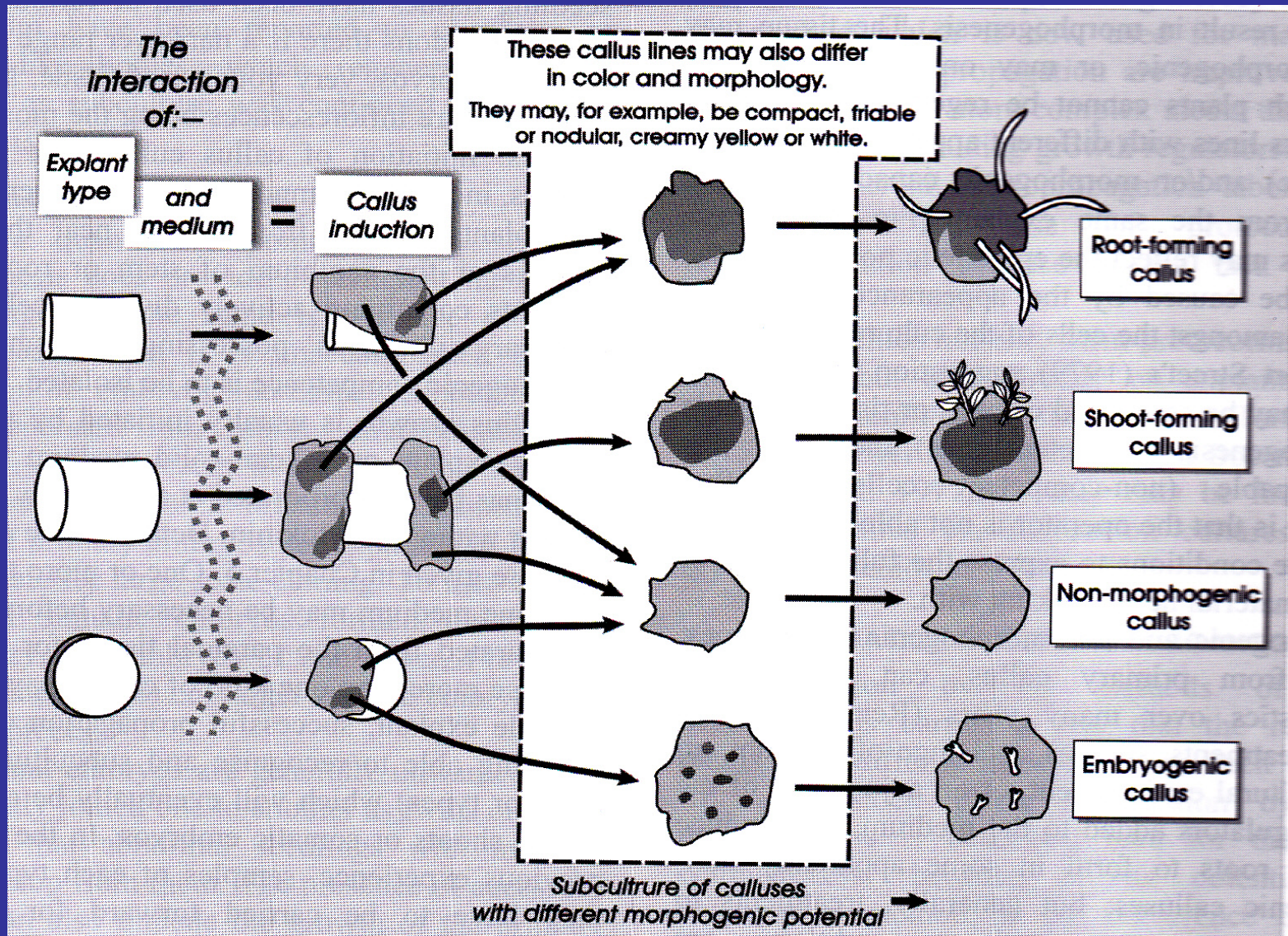
Multiplicación a través del cultivo de calo= INDIRECTA

-Se considera de menor valor la micropropagación obtenida de este modo, debido a la alta incidencia de anomalías cromosómicas producidas como aneuploidías o poliploidías.

