



Universidad
Industrial de
Santander



El conocimiento
es de todos

Minciencias

CULTIVO DE TEJIDO VEGETAL



CULTIVO DE TEJIDO VEGETAL

CONVOCATORIA No. 812 – COLCIENCIAS

Programa: Bio-Reto XXI 15:50. Desarrollo de bioproductos para los sectores salud, agropecuario y cosmético, como resultado del estudio de la biodiversidad colombiana.

Jóvenes investigadores e innovadores año 2018



Institución

¹ Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

Autores

Luz Nayibe Garzón Gutiérrez ¹
Julián Sebastián Ramírez Moreno¹

Impreso en Colombia - Año 2020

Editor

Luz Nayibe Garzón Gutiérrez

Fotografías

Julián Sebastián Ramírez Moreno¹
Duban Saavedra Rivero ¹

Diseño

Bianeth García Barrios

PRÓLOGO

La propagación de plantas es un tema que siempre ha interesado al ser humano, debido a que es un pilar importante de la sociedad, tener el conocimiento para desarrollar técnicas y tecnologías que producen en grandes cantidades material vegetal, no solo para la obtención de alimentos, también en la fabricación de medicamentos, cosméticos, fragancias y en general productos comerciales que se obtienen gracias a las sustancias y moléculas que se pueden extraer de las plantas, especialmente las aromáticas y medicinales.

Es por ello, que esta cartilla tiene como objetivo dar a conocer el cultivo de tejidos vegetales, un conjunto de técnicas que permiten el desarrollo de métodos para obtener plantas de manera rápida y eficaz, sin enfermedades y con ventajas adaptativas a los cambios climáticos actuales. Además, en las siguientes páginas, el lector también podrá conocer sobre una planta aromática y medicinal internacionalmente importante, el pachulí (*Pogostomon cablin*), muy conocida por los aceites esenciales que se pueden fabricar a partir de ella y todas las bondades que estos conllevan.



AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, el Ministerio de Educación, el Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX, Programa Ecosistema Científico - Colombia Científica, del Fondo Francisco José de Caldas (Grand RC-FP44842 -212-2018).

