ESTRATEGIAS PARA OBTENER VARIEDADES TOLERANTES A SALINIDAD. EL CULTIVO *IN VITRO* COMO HERRAMIENTA ÚTIL PARA LA MEJORA DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS

MSc. Leticia Fuentes Alfonso[1] Arletys Rojas Alonso[1] y Lic. Yunel Pérez Hernández[1]

1. *Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos", Vía Blanca Km.3, Matanzas, Cuba.*

CD de Monografías 2011
(c) 2011, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

Resumen

En los últimos años los problemas derivados de la salinización del suelo, especialmente en las zonas donde se practica una agricultura de tipo intensivo, están adquiriendo una magnitud alarmante. La salinidad afecta a más de 800 millones de hectáreas de tierra alrededor del mundo y la productividad de numerosos cultivos. La búsqueda de especies y variedades tolerantes a estreses abióticos constituye una prioridad en diferentes sectores de la agricultura mundial. Entre los numerosos métodos que se utilizan para la obtención de genotipos tolerantes a salinidad, el uso del cultivo *in vitro* representa una vía eficiente para lograr este propósito. En el siguiente trabajo se exponen un grupo de aspectos relacionados el cultivo de callo para la selección *in vitro,* la variación somaclonal como vía para desarrollar somaclones tolerantes a salinidad, influencia de la salinidad en la organogénesis directa entre otros aspectos, así como algunas experiencias alcanzadas en la regeneración *in vitro* de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184.

Palabras claves*: Cultivo in vitro, estrés salino; micropropagación.*

Introducción

De manera general existen numerosas vías para lograr la obtención de variedades tolerantes a salinidad, que van desde la selección natural de clones tolerantes a estrés salino, la mutagénesis en la búsqueda de nuevos somaclones mutantes resistente a este estrés utilizando las numerosas técnicas del cultivo *in vitro*, hasta las novedosas técnicas de la ingeniería genética para la obtención de organismos transgénicos con características halofíticas. A menudo se combinan estos métodos para lograr el propósito deseado. En particular, el avance en el empleo de estas técnicas de la biología molecular ha permitido dilucidar genes involucrados en las diferentes rutas metabólicas que con frecuencia convergen en respuestas a distintos factores estresantes como la salinidad, frío, calor, metales pesados, interacción hospedero-patógeno (Zhu, 2002).

Por métodos de mejora genética tradicional, como la selección natural y cruzamientos, se han obtenido variedades o líneas más productivas para condiciones de salinidad en cultivos como alfalfa, arroz, cebada, sorgo, tomate y trigo (Ashraf, 1994). Este proceso de mejora ha tenido éxito dependiendo de la variabilidad genética y la heredabilidad para el carácter de tolerancia del cultivo Leidi y Pardo, (2002).

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Jiménez, 1998). Constituye, dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal hasta la obtención de plantas libres de patógenos (Morel y Martin, 1955), la propagación masiva (Kitto, 1997), la conservación de germoplasma (Withers, 1985), la producción de metabolitos secundarios (Misawa, 1994), el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones, la selección *in vitro* y la ingeniería genética.

El presente trabajo tiene como objetivo exponer los principales aspectos relacionados con las potencialidades del cultivo *in vitro*, como método para la obtención de somaclones tolerantes a salinidad.

Desarrollo

Desde las etapas tempranas del cultivo de tejidos y la multiplicación *in vitro*, uno de los métodos propuestos para la mejora de tolerancia ha sido la selección o adaptación de suspensiones celulares o callo bajo condiciones de salinidad y el aprovechamiento de la variación somaclonal para posterior regeneración de plantas con mayor tolerancia (Nabors et al., 1980).