Sin embargo, a pesar de ello, en la propagación de especies importantes económicamente, como cereales, legumbres forrajeras, árboles y palmas tropicales, no se puede evitar la embriogénesis y organogénesis indirecta.

-Existen referencias de cultivos regenerativos de callos estables, seleccionados a partir de sectores organogénicos o embriogénicos de callos.

Callo con diferentes capacidades morfogénicas



Embriogénesis somática indirecta

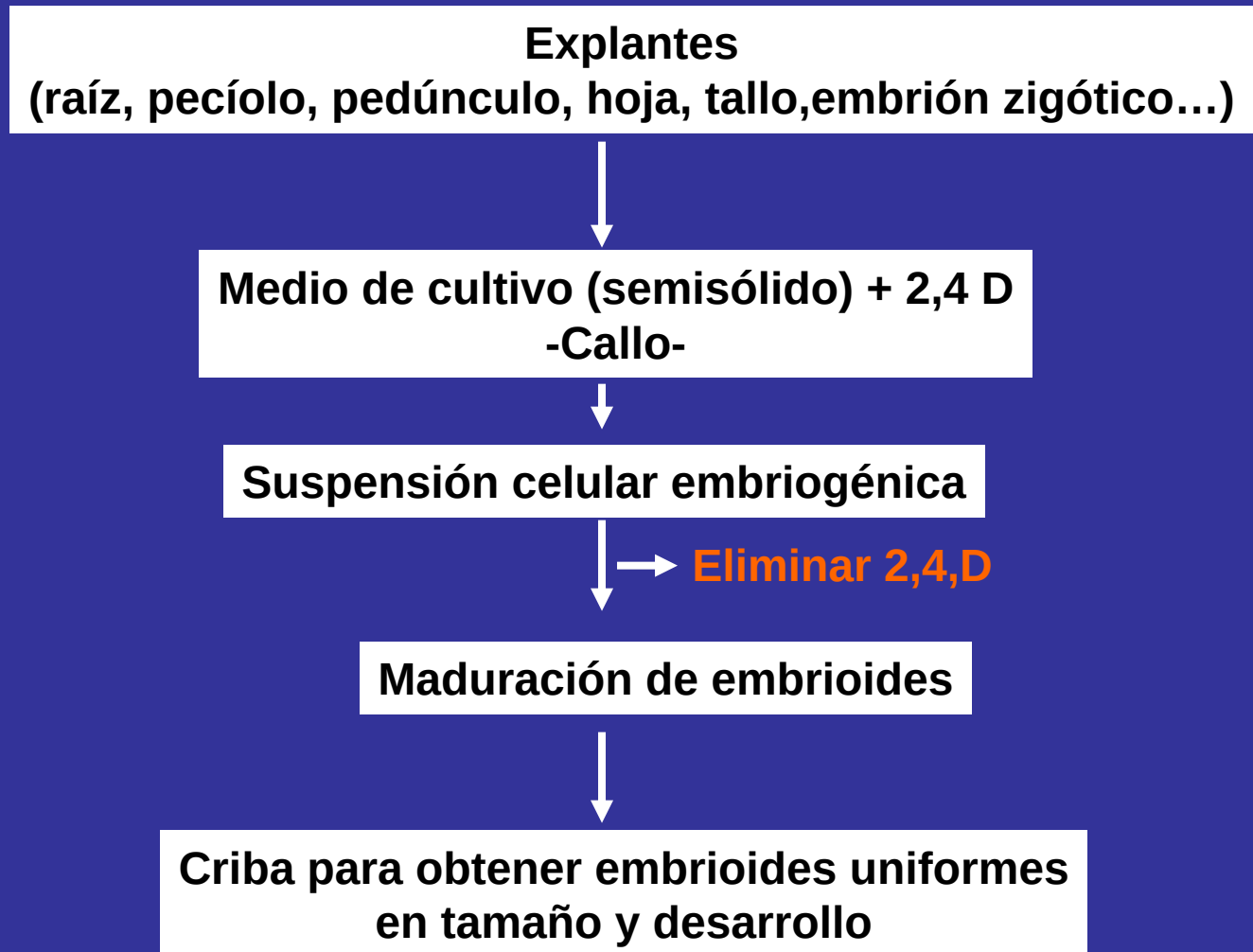
Se observaron por vez primera en zanahoria y se piensa que se puede inducir en cualquier especie.

