

ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE ESPECIES DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA O MEDICINAL PARA LA REGIÓN

PROBLEMA O SITUACIÓN PROBLEMÁTICA

La biotecnología es considerada como una actividad inter y multidisciplinar que tiene como objeto el mejoramiento de los seres vivos o de sus productos para proveer bienes y servicios (Altpeter et al., 2016). En este sentido, la Organización Mundial de la Salud ha estimado que la población humana creciente ameritará mayor producción de alimento para el año 2050. Sin embargo, las condiciones ambientales cada vez más agrestes amenazan la supervivencia de las especies vegetales de importancia agrícola debido a la mayor presión de patógenos, menor disponibilidad de área, agua y nutrientes entre otras razones. Por ello, los procesos de investigación deben permear todas las disciplinas que converjan en desarrollos biotecnológicos aplicados al campo agrícola.

En este sentido, el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales es considerado una herramienta biotecnológica, en la cual porciones de una planta bajo condiciones físicas, químicas y ambientales controladas (*in vitro*), pueden dar origen a nuevas plántulas completamente viables y funcionales. El cultivo de células y tejidos vegetales es actualmente empleado para: 1.) propagación clonal masiva, 2.) producción de plántulas con sanidad controlada, 3.) conservación de especies a través de bancos de germoplasma *in vitro* 4.) obtención de valores agregados en la especie como metabolitos secundarios o moléculas recombinantes y, 5.) mejoramiento genético (García, 2019). Estas aplicaciones hacen que esta herramienta permita la generación de plántulas que superen las actuales presiones ambientales o productos biotecnológicos de importancia en diferentes ambientes industriales.

Desde la mirada práctica, nuestras aulas deben generar los espacios de discusión de desarrollos y tecnologías disponibles en el mundo, permitiendo de esta manera la generación de alternativas para el mejoramiento de éstos a través de procesos de investigación y su acorde y oportuna divulgación. Por ello, en este proyecto de aula, los estudiantes plantearon y ejecutaron una propuesta para el establecimiento *in vitro* de una especie con características comerciales o medicinales reconocidas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el mejor protocolo para la desinfección y micropropagación de especies agrícolas o medicinales importantes de la región para lograr su establecimiento en condiciones *in vitro*?

OBJETIVO GENERAL

Establecer en condiciones *in vitro* especies vegetales de importancia agrícola o medicinal para la región.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar diferentes protocolos para la desinfección y micropropagación de las especies seleccionadas.

METODOLOGÍA

El proyecto de aula se desarrolló en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas. En grupos de trabajo, los estudiantes del curso de biotecnología y los rotantes del laboratorio seleccionaron como explantes semillas y segmentos nodales de las siguientes especies: menta (*Mentha piperita*), manzanilla (*Chamaemelum nobile*), albahaca (*Ocimum basilicum*), lenteja (*Lens culinaris*), papa criolla (*Solanum phureja*), cebolla (*Allium fistulosum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), pimentón (*Capsicum annuum*), y fresa (*Fragaria spp.*) Para cada uno de las especies se evaluaron 3 protocolos para la desinfección, los cuales emplearon benomil®, dióxido de cloro (ClO₂), hipoclorito de sodio (NaClO) y carbendazim®, en diferentes condiciones y concentraciones. Para la germinación y micropropagación se siguió las metodologías propuestas por García et al. (2015) y Chetty et al. (2013), con algunas modificaciones. Se evaluaron 3 medios de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con diferente balance hormonal para cada una de las especies evaluadas (Fig. 1). Después de la siembra de los explantes, éstos fueron incubados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 25±2 °C, un fotoperiodo luz/oscuridad de 16/8h con una intensidad lumínica de 50 µmol m⁻² s⁻¹.



Figura 1. Metodología para el establecimiento *in vitro*. Variables de respuesta evaluadas: Porcentaje (%) de contaminación, germinación y micropropagación. Día a inducción de cotiledones (DIC), Días a inducción de hojas verdaderas (DIHV). Número de brotes por explante (NBE). Día a inducción de brotes (DIB). Día a inducción de raíces (DIR). Imágenes: Semillero IZAMANA.