En general el cultivo de tejido de plantas ha sido propuesto como una herramienta útil, rápida y económica para la evaluación de la tolerancia a salinidad, a través de la generación de brotes por vía organogénica a partir de explantes de hojas y ápices caulinares (Gutierrez et al., 2003). Por otro lado, los métodos de transformación genética para la introducción de genes de interés agrícola en plantas, se han visto beneficiados también por el desarrollo del cultivo de tejidos como refieren en sus resultados Quecini et al. (2002).

La habilidad de los tejidos vegetales para formar varios órganos de novo es lo que se conoce como organogénesis. Puede producirse de forma directa o pasando por una etapa de desdiferenciación total de los fragmentos vegetales de partida (explantes) y luego una rediferenciación de ese tejido que se conoce como callo.

Por su comportamiento este género está considerado entre las leguminosas como un modelo de regeneración *in vitro*. Se han publicado varios estudios sobre la regeneración de plantas de *Stylosanthes* a partir de diferentes explantes obtenidos de hojas, hipocótilos y cotiledones (Meijer y Szabados, 1990, Mesa et al., 1993); y a partir de protoplastos (Meijer y Steinbiss, 1984). La regeneración de las plantas siempre ocurre por organogénesis mediante el desarrollo de brotes sobre la superficie de los callos.

Estudios realizados por los autores han demostrado también la capacidad de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184 para la formación de callos y la regeneración de plántulas en condiciones de salinidad (Figura 1).

En este experimento para evaluar la multiplicación de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 en condiciones de salinidad; plántulas de un mes de germinadas en sustrato inerte fueron seccionadas en secciones nodales de 10 a 15 mm aproximadamente, los cuales contenían las yemas axilares de ambas hojas cotiledonales. Estos se colocaron de forma vertical, en dos disposiciones: normal e invertido; en frascos de cristal con 25 ml de medio MS suplementado con 7 g/L de agar, 20 g/L de sacarosa, 0.001mg/L de ANA, 3 mg/L de 6-BAP, 1 mg/L de vitaminas MS y varias concentraciones de NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM).

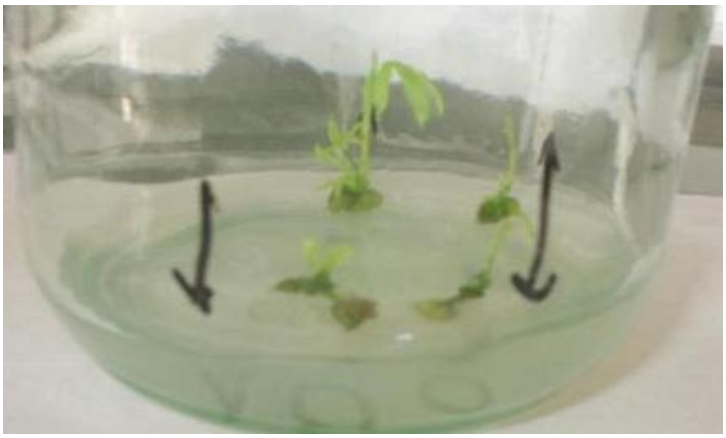

Fig. 1. Posición de las secciones nodales con yemas axilares de hojas cotiledonales de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 en ensayo de micropropagación en condiciones salinas.

La variación somaclonal como vía para desarrollar somaclones tolerantes a salinidad

Numerosos han sido los aportes a la mejora genética debido a la obtención de nuevos somaclones tolerantes por selección de organismos mutantes, obtenidos por variación somaclonal inducida por agentes físico, químicos, así como compuestos hormonales como la auxina sintética 2,4-D, adicionados a medio de cultivo. El cultivo *in vitro* ofrece la oportunidad de una vez seleccionado aquellos somaclones con caracteres beneficiosos puedan ser reproducidos vegetativamente mediante la propagación *in vitro*, con altas probabilidades de que los somaclones obtenidos no varíen genéticamente ajustando concentraciones determinadas de hormonas en el medio de cultivo (Fuentes et al, 2001).