- Producción de un alto nº de plantas en un volumen muy pequeño (10^5 /g. tejido).
- Posibilidad de sincronizar la inducción.
- Criba del medio para obtener embriones de tamaño y desarrollo uniforme.
- Posibilidad de manipulación de las suspensiones para ser transferidas de un cultivo a otro y así aplicar tratamientos selectivos para el desarrollo de los embrioides y la germinación de plántulas.
- Imposición de la dormición en los embrioides y así crear semillas artificiales que podrán ser finalmente sembradas.

- Importancia de la auxina para la inducción y su ausencia en la maduración
- Aporte de nitrógeno, como coadyuvante de la embriogénesis y el azúcar.
- Adición de ABA para evitar la germinación precoz y la embriogénesis secundaria, contribuyendo a normalizar el desarrollo del embrión.

Embriogénesis somática indirecta a partir de suspensiones celulares

-Protocolo-



Semillas artificiales

-Para el tratamiento en masa en especies de interés agrícola, se persiguen poblaciones de embrioides sincronizadas, uniformes y altamente viables.

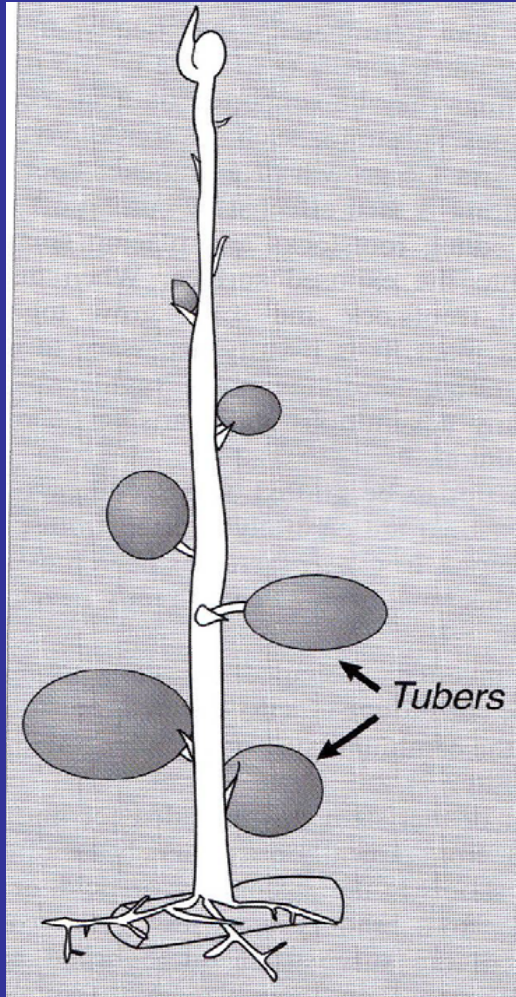
Producción de semillas artificiales

•Los embrioides para ser encapsulados en una matriz de alginatos, son sumergidos, cubiertos en alginato sódico y solución nutritiva, en una disolución de CaCl_2 50 mM. El calcio induce la formación de bolas de alginato que contienen los embrioides.

•Se pueden deshidratar los embrioides encapsulados y almacenarlos.

•Aplicado en alfalfa, apio, coliflor...

4. Formación de propágulos vegetativos



Los tubérculos de patata se forman *in vivo* subterráneamente, a partir de estolones.

In vitro, se forman en medios ricos en citoquininas, en oscuridad, a partir de yemas axilares de los tallos.

