

# Regeneración *in vitro* y aplicaciones a través del cultivo de células y tejidos vegetales

*In vitro* regeneration and applications of cell and tissue culture

M. JORDAN

Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

Plant cells by means of their totipotency and aided by *in vitro* culture techniques can be induced to perform morphogenesis leading to somatic embryoids and massive clonal multiplication; microspores or pollen can be triggered to recover haploid plants, then characters expressed via haploidy can be selected and fixed. Protoplasts from different species can lead to recombinations. We report here work done on *Carica pubescens*, where somatic embryoids were obtained from cells; in *Prunus avium* androgenesis leading to pollen calli was triggered, while plants were recovered from *Nicotiana tabacum* anthers. Fusion products were obtained using *C. pubescens* and *C. papaya* protoplasts, leading up to calli and shoots.

Bajo condiciones de cultivo *in vitro*, células vegetales meristemáticas o diferenciadas pueden ser inducidas a modificar sus programas ontogénicos preestablecidos, iniciando procesos de reembrionalización y de regeneración de plantas en forma clonal, masiva y rápida. La totipotencialidad inducible en células y tejidos vegetales hace factible aplicar diferentes biotecnologías permitiendo, entre otras, la disponibilidad de nuevo germoplasma mediante la regeneración de plantas directamente a partir de gametos (microsporas y/o megasporas); la hibridización somática, mediante la fusión de células (intra o interespecies, frecuentemente incompatibles); la introducción de ADN-foráneo y la selección temprana de material con características deseables. Mientras la regeneración *in vitro* de plantas a través de polen (androgénesis) permite la expresión de cambios o recombinaciones producidas durante el *crossing-over* con la generación inmediata de material haploide y la obtención de sus respectivos diploides homocigotos en una sola generación, la fusión somática de protoplastos asume una recombinación génica nuclear y/o citoplasmática, permitiendo la obtención de nuevos genotipos no producibles en la naturaleza por cruzamientos espontáneos o inducidos. En la práctica, ambas biotecnologías entregan un gran potencial de regeneración de nuevas plantas de selección y de amplificación de genes vinculados con resisten-

cias, vigor y muchos otros caracteres deseables, especialmente en cultivos (Narayanawamy and George, 1982; George and Sherrington, 1984; Gleba and Sytnik, 1984). En este trabajo se muestran potencialidades regenerativas *in vitro* existentes en polen, suspensiones celulares y protoplastos en especies del género *Prunus*, *Carica* y *Nicotiana*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios de desarrollo de microsporas se condujeron cultivando anteras de *Prunus avium*, *Nicotiana tabacum* y *Carica pubescens*. Se usó preferencialmente el medio de Nitsch y Nitsch (1969) incluyendo las fitohormonas ac. naftalenacético (ANA) en concentración de 0,0-10,0 mg/l y de bencilaminopurina (BA) en rangos de 0,0-1,0 mg/l. Las anteras se sembraron en tubos colocándolas previa esterilización en hipoclorito comercial al 2% sobre un puente de papel cromatográfico Whatman N° 1 en contacto con el medio nutritivo líquido igualmente esterilizado en autoclave a 121°C por 20 minutos. Previo al cultivo se detectó para cada especie el estadio de desarrollo del polen, mediante un macerado con orceína acética o cortes histológicos, eligiendo la condición de microspora uninucleada por ser ésta la que presenta un mayor potencial morfológico *in vitro* en la mayoría de las especies estudiadas.

Para el cultivo de suspensiones celulares y de protoplastos de las especies del género *Carica* se empleó el mismo medio indicado anteriormente, solidificando con agarosa al 0,4% usando combinaciones de las hormonas ANA, BA, 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), Z (zeatina) e IPA (isopentiladenina), todos de la marca Sigma. Las células