Varios autores han sugerido que entre los mecanismos involucrados en la generación de variabilidad genética están relacionados con diferentes causas como son: cambios numéricos y estructurales a nivel cromosómico, activación de elementos transponibles, metilación de ADN y mutaciones puntuales (Peschke et al., 1992). Estas últimas pueden estar ocasionadas por la ocurrencia de recombinaciones mitóticas, tanto por la recombinación genética intercromátidas o intercambios intracromátidas de repeticiones invertidas, provocando pérdida o ganancia de información genética y por consiguiente, variabilidad en el número de secuencias repetidas en tándem (Phillips et al., 1994).

También se han detectado diferencias en la estabilidad genética en regenerantes, relacionadas con el tipo de explante utilizado debido a la existencia de variabilidad preexistente en las diferentes partes de la planta donora. El caso más ampliamente reconocido es la polisomatia (coexistencia de células con diferentes ploidías en el mismo tejido), la cual según lo referido por D'Ammato, (1985), puede ser detectada en el 90% de las plantas. Realizando estudios en tomate, van den Bulk et al., (1990) encontró que el 58 % de los regenerantes obtenidos a partir de hipocótilos presentaban altos niveles de poliploidías, y lo relacionó con la polisomatia detectada en estos explantes a diferencia de las hojas y los cotiledones, donde apenas se observaron células no diploides.

Otros autores han hecho referencia a un mayor porcentaje de aparición de aberraciones cromosómicas asociadas a la regeneración vía organogénesis, la cual según Peschke y

Phillips, (1992) involucra a varias células entre las que puede presentarse diferencias en la dotación cromosómica. Aunque se ha demostrado que también puede ocurrir en la embriogénesis somática de algunos cultivos como la alfalfa y especies del género *Citrus* L., capaces de regenerar a partir de cultivos mixoploides (Gmitter et al., 1991).

El tiempo en cultivo también ha provocado la aparición de regenerantes con diferentes niveles de poliploidías, motivado por diferentes causas como: diferencias en los requerimientos metabólicos de los tejidos en cultivo con relación a las plantas i*n vivo* y acumulación de mutaciones por un incremento en el ritmo de las divisiones celulares (Peschke y Phillips, 1992), entre otros.

En relación con la influencia del cultivo de tejidos, en estudios realizados con *S. guianensis* cv. CIAT- 2243, por Miles et al., (1991), se describieron varios cambios fenotípicos en regenerantes mantenidos en cultivos durante un año, provocados por un incremento en el número cromosómico de la especie originaria diploide a tetraploides. Aunque otros trabajos relativos al género *Stylosanthes* han descrito diferentes cambios tanto en caracteres cuantitativos (Valarini et al., 1997), como cualitativos (Godwin et al., 1990), estos no han hecho referencia a posibles causas genéticas. En los conteos cromosómicos efectuados en regenerantes de callos iniciales de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 (Fuentes, 2001) no se encontraron cambios en cuanto a número y morfología en comparación con las plantas élites.

La determinación de la actividad enzimática de enzimas antioxidantes como método para la identificación de somaclones tolerantes

Las evidencias más consistentes de que existe una correlación entre la expresión elevada de enzimas antioxidantes y el incremento de la tolerancia a distintas condiciones estresantes en las plantas (Foyer y Groten, 2003), provienen de estudios con plantas transgénicas. A continuación se resumen algunos de los trabajos más relevantes en relación a este aspecto.

La producción de plantas transgénicas portando determinados genes que proveen protección bajo condiciones de sequía ha sido extensa y las plantas fueron producidas con el objetivo de elevar la tolerancia al estrés por salinidad (Khanna-Copra y Sinha, 1998).

Actividades enzimáticas elevadas de las enzimas SOD, ascorbato peroxidasa, catalasa y glutatión reductasa fueron reportadas por varios autores en genotipos tolerantes a estreses como altas temperaturas, sequía y salinidad (Sairam et al., 1997; Sairam et al., 2000; Sairam et al., 2004).