5. Microinjerto

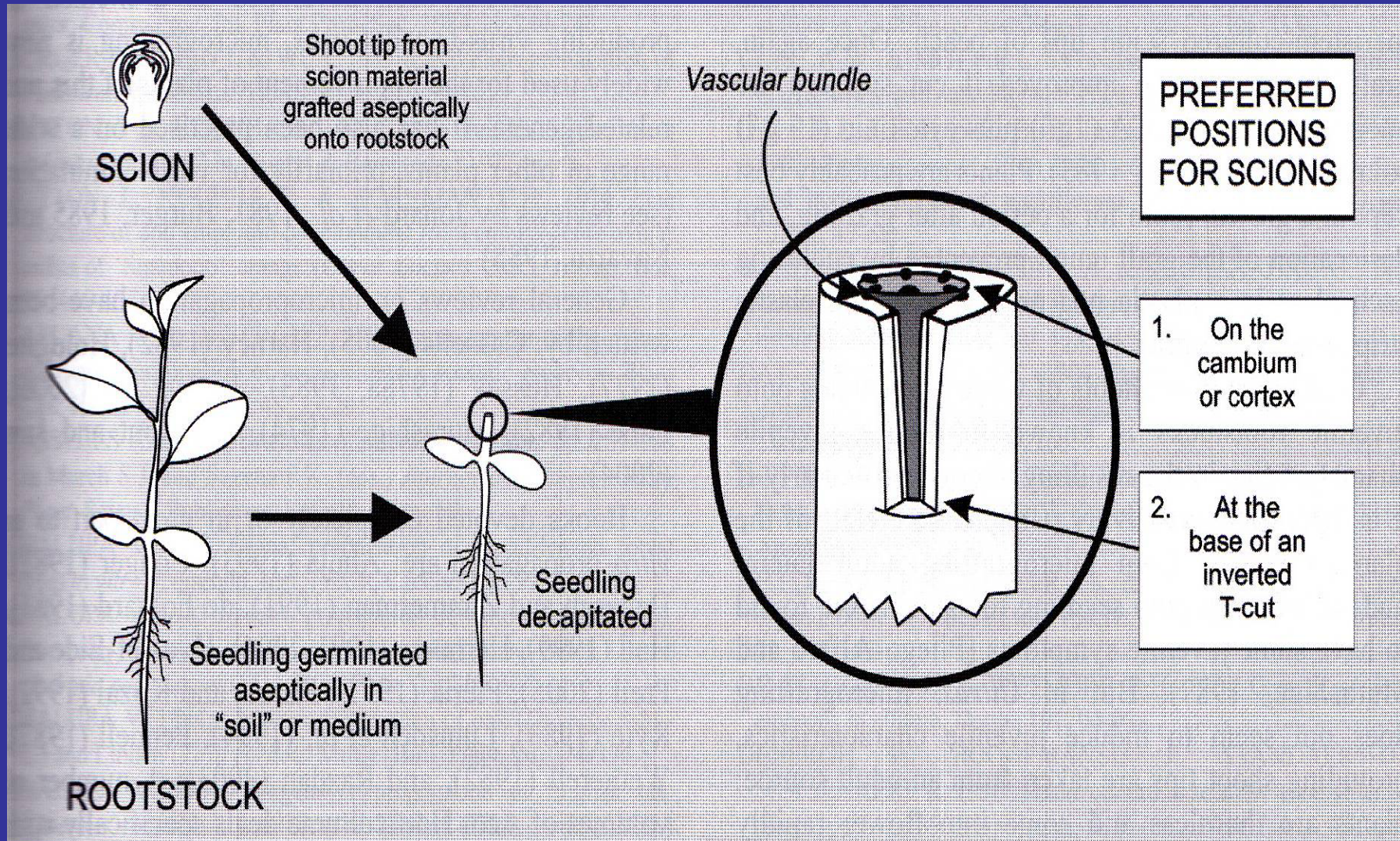


Fig. 2.7 Preferred positions for placing a shoot tip scion in the micrografting of *Citrus* [after Navarro *et al.*, 1975].