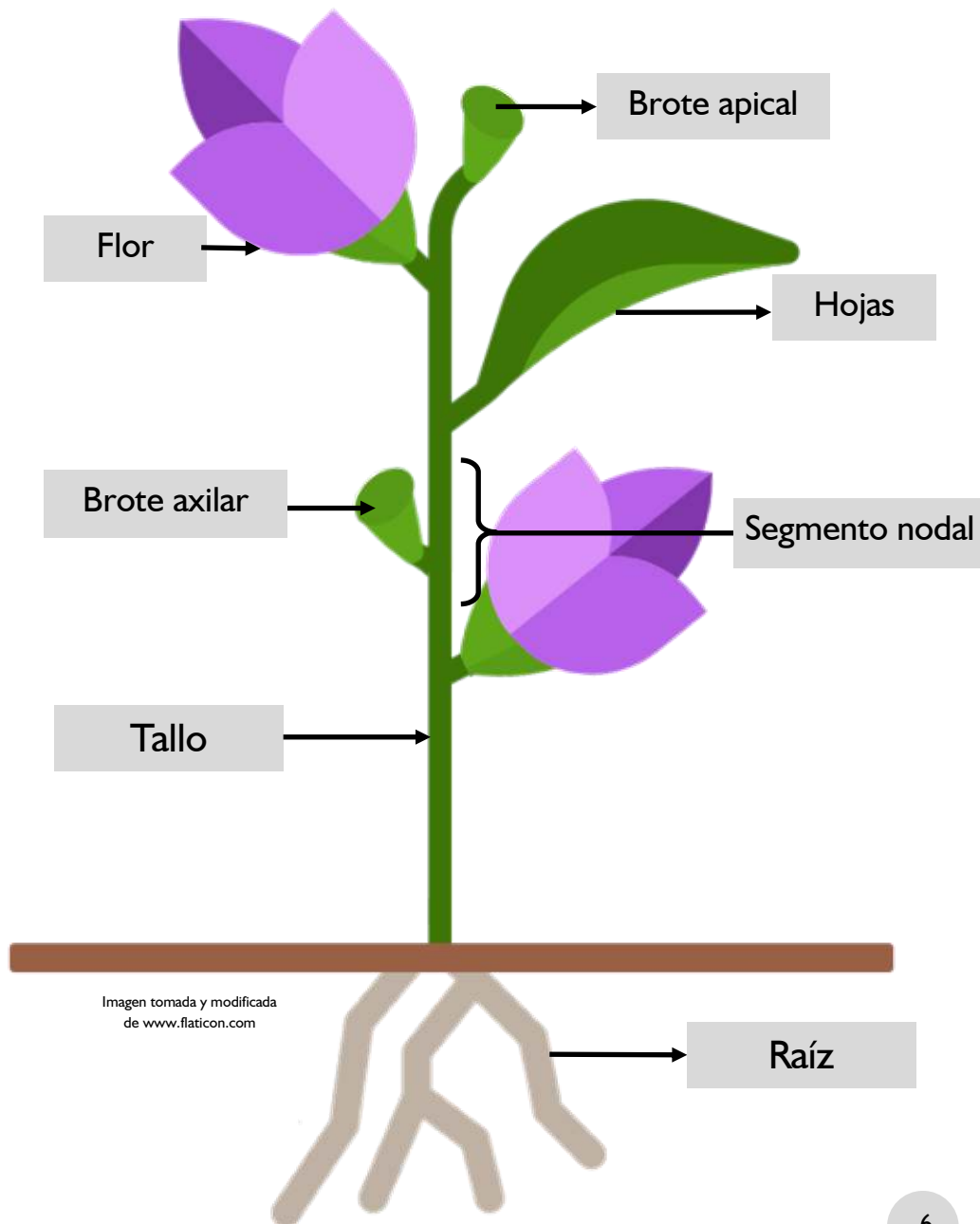




¿Qué es el cultivo *in vitro*?

El cultivo *in vitro* de plantas o cultivo de tejido vegetal es un conjunto de técnicas, que consiste en el aislamiento de una parte de la planta (hojas, raíz, tallo, etc.) para su posterior cultivo en un medio artificial (Chandra, Lata, & Varma, 2013). El procedimiento se realiza en el laboratorio, donde es posible controlar características ambientales como temperatura, humedad e intensidad lumínica que recibe la planta, con el fin de propagar o multiplicar una especie vegetal con características deseadas (Roca & Mroginski, 1991).





EXPLANTES

El cultivo *in vitro* de plantas implica el uso de pequeñas partes de la misma, es decir explantes, que se cultivan en un medio nutritivo en condiciones estériles (Smith, 2013). Los explantes que se pueden tomar de la planta se encuentran representadas en la imagen de la izquierda.



Los explantes de la planta son cultivados en un medio de cultivo artificial y trasladados a condiciones de laboratorio. Este medio de cultivo está constituido por nutrientes que requiere la planta para su normal crecimiento, es decir, los mismos elementos que se encuentran en el suelo (Bhojwani y Dantu, 2013).

Medio artificial

Adicionalmente, el medio tiene vitaminas y reguladores de crecimiento que estimulan el desarrollo de la planta. En otras palabras, dichas sustancias permiten que la planta crezca de manera más rápida en un menor tiempo (George, Hall, y Klerk, 2008).



Condiciones de laboratorio

Los explantes cultivados en un medio artificial, deben estar en un sitio con características especiales, denominado cuarto de crecimiento (Bhojwani & Dantu, 2013). En el cuarto la temperatura es controlada con aire acondicionado, entre 23°C y 25 °C. Los recipientes de cultivo están dispuestos en una estantería con lámparas, encendidas durante 16 horas. Este periodo donde los explantes reciben luz artificial de las lámparas se conoce como fotoperiodo, pues es en ese momento donde las plantas realizan la fotosíntesis (Roca & Mroginski, 1991).





Etapas del cultivo *in vitro*

Etapa I: Establecimiento del cultivo *in vitro*

Etapa 0: Selección de la planta madre

En esta etapa se escoge la planta de la cual se tomarán los explantes y se conocerá como planta madre. Es necesario que la planta madre no presente enfermedades de ningún tipo, es decir, que se encuentre en buenas condiciones (Smith, 2013). Generalmente se ubica en un invernadero o vivero, donde se debe garantizar que las plantas tengan un estado fitosanitario óptimo, es decir estén libres de plagas y enfermedades y deben ser regadas de acuerdo a las necesidades de la especie.