Un incremento en las actividades SOD, peroxidasas, glutatión reductasa, catalasa fueron encontradas por varios autores en respuesta a estrés salinidad así como una elevada actividad antioxidante en especies y variedades tolerantes (Sairam y Srivastava, 2002) reportaron comparativamente elevadas actividades de Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa en la fracción cloroplástica y Mn-SOD en la mitocondrial en genotipos tolerantes de trigo en respuesta a estrés salino. Estudios en plantas transgénicas de tabaco muestran que la expresión incrementada de SOD induce tolerancia a estreses abióticos como bajas temperaturas y estrés hídrico (Bohnert y Shevelera, 1998).

En semillas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen que codifica para una peroxidasa de la pared celular, son más tolerantes al estrés salino durante la germinación, debido probablemente a una mejorada capacidad de retener el agua para la germinación como resultado de modificaciones físicas de la permeabilidad al agua en la pared (Amaya et al., 1999). Trabajos de transgénesis en varias especies de plantas que manifiestan una reducida actividad catalasa mostraron una elevada sensibilidad al estés salino (Willekens et al., 1997). Varios trabajos sobre transgénesis en plantas han corroborado que las plantas con una supresión de las actividades de enzimas antioxidantes son hipersensibles al ataque de patógenos y condiciones de estrés abiótico (Avsian-Kretchmer, et al., 2004). La sobreexpresión por vía transgénica en tabaco de los genes NtGST/GPX que codifican para las enzimas glutatión-S-transferasa y glutatión peroxidasa, mejoraron la resistencia al estrés salino debido a la eliminación de las ERO y la prevención contra los daños en membrana (Roxas et al., 1997).

Influencia de la salinidad en la organogénesis directa
Particularidades e importancia de la micropropagación

Las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos, gracias a su propiedad de titipotencia y de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciban. La micropropagación es una vía directa de organogénesis, donde las células se vuelven componentes para responder a cierto tipo de estímulo organogénico sin pasar por la fase de desdifernciación de la organogénesis indirecta.

La micropropagación o multiplicación vegetativa *in vitro* ha adquirido una gran importancia en los últimos años, en el campo de la producción de plantas ornamentales (Castelblanque et al., 2008), en plantas forestales y frutícolas de difícil propagación, además de plantas raras o endémicas en peligro de extinción, así como en la conservación de germoplasma. Frente a las técnicas de propagación convencionales, las técnicas de cultivo celular suelen ofrecer mayores tasas de multiplicación, tiempos de reproducción más cortos, requieren menos espacio y esto se traduce en general en un menor costo y mayor eficacia.

La micropropagación o propagación masiva es una rama de los métodos de mejora y producción de semillas, aplicadas en trabajos de cultivo *in vitro* Esta biotenología abarca desde el cultivo de ápices hasta la producción de embriones somáticos en fermentadores y la formación de semilla artificial. Es la tecnología más empleada y con resultados muy positivos. El saneamiento de patógenos especialmente virus es una de las grandes ventajas de estas técnicas y es por eso que se requiere un estrecho trabajo entre biotecnólogos, virólogos, bioquímicos, etc., para el desarrollo óptimo de estas técnicas.

La micropropagación está indicada cuando los métodos convencionales son lentos, no convenientes, o imposibles, cuando es necesaria una rápida multiplicación de genotipos seleccionados, o cuando es necesaria la producción de plantas libres de patógenos y la termoterapia no es aplicable.

- **Ventajas de la micropropagación**

- Miniaturización, ahorro de espacio, costes, labores. Las plantas cultivadas *in vitro* tienen un tamaño reducido, por lo que pueden cultivarse con una gran densidad, centenares de plantas por metro cuadrado de estantería, lo que supone un ahorro de espacio, de superficie de viveros, de costes de mantenimiento y de labores.
- Mantenimiento del cultivo en condiciones asépticas, y con garantía de mantenimiento del estado sanitario de las plantas durante su cultivo *in vitro.*
- Producción durante todo el año, al ser controladas las condiciones ambientales, aunque es necesario ajustar el trasplante a vivero desde el invernadero a la época adecuada.
- Intercambio a través de fronteras, facilitado por la miniaturización y por el control de las condiciones sanitarias.