5. Microinjerto

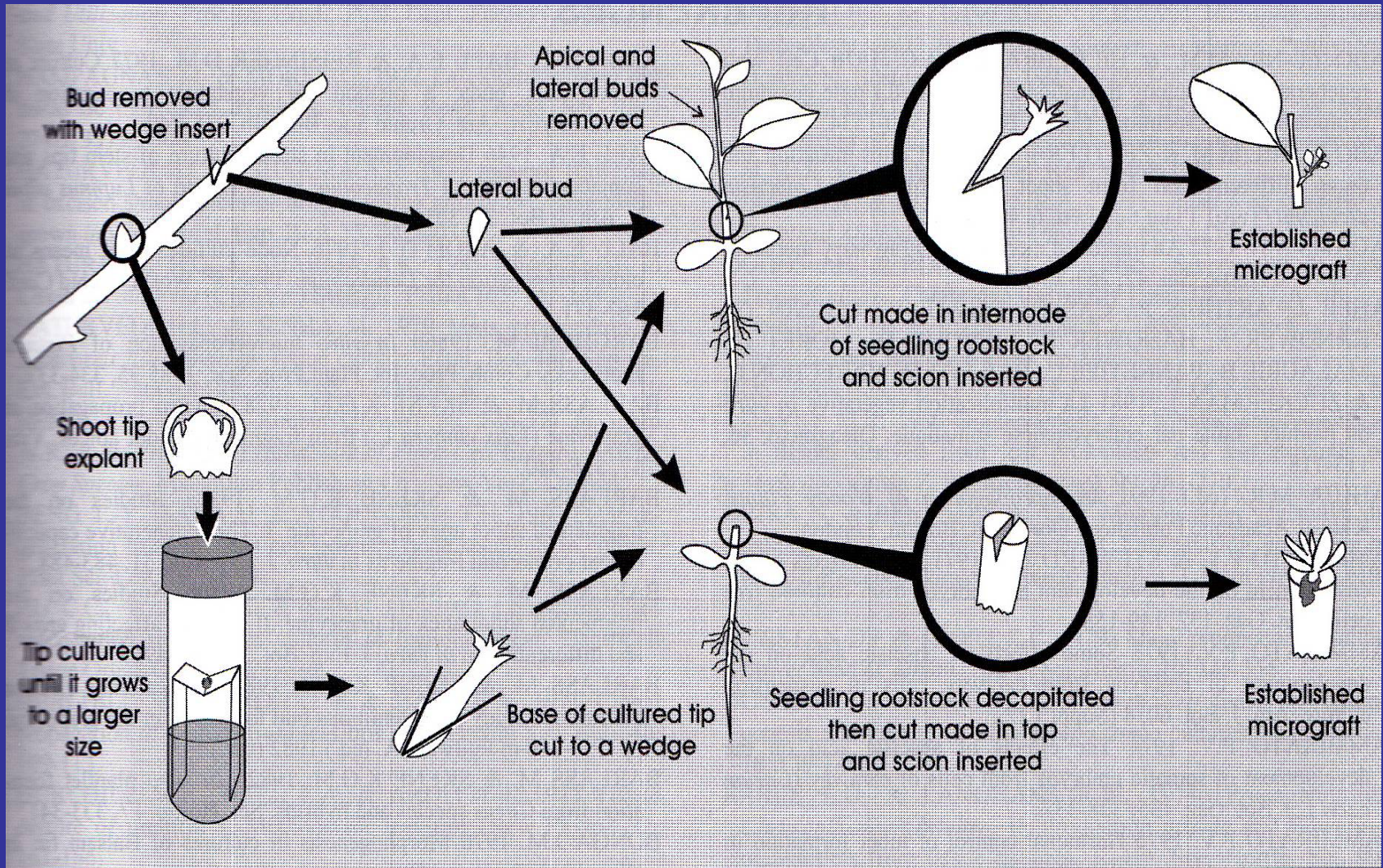


Fig. 2.8 Two alternative methods of micrografting with large scions [after Pliego-Alfaro and Murashige, 1987; Navarro, 1988].