Una vez aislados los explantes de la planta madre, estos son cultivados en el medio y se mantienen en el cuarto de crecimiento. Sin embargo, en el medio de cultivo pueden desarrollarse otros organismos, como los hongos y las bacterias, que competirán por nutrientes con la planta. Es por ello que los explantes pasan primero por un proceso de lavado denominado desinfección (George et al., 2008). En este proceso, los explantes son sumergidos en agua destilada y esterilizada, así como en detergentes, hipoclorito de sodio y en etanol. La concentración de cada uno de los reactivos y el tiempo en el que deben estar sumergidos los explantes para impedir el crecimiento de otros organismos son específicos para cada especie de planta.



Etapa 2: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es la propagación o multiplicación de los explantes y que a partir de estos se desarrollen numerosos brotes o un tallo alto. Para ello, es necesario implementar en el medio de cultivo reguladores de crecimiento que estimulen este tipo de respuesta (Loyola-vargas, 2006). Entre los reguladores más usados se encuentran las auxinas, giberelinas y las citoquininas. La concentración de estas sustancias también es específica para cada especie.



Etapa 3: Enraizamiento

Al igual que en la etapa anterior, se agregan reguladores de crecimiento al medio de cultivo, pero en esta ocasión con el objetivo de estimular el desarrollo y crecimiento de la raíz en los explantes (George et al., 2008). El tipo de regulador y la concentración son dependientes de la especie vegetal, pero usualmente se obtienen resultados positivos agregando auxinas.

<i>Reguladores de crecimiento</i>	Efecto en la planta	Ejemplos
<i>Auxinas</i>	Alargamiento del tallo Dominancia apical (tendencia a mostrar un mayor crecimiento en la punta de la planta) Enraizamiento	Ácido indol-3-acético (IAA) Ácido indol-3-butírico (IBA) Ácido a-naftaleneacético (NAA)
<i>Citoquininas</i>	Induce la proliferación de brotes Desencadena la formación de callo (grupo de células con el potencial de formar cualquier órgano de la planta)	6- furfuriladenina (Cinetina) 6-bencilaminopurina (BAP)
<i>Giberelinas</i>	Estimulan el alargamiento de los segmentos nodales	Ácido giberélico (GA ₃)

(Bhojwani & Dantu, 2013)