y/o protoplastos fusionados se sembraron luego en placas para lograr una densidad de  $10^4$ - $10^5$  células/ml aprox. En algunos tratamientos los cultivos celulares se cultivaron paralelamente con un explante de callo de aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup>, colocando en el centro de la placa (tejido nodriza) con el objeto de condicionar o gatillar respuestas morfológicas de las células en suspensión. Las células de *C. pubescens* se obtuvieron por suspensión (agitador recíproco Eberbach, 40 golpes/min) de un callo derivado de hipocotilo de 30 días de formación (no embriogénico), mientras que los protoplastos se derivaron de hojas de plantas juveniles o adultas digeridas en presencia de celulasa 2% y Macerozyme 0,5% en presencia de manitol o sacarosa. En *C. papaya* también se obtuvieron protoplastos a partir de callo (sin cloroplastos desarrollados) bajo las condiciones de enzimas y osmóticos indicados antes. Alícuotas de suspensiones de protoplastos de ambas especies se mezclaron usando polietilenglicol y se sembraron en presencia de diferentes fitohormonas (Jordán, 1986; Jordán *et al.*, 1986).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cultivo de microsporas/anteras

Las distintas etapas de desarrollo de las microsporas y su respuesta ante niveles de fitohormonas para *N. tabacum*, *P. avium* y *C. pubescens* se ilustran en la Tabla I, Fig. 1. Mientras plántulas de tabaco se originaron directamente en varios tratamientos hormonales (Fig. 1f), respuestas de formación de callo en *P. avium* y *C. pubescens* se lograron sólo en concentraciones de ANA y BA 1 mg/l, respectivamente. Cortes histológicos mostraron formación de polen multicelular en polen de *P. avium* con una

exina claramente visible (Fig. 1b), posteriormente desarrollo de agregados celulares los cuales crecen desde el interior de las tecas (Fig. 1d) y emergen por la pared de la antera para conformar un callo. En algunos casos proliferación de células de gran tamaño con núcleos prominentes (Fig. 1c) sugiriendo diferentes grados de ploidía fueron frecuentes; en otras anteras, cuatro conglomerados o callos independientes suponen el origen de cuatro microsporas en forma paralela (Fig. 1e). Un desarrollo posterior no se observó por empardecimiento tisular, debido al metabolismo fenólico oxidativo típico de esta especie leñosa y de otras especies arbóreas en general (Phan and Letouze, 1983; Gaspar and Coumans, 1987). En el caso de *C. pubescens*, bajo idénticas condiciones de cultivo, se inició una abundante proliferación de callo desde el interior y exterior de las anteras a partir de los 15 días. A los 30 días, sin mediar subcultivo, se observó la formación en embriones somáticos múltiples en este callo, distinguibles por su color verde. El origen de este callo y la ploidía de los embriones aún debe ser confirmada.

### Cultivo de células y protoplastos

Suspensiones celulares de *C. pubescens*, derivadas de un callo crecido por 30 días en un medio Nitsch y Nitsch con 1 mg/l de ANA y BA, respectivamente, mostraron alta capacidad organogénica sembradas en diferentes tratamientos con fitohormonas (Tabla II).

TABLA I

Respuestas morfológicas de microsporas de *Nicotiana tabacum*, *Prunus avium* y *Carica pubescens* a partir de cinco semanas de cultivo en medio según Nitsch y Nitsch (1969)

Fitohormonas (mg/l)		Especies	Anteras sembradas	Anteras microsc. examinadas	Respuestas morfológicas
ANA	BA				
0,0	0,0	<i>P.a.</i>	870	45	Sin crecimiento.
0,1	0,1	<i>P.a.</i>	500	60	Sin crecimiento.
0,1	0,1	<i>N.t.</i>	460	—	14 plántulas.
1,0	0,0	<i>P.a.</i>	270	31	Sin crecimiento.
1,0	0,1	<i>P.a.</i>	550	60	Sin crecimiento.
1,0	1,0	<i>P.a.</i>	1.280	145	21 anteras con callo de polen.
1,0	1,0	<i>N.t.</i>	120	—	4 plántulas.
1,0	1,0	<i>C.p.</i>	110	—	2 con callo, realizando embriogénesis múltiple.