RESULTADOS

Todas las especies fueron establecidas en condiciones *in vitro* (Fig. 2), excepto papa y cebolla. En cuanto a la germinación, se logró el establecimiento de menta (Fig. 2A), albahaca (Fig. 2B y 2C), manzanilla (Fig. 2D), lenteja (Fig. 2E), fresa (Fig. 2F), frijol (Fig. 2G) y pimentón (Fig. 2H), con tasas de germinación *in vitro* superiores al 50% en promedio. El 100% de las semillas de frijol, pimentón y lenteja germinaron en condiciones *in vitro*. Para fresa la tasa de germinación fue baja durante el primer mes; sin embargo, después de 3 meses de incubación *in vitro* germinaron el 70% de las semillas sembradas (Fig. 2F). Adicionalmente, en cebolla, frijol y lenteja bajo los tratamientos empleados para la micropropagación se logró la activación de otras vías de regeneración como callogénesis, organogénesis y embriogénesis (Fig. 2K-Ñ), mientras que en cebolla se evidenció la inducción de raíces (Fig. 2J). Por iniciativa de los estudiantes que trabajaron con pimentón, se continuó con la fase de aclimatación, logrando exitosamente la adaptación en suelo de las plántulas trasplantadas (Fig. 2I).

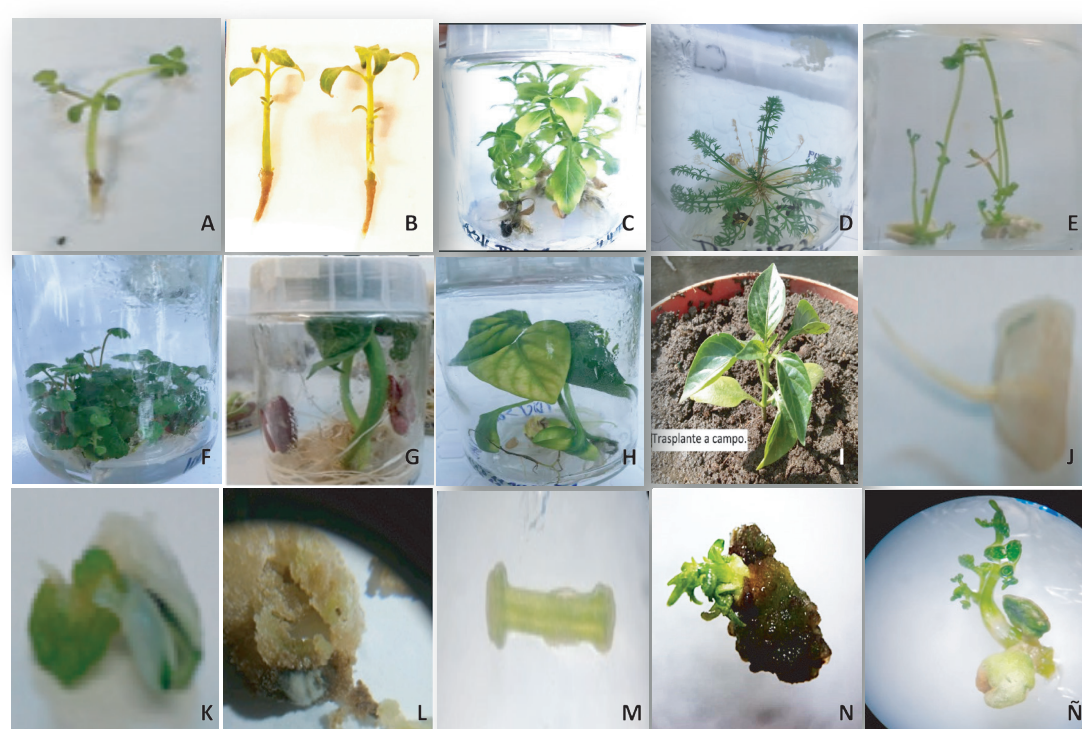


Figura 2. Establecimiento *in vitro* de las especies evaluadas. A. Plántula de menta. B y C. Plántulas de albahaca. D. Plántula de manzanilla. E. Plántulas de lenteja. F. Plántulas de fresa. G. Plántula de frijol. H. Plántula de pimentón. I. Plántula *in vitro* de pimentón aclimatada. J. Inducción de raíz en explantes de cebolla. K. Callos embriogénicos de cebolla. L. Callos embriogénicos de frijol. M. Callos embriogénicos de lenteja. N. Organogénesis directa en manzanilla. Ñ. Organogénesis directa en lenteja. Fotos: Estudiantes inscritos en el proyecto de aula.

Para la micropropagación, en cebolla y papa se emplearon porciones de tallo y yemas respectivamente, pero, debido al origen de los explantes se presentó un 100% de contaminación lo cual afectó la inducción de los brotes tanto en cebolla (Fig. 3A y 3B) como en papa (Fig. 3C-E) y la pérdida total de los explantes sembrados. Este mismo problema se presentó en los explantes nodales empleados para la micropropagación de menta, albahaca y manzanilla (Fig. 3I-K), mientras que, para la micropropagación de fresa, además de la contaminación (Fig. 3F y G), se presentó oxidación del tejido (Fig. 3H).