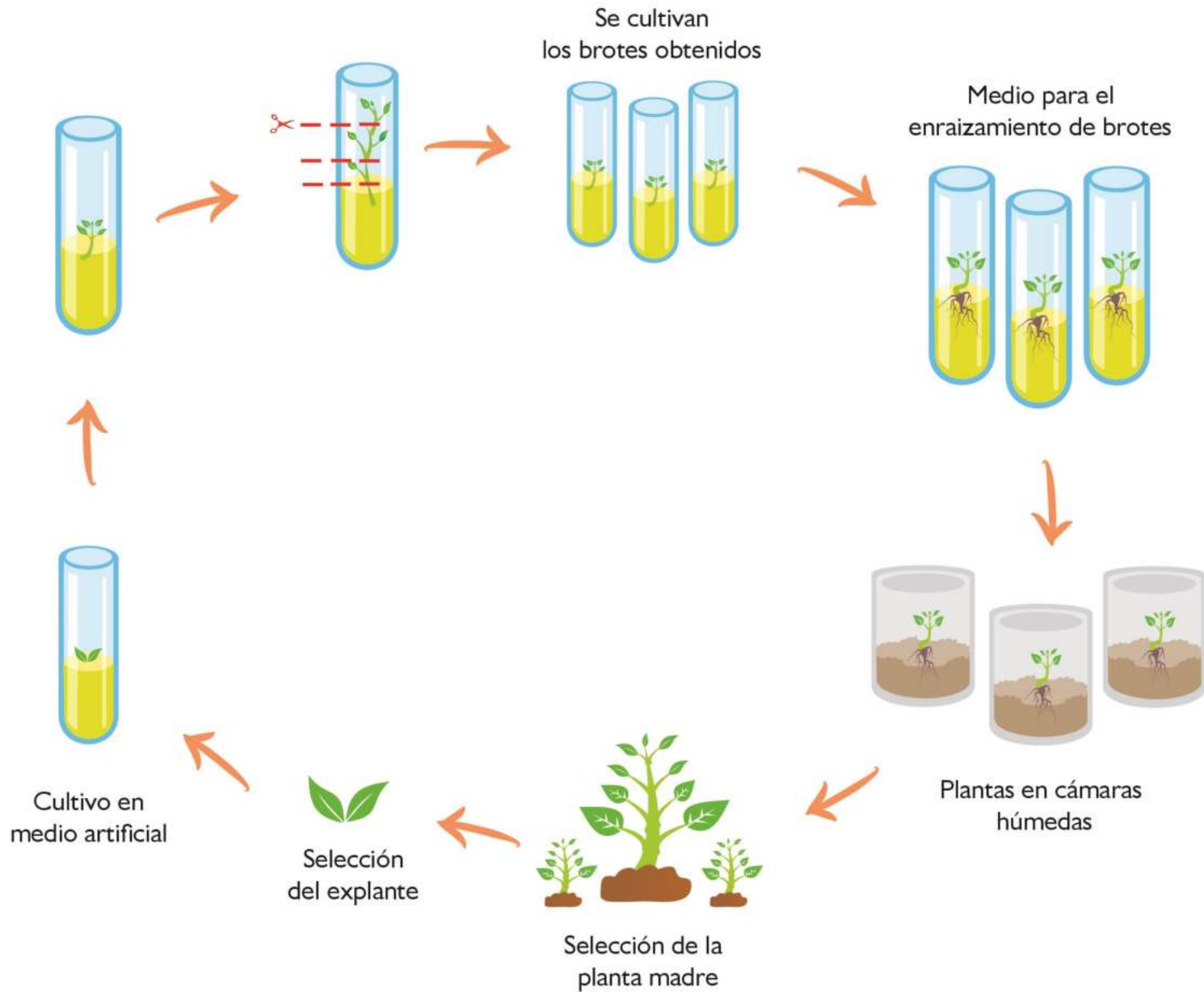
Etapa 4: Adaptación

La última etapa consiste en pasar los explantes de un medio de cultivo artificial a un sustrato (arena, turba, lombrinaza, etc.). Para ello es necesario hacer un cambio moderado de las condiciones ambientales en las que se encuentra el explante. Por eso, generalmente se trasladan las plántulas con desarrollo radicular a un invernadero donde la luz directa del sol no les afecta (Bhojwani & Dantu, 2013).



También es obligatorio que las plantas se encuentren en cámaras de humedad, es decir, en bolsas resellables que permitan mantener la humedad alta los primeros días. Gradualmente se abre la bolsa para permitir un cambio moderado de la humedad en los explantes.

Etapas del cultivo de tejido vegetal





Aplicaciones

- Establecer cultivos a partir de partes muy pequeñas (explantos)
- Producción de una mayor cantidad de plantas en poco tiempo y en un espacio limitado
- Conservación de plantas en peligro de extinción.
- Producción de compuestos útiles (medicamentos, aceites esenciales, etc.)
- Almacenamiento a largo plazo de tejido vegetal

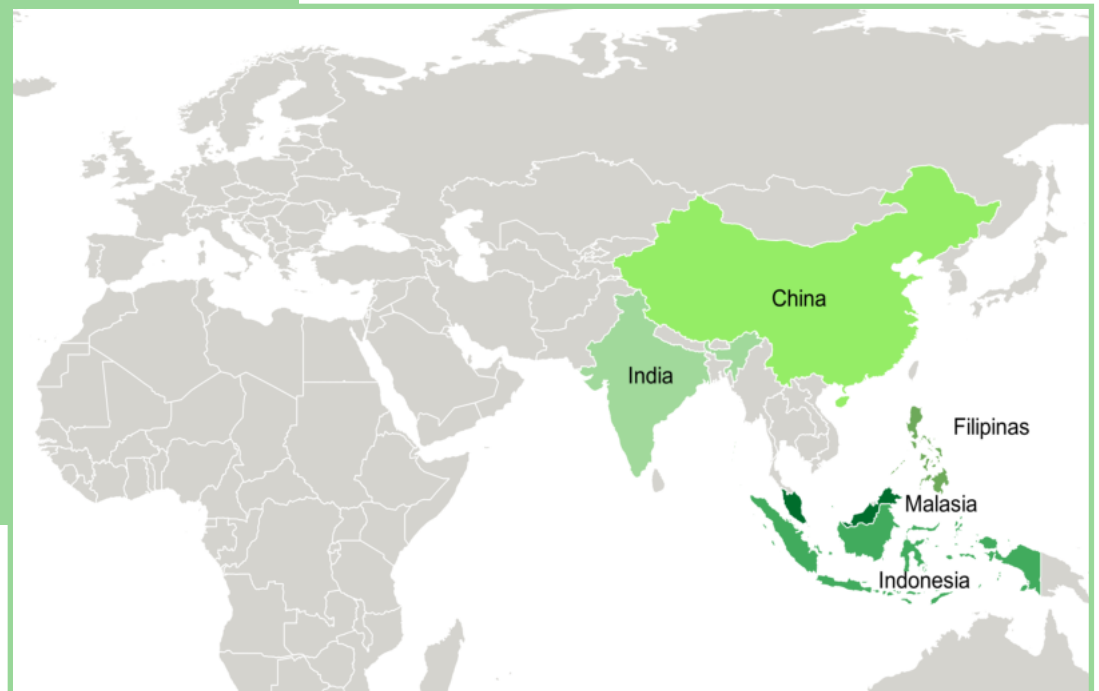
(Bhojwani & Dantu, 2013; Chandra et al., 2013; Loyola-vargas, 2006)