En España se pone a punto es uso de las biotecnologías en cítricos mejorando genéticamente los cultivares de limoneros, hacia clones tardíos de la variedad 'Fino' con diversos cruzamientos, la obtención de variedades triploides es el camino más prometedor para conseguir nuevas variedades sin semillas". Los protocolos de micropropagación juegan un papel importante en el proceso de mejora, de patrones de cítricos, pues se ha demostrado particularmente útil para producir material de plantación de alta calidad y exento de enfermedades. De esta manera, se asegura una producción uniforme de planta, ya que son plantas clonales, la cual puede ser continuada a lo largo de todo el año y es independiente de la disponibilidad de semilla.

Características generales de la micropropagación

I. *Es una propagación vegetativa,* por medio de la estimulación de la inducción de yemas axilares que darán lugar a nuevos brotes que, una vez enraizados, formarán las nuevas plantas. Es una propagación masiva, ya que la formación de yemas puede ser estimulada en gran número y en corto espacio de tiempo. Además es una propagación clonal, ya que la formación de yemas axilares asegura la producción de plantas conformes genéticamente al tipo original.

II. *Es una propagación in Vitro,* porque tiene lugar en frascos de cultivo (originalmente de vidrio, aunque actualmente se emplea el plástico cada vez más), y con medios de cultivo definidos en los que se controla la composición y concentración de sus componentes. Tiene lugar fuera del ambiente natural, en cámaras de cultivo donde son controladas las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad relativa) a unos niveles óptimos para el crecimiento.

III. *Se mantienen las condiciones asépticas,* en todas las manipulaciones, evitando las contaminaciones por hongos o bacterias que proliferarían con rapidez en el medio de cultivo afectando negativamente al cultivo de tejidos. Para ello es esencial la esterilización del material vegetal y de los frascos y medios de cultivo.

Las micropropagación *in vitro* está fuertemente influenciado por diversos factores que pueden limitar el éxito de esta actividad:

- ***Factores ambientales:***

Se traduce en reproducir las condiciones naturales más favorables. La luz interesa en distintos aspectos: la intensidad, el fotoperiodo y la calidad espectral. La luz es necesaria, fotomorfogénesis tenga lugar y se produzcan brotes de aspecto normal. Intensidades de 1000 a 3000 lux (unos 35 umol m"2 s"1) son suficientes para un desarrollo normal. El fotoperiodo en las especies frutales debe responder a los cambios de duración del día con el crecimiento (primavera) o el reposo (otoño), así que conveniente proporcionar (fotoperiodo de día largo), generalmente de 16 horas. Aunque la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfogénicas por medio del fitocromo, la experiencia demuestra que la luz de tubos fluorescentes de luz blanca (cool white), pobre en longitudes de onda larga, es suficiente para obtener buenos crecimientos. La temperatura se regula en tomo a los 22-25 ºC, pero durante el periodo iluminado, en el interior de los frascos de cultivo es ligeramente superior (1-2 grados) debido al efecto invernadero y estanqueidad casi total necesarias para mantener la asepsia.

- ***Factores nutritivos.***

El medio basal más utilizado y común es el planteado por Murashige (1962), en el cual las concentraciones de sales son elevadas y produce un rápido crecimiento en la mayoría de los cultivos. Este medio puede servir de soporte del explante el cual debe mantener la polaridad y aireación de los tejidos. Los reguladores de crecimiento principales: auxinas y citoquinínas, y ocasionalmente también se encuentra el ácido giberélico.