Factores que afectan a la morfogénesis y a la tasa de proliferación

Estado fisiológico de la planta donadora de explantos

- estado de crecimiento activo
- mecanismos naturales de propagación vegetativa

Genotipo

Ambiente:

- medio de cultivo
- factores externos: luz, temperatura,

Problemas técnicos

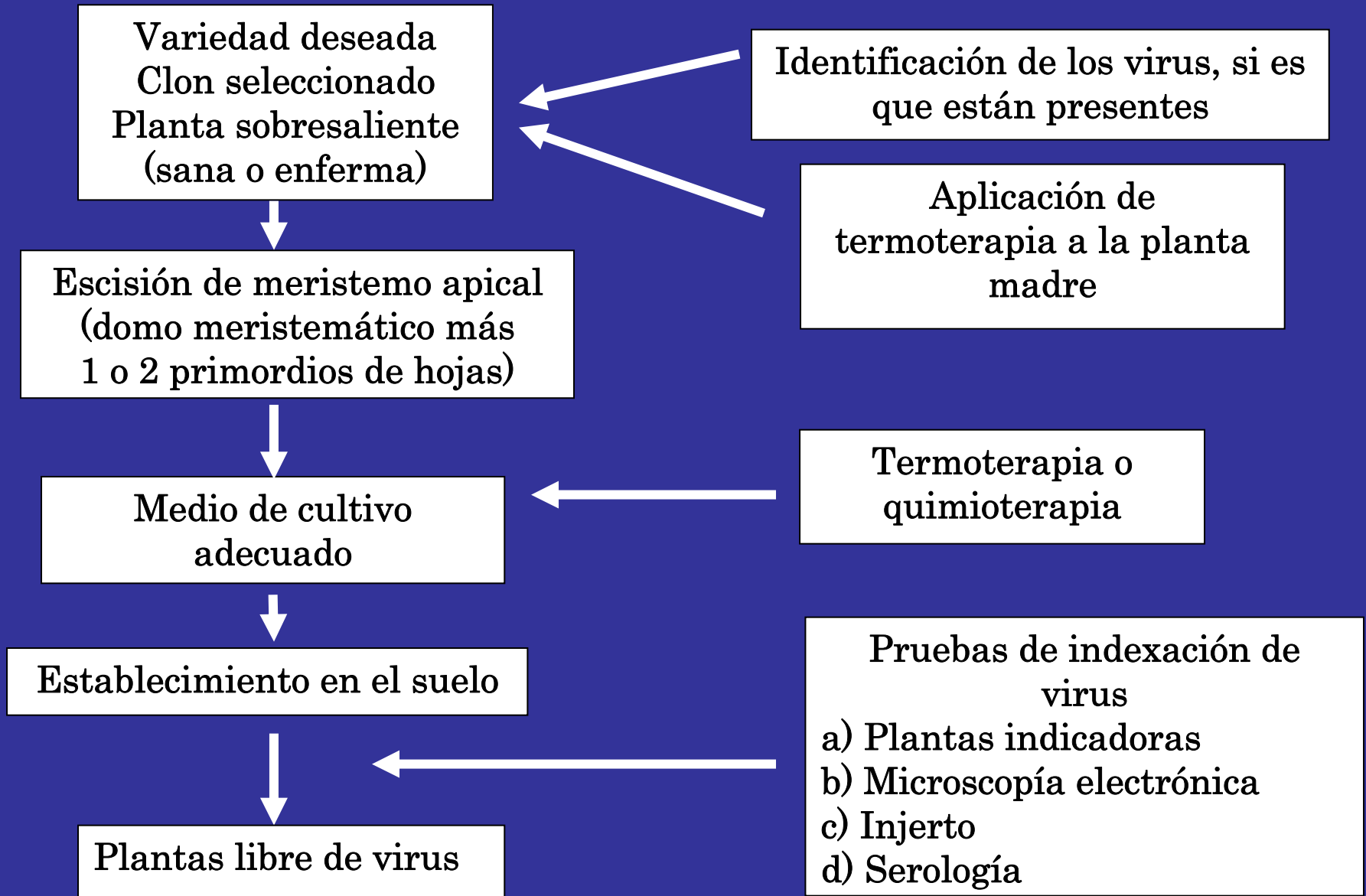
- contaminación
- exudación de compuestos inhibidores
- pérdida de competencia

Producción comercial plantas

EMPRESAS DE CULTIVO IN VITRO



Producción de planta sana-Cultivo de Meristemos-



Almacenamiento de germoplasma



-In situ



-Ex situ

Jardín Botánico

Banco de semillas

In vitro

Crecimiento ralentizado

Crioconservación

Precultivo

Congelación

Descongelación

Crioprotección

Almacenamiento

Recuperación

-196°