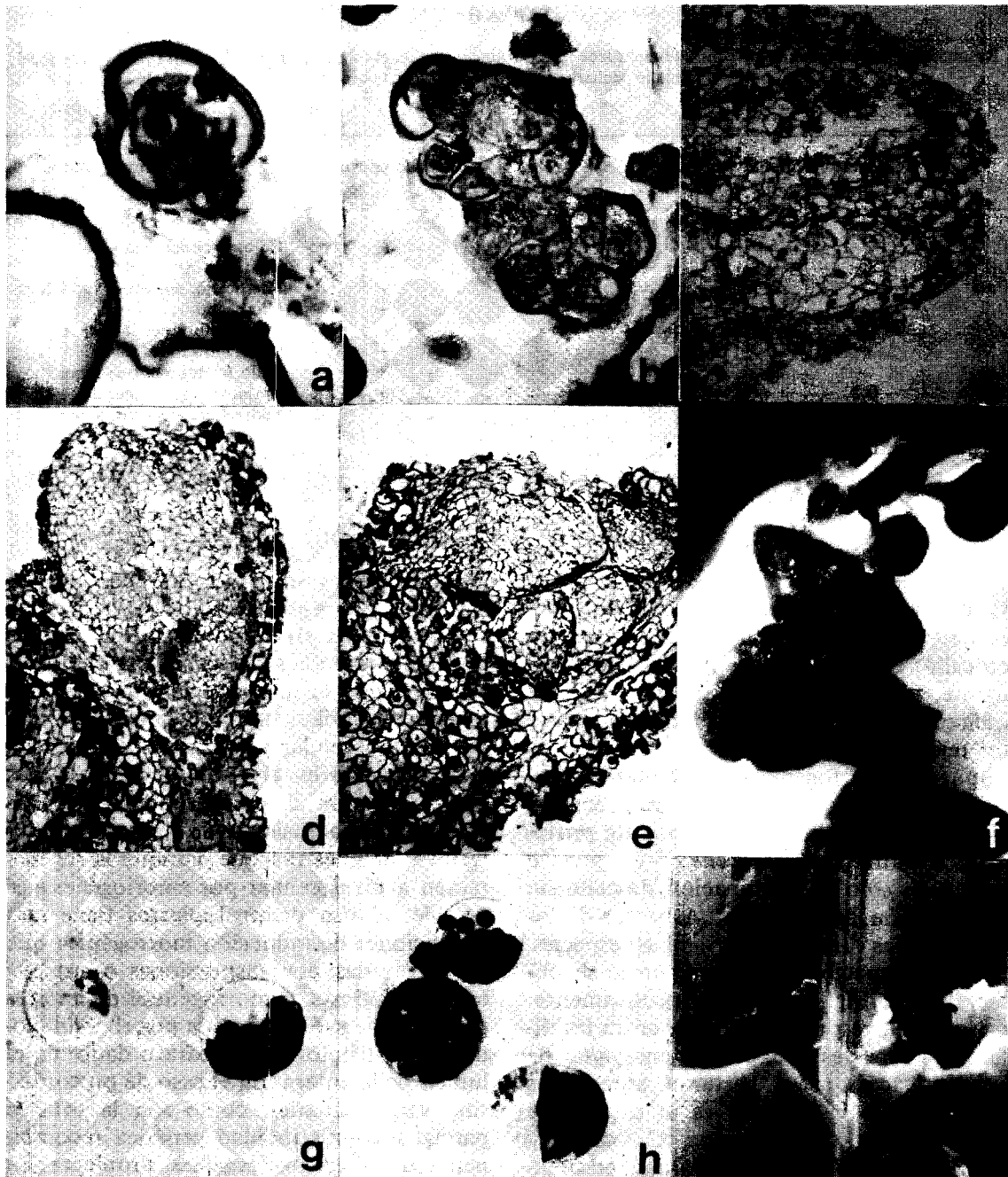


Fig. 1a: Grano de polen binucleado con célula vegetativa (centro) y célula generativa más pequeña (borde).

Fig. 1b: Grano de polen multicelular de *P. avium* en el interior de una antera mostrando desprendimiento de la exina a las 4 semanas de cultivo.

Fig. 1c: Formación de callo de microspora dentro de las tecas con células y núcleos prominentes, después de 7 semanas.