PACHULÍ (*Pogostomon cablin*)

Origen

El pachulí es una hierba perenne, es decir vive generalmente más de dos años y sus hojas no se caen a lo largo de todo el año. Su nombre científico es *Pogostomon cablin* y es originario de Filipinas pero se distribuye de forma natural en los países del sur y sureste de Asia, como en India, China, Malasia, entre otros. Esta planta herbácea se encuentra adaptada a ambientes tropicales, cálidos y húmedos (Maheshwari, Vasantha Kumar, Sharma, & Chandel, 1993).





Descripción morfológica

Pachuli es una hierba ramificada que puede llegar a medir 1 m de altura. Las hojas son de color verde pálido a púrpura cuando se cultivan directo al rayo de sol, pero de color verde brillante bajo sombra.



El borde de sus hojas presenta formas redondeadas, que son denominadas por los botánicos como márgenes lobulados. Los tricomas (vellosidades) abundan en la superficie de la hoja (Swamy & Sinniah, 2016)



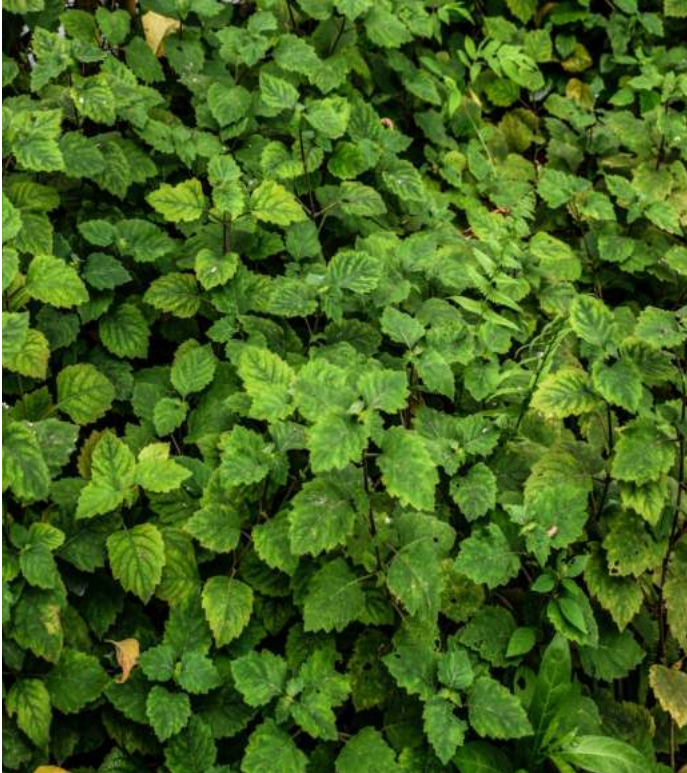
Importancia económica

Las hojas de la planta de pachulí producen aceite aromático, ampliamente utilizado en la industria de las fragancias para elaborar diversos productos como jabones, detergentes, lociones corporales y perfumes. Además, diversos estudios han revelado distintas propiedades del aceite de pachulí en los que se incluyen actividades para atenuar la depresión, la ansiedad, y calmar los nervios (Dongare, P., Dhande, S., y Kadam, 2014; Swamy y Sinniah, 2015).