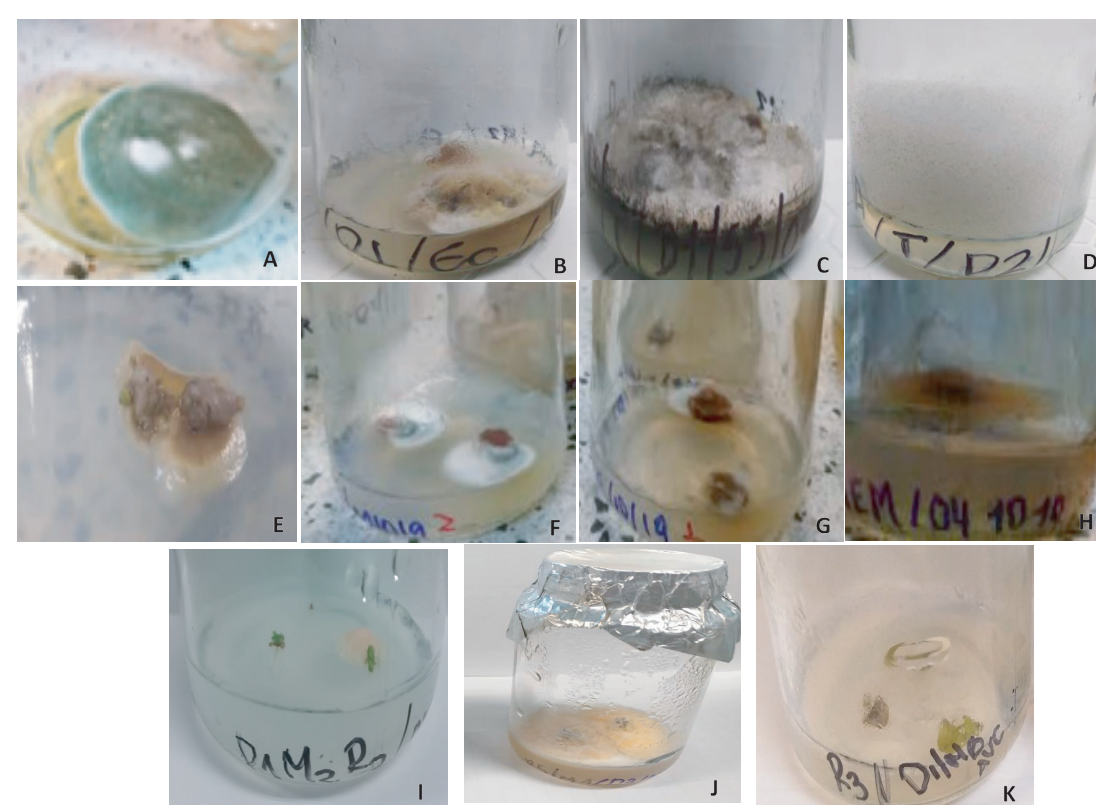


Figura 3. Problemas asociados al cultivo *in vitro*. Cebolla (A), papa (B-E), fresa (F-H), manzanilla (I), menta (J), albahaca (K). Fotos: Estudiantes inscritos en el proyecto de aula.

CONCLUSIONES

- Se logró la germinación *in vitro* de manzanilla, albahaca, fresa, menta, lenteja, pimentón y frijol con una correcta y completa morfogénesis de las plántulas.
- Se deben evaluar nuevos métodos para la desinfección de explantes extraídos de campo como yemas (papa), tallo y cuello (cebolla) y segmentos nodales (albahaca, menta y manzanilla) para garantizar la limpieza del tejido y la micropropagación de las especies.
- El establecimiento *in vitro* de estas especies permitirá a futuro realizar estudios asociados a su propagación masiva, inducción de callos o embriones hacia la producción de metabolitos secundarios y el mejoramiento genético de las especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altpeter, F., Springer, N.M., Bartley, L.E., Blechl, A.E., Brutnell, T.P., Citovsky, V. ... Lemaux, P.G. (2016) Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell* 28:1510-1520.
- Chetty, V.J., Ceballos, N., García, D.J., Narváez, J., López, W.R., Orozco, M.L. (2013) Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Report* 32:239-247.
- García, D.J., Narváez-Vásquez, J., Orozco-Cárdenas, M.L. (2015) Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). In: Wang K (ed) *Methods in Molecular Biology* 1223, 3rd edn. Springer, New York, pp 349-361.
- García-Jaramillo, D.J. (2019). Evaluación de introducciones de tomate producido vía microinjertación contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen (Tesis doctoral). Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.