Fig. 1d: Callo emergiendo desde las anteras (región central) y granos de polen no androgénicos (base) en el interior de una teca, después de 8 semanas de cultivo.

Fig. 1e: Cuatro callos en el interior de una teca cada uno originado de una microspora; alrededor polen no androgénico, 8-9 semanas de cultivo.

Fig. 1f: Plántula de tabaco originada directamente de una microspora sin mediar callo al cabo de 35 días de cultivo.

Fig. 1g: Protoplastos aislados de *C. papaya* con proplastidios (derivada de un callo, izquierda) y de *C. pubescens*, con cloroplastidios, derivados del mesófilo de hojas juveniles (derecha).

Fig. 1h: Fusión de protoplastos entre *C. papaya* (porción izquierda) y *C. pubescens* (porción derecha).

Fig. 1i: Formación de brotes en callo probablemente derivado de un producto de fusión protoplasmática interespecies.

TABLA II

Respuestas morfológicas de suspensiones celulares de *C. pubescens* en respuesta a diferentes fitohormonas y presencia de callo nodriza después de 80 días de cultivo

ANA	Fitohormonas (mg/l)			IPA	Callo nodriza	Respuestas morfológicas
	2,4-D	BA	Z			
0,1	—	5,0	—	—	—	Colonias, microcallo.
0,1	—	0,1	—	—	—	Colonias, microcallo.
0,02	—	—	2,0	—	—	Microcallo, embriones somáticos.
0,5	—	—	—	0,5	—	Microcallo.
0,0	—	1,0	—	—	—	Callo, embriones somáticos.
1,0	—	1,0	—	—	—	Callo, embriones somáticos.
1,0	—	1,0	—	—	+	Callo, embriones somáticos.
1,0	0,2	—	—	—	+	Embriones somáticos en tejido nodriza, no en suspensiones.

De acuerdo a los resultados de la Tabla II, cultivos celulares en *C. pubescens* pueden ser conducidos a la formación de microcallo, embriones somáticos y, posteriormente, plántulas a través de organogénesis indirecta en cultivos individuales o usando un tejido dual como nodriza. Mientras las respuestas morfológicas de células en suspensión son fácilmente inducibles en esta especie, los productos de fusión de protoplastos entre *C. pubescens* y *C. papaya* conducen sólo a la formación de callo sin regeneración de plántulas. Aspectos de los protoplastos aislados de ambas especies, fusión, formación de callo y brote se observa en la Fig. 1g, h, i; respectivamente. En general, respuestas *in vitro* entre las diferentes especies y explantes ensayadas de las Caricaceas, son bastante apreciables (Litz, 1984) igualmente es el caso entre *C. pubescens*, *C. pentagona*, *C. papaya* y *C. chilensis* (Jordán, 1989; Jordán, en prensa). A pesar de ello, los eventos de aislación de protoplastos, fusión interespecífica y los primeros estadios de desarrollo de un microcallo pueden ser promovidos mediante el uso de material juvenil, medios de digestión y/o de cultivos adecuados y la presencia de antibióticos. Eventualmente, con el cocultivo de tejidos nodriza (callo altamente embriogénico de *C. pubescens*), se podrían gatillar respuestas morfológicas en productos de fusión de protoplastos en

hibridizaciones somáticas de otras combinaciones interespecíficas entre Caricaceas.

En la Tabla III se muestran los mejores resultados para la aislación de protoplastos. Mientras que la más alta densidad se logra en hojas juveniles, fueron la heterogeneidad del tamaño celular y el grado de diferenciación existente en el callo los factores más limitantes para la concentración final de protoplastos a fusionar. Los resultados anteriores demuestran que aunque la regeneración a nivel celular por embriogénesis es posible, el uso de protoplastos tiene más limitaciones de inducción morfológica que las mostradas por suspensiones o anteras; en estas últimas, la morfologénesis de microsporas puede ser promovida por el condicionamiento fisiológico o sustrato dado en el lumen de la antera. En el caso de protoplastos, varias causales, como son la total o parcial incompatibilidad genética recombinante de diferentes especies, problemas en los procedimientos de aislación y/o requerimientos nutritivos precursores de pared más específicos a los demandados por suspensiones celulares son limitantes para promover fusiones interespecíficas y son variables que deberán ser establecidas específicamente.