Razón por la que es considerado un cultivo comercial de gran importancia a nivel industrial, medicinal, alimentario, etc.



Cultivo de tejidos vegetales



La floración en plantas de Pachulí es poco frecuente

Por eso se realiza a través de esquejes y no con semillas

Esta técnica presenta desventajas

El rendimiento de los aceites así como su calidad van a variar

(Swamy & Sinniah, 2016).

Adicionalmente, la disponibilidad de esquejes elites (plantas de pachulí con características destacables) se encuentra limitada por enfermedades provocadas por virus, nematodos y e insectos, entre otros (Sastry, 1981). Es por ello, que se han desarrollado diferentes protocolos utilizando las técnicas de micropropagación o de cultivo de tejidos que permiten una multiplicación eficiente y rápida.

Protocolo de micropropagación de Pachulí (*Pogostomon cablin*)

Desarrollado por el Laboratorio de
Genética y Biotecnología de la
Universidad Industrial de Santander

Etapa I

Establecimiento del cultivo *in vitro*



- **Explante inicial:** Yemas
- **Proceso de desinfección:** Lavar el explante con las siguientes sustancias.
 1. Agua destilada y esterilizada.
 2. Etanol al 70 % durante 1 minuto
 3. Hipoclorito de sodio al 4 % durante 2 minutos
 4. Benomyl al 0.02 mM durante 2 minutos.

Medio de cultivo: Cultivar las yemas en medio de Murashge and Skoog (MS) + Benomyl al 1.72 mM

Protocolo de micropropagación de Pachulí (*Pogostomon cablin*)

Desarrollado por el Laboratorio de
Genética y Biotecnología de la
Universidad Industrial de Santander

Etapa 2

Multiplicación



- **Explante:** Segmentos nodales obtenidos de las yemas cultivadas en la etapa anterior
- **Medio de cultivo:** Cultivar los explantes en medio MS + Ácido Giberélico al 0.5 mg/l
- **Respuesta:** Crecimiento de tallo y raíz.
- **Medio de cultivo:** Cultivar los explantes en medio MS + 6-bencilaminopurina al 0.5 mg/l.
- **Respuesta:** Múltiples brote

Protocolo de micropropagación de Pachulí (*Pogostomon cablin*)

Desarrollado por el Laboratorio de
Genética y Biotecnología de la
Universidad Industrial de Santander

Etapa 3

Adaptación



1. Se colocan las plantas en el sustrato (arena negra) previamente esterilizado en bolsas con cierre hermético.
2. Las plantas se retiran del recipiente de cultivo y se lavan con agua destilada tibia la raíz para retirar el exceso de agar.
3. Se coloca la planta dentro de la bolsa y esta se mantiene sellada durante los próximos dos días.
4. Se abre la bolsa gradualmente hasta que esté completamente abierta después de una semana.
5. Cuando la planta sobresalga de la bolsa se siembre en suelo

Referencias

- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Plant tissue culture: An introductory text. Springer, India.
- Chandra, S., Lata, H., & Varma, A. (2013). Biotechnology for Medicinal Plants. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Dongare, P., Dhande, S., & Kadam, V. (2014). A Review on *Pogostemon patchouli*. Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(1), 41–47.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. De. (2008). Plant propagation by tissue culture. In Springer. Netherlands: Springer.
- Loyola-vargas, V. M. (2006). Plant Cell Culture Protocols. In Plant Cell Culture Protocols.
- Maheshwari, M. L., Vasantha Kumar, T., Sharma, N., & Chandel, K. P. S. (1993). Patchouli-an Indian perspective. Indian Perfumer, 37, 9–9.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT.
- Sastry, K. S. (1981). Yellow mosaic of patchouli (*Pogostemon patchouli*) in India.
- Smith, R. H. (2013). Plant tissue culture techniques and experiments. Texas: Academic Press.
- Swamy, M. K., & Sinniah, U. R. (2015). A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Pogostemon cablin* Benth.: 8521–8547.
- Swamy, M. K., & Sinniah, U. R. (2016). Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): Botany, agrotechnology and biotechnological aspects. Industrial Crops and Products, 87, 161–176.