La diferenciación de un tejido *in vitro* está regulada por el equilibrio entre auxinas y citoquinínas, de manera que si predominan las auxinas se forman raíces, y si predominan las citoquinínas se forman yemas que darán lugar a brotes. Los reguladores de crecimiento más utilizados son el ácido indolbutírico (IBA), una auxina, y la benziladenina (BA), una citoquinina.

En estudios realizados en tegasaste (*Chamaecytisus proliferus* L.) var. *Palmensis*, encontró que, el número máximo de yemas axilares que proliferaron y alargaron por vástago, se logró en presencia de BAP combinada con ANA o AIA, a concentraciones entre 10^{-8} y 2 x 10^{-7} molar.

Fases de la micropropagación

Los principios básicos de la técnica de la micropropagación son iguales en los diferentes tipos de plantas, y fueron descritos acertadamente por Murashige (1974) en un esquema, ya clásico, que consta de tres fases diferenciadas, con requerimientos nutritivos, hormonales y ambientales diferentes:

- ***Fase I. Establecimiento in vitro***

El inicio del cultivo es una fase muy delicada en la que la porción de tejido vegetal que sirve de inoculo (explanto) debe sobrevivir al aislamiento del resto de la planta original y comenzar el crecimiento *in vitro.* El medio de cultivo debe proporcionar al explanto todo lo que necesita para vivir y desarrollarse: nutrientes (sales minerales y compuestos orgánicos como azúcares y vitaminas) y reguladores de crecimiento que estimulen su desarrollo. Dos factores son particularmente importantes en el establecimiento del cultivo; el explanto y la esterilización. La elección del tipo de explanto puede ser determinante para el éxito del establecimiento del cultivo. En frutales, se han utilizado ápices de tallo y las yemas

axilares, en los que los meristemos apicales mantienen las características genéticas de la planta original y son capaces de continuar su crecimiento. En estudios de micropropagación, encontraron que explantes a partir de secciones de nudo se contaminaron en mayor porcentaje en comparación con las yemas extraídas de las cepas, se observó a los siete días; a los nueve días se contaminaron todos los explantes excepto en las yemas extraídas de las cepas cultivadas en medio. Otro aspecto importante es el tamaño, es decir, la cantidad de tejidos que acompañan al meristemo y que juegan un papel nutritivo y de protección a los tejidos meristemáticos. Pero cuanto mayor sea el explanto, mayores posibilidades de introducir bacterias o esporas de hongos existentes en la planta original, aunque también es mayor la probabilidad de supervivencia por lo que hay que tomar una decisión de compromiso. Habitualmente se toman yemas apicales y nudos de ramas con una yema axilar, o yemas aisladas en las que por disección se eliminan los catafílos exteriores y se dejan unos pocos esbozos foliares. En el caso de que el objetivo sea la eliminación de enfermedades viróticas, es necesario reducir el tamaño a 0.1-0.5 mm para asegurarnos de tomar sólo tejidos meristemáticos libres de virus, por lo que las dificultades técnicas para la supervivencia del explanto aumentan considerablemente. Además, hay que considerar el estado de la planta origen, no sólo de su estado sanitario, sino del grado de desarrollo (juvenil o adulto) y de crecimiento (reposo o crecimiento activo). Es aconsejable partir de plantas pre-acondicíonadas, en crecimiento activo bajo condiciones de invernadero o cámara, en las que podamos conocer la "historia" reciente de la planta y situarla en las mejores condiciones. A este acondicionamiento de las plantas se le ha denominado también fase 0 de la micropropagación.

- **Fase II.** ***Multiplicación de propágalos***

La fase del establecimiento del cultivo termina cuando logramos tener cultivos en crecimiento. Entonces es preciso estimular la inducción de yemas que, al crecer, formen nuevos brotes. Estos brotes (propágulos) pueden ser separados y colocados en frascos con medio de cultivo nuevo en cada subcultivo. Al repetir