Se agradece a los proyectos DIUC 85/86, FONDECYT N° 753/87 y 0699/89 y PSTC grant N° 513-5542-G-SS-9067-00 del Programa A.I.D.

TABLA III

Respuesta al aislamiento de protoplastos de hojas de material adulto y juvenil de *C. pubescens*

Material vegetal	Esterilización	Solución de digestión (Incluye enzimas)	Condición durante digestión	Densidad (Hemacitómetro)	Estado y apariencia
Hoja juvenil	Etanol 70% 1' NaCl 10% 5'	Medio MS (Modif.) + 1,5 ml Gentalyn	Oscuridad T <sup>o</sup> 30°C, 25 hrs. Sacarosa 20% 500 rpm.	± 27,72 44,3 x 10 <sup>4</sup>	Protoplastos esféricos, perfecto estado, abundantes.
Hoja adulta	Etanol 70% 1' NaCl 10% 5'	Medio MS (Modif.) + 1,5 ml Gentalyn	Oscuridad T <sup>o</sup> 30°C, 25 hrs. Sacarosa 20% 500 rpm.	2,0 x 10 <sup>4</sup>	Baja densidad, muchos destruidos.
Callo de hipocotilo*	No se requiere	Medio MS (Modif.) + 1,5 ml Gentalyn	Oscuridad T <sup>o</sup> 30°C Sacarosa 20% 100-300 rpm, 10'.	3,5 x 10 <sup>4</sup>	Protoplastos esféricos, perfecto estado, baja densidad.
Callo de pecíolo	No se requiere	Medio MS (Modif.) + 1,5 ml Gentalyn	Oscuridad T <sup>o</sup> 30°C Sacarosa 20% 100-300 rpm, 10'.	4,0 x 10 <sup>4</sup>	Protoplastos esféricos, perfecto estado, baja densidad.

\* Los callos de hipocotilo y de pecíolo de *C. pubescens* o *C. papaya* crecieron en el medio de Nitsch que contenía 1 mg/l de ANA y BA, respectivamente.

## REFERENCIAS

- GASPAR, TH. and COUMANS, M. (1987) Root Formation. In: Cell and Tissue Culture in Forestry. (Ed. Bonga & Durzan). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 202-217.
- GEORGE, E.F. and SHERRINGTON, P.D. (1984) Plant propagation by tissue culture. Exegetics Limited, Eversley, 709 pp.
- GLEBA, Y.Y. and SYTNYK, K.M. (1984) Protoplast Fusion, Springer-Verlag, Heidelberg, 220 pp.
- JORDAN, M. (1986) Somatic embryogenesis from cell suspension cultures in *Carica candamarcensis*. PCTOC 7: 257-261.
- JORDAN, M.; CIUDAD, G.; ROJAS, M.L. and VALVERDE, F. (1986) Isolation, culture and fusion of *Carica candamarcensis* and *C. papaya* protoplasts. *Gartenbauwissenschaft* 51: 175-178.
- JORDAN, M. (1989) *In vitro*. Regenerationsvermögen von 3. Caricaceen (*Carica candamarcensis*), *C. papaya* und *C. pentagona*). *Erwerbobstbau* 31: 90-94.
- JORDAN, M. (1990) Micropropagation of papaya. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry (Ed. Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag (press).
- LITZ, R.E. (1984) Papaya. In: Handbook of Plant Cell Culture II, Crop Species (Ed. W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato & Y. Yamada) MacMillan Publishing Co., New York, pp. 349-368.
- NARAYAMASWAMY, S. and GEORGE, L. (1982) In: Experimental Embryology of Vascular Plants (Ed. B.M. Johri) Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 79-103.
- NITSCH, J.P. and NITSCH, C. (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85-87.
- PHAN, C.T. and LETOUZE, R. (1983) A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents and of hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and vitreous plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*. *Plant. Sci. Lett.* 31: 323-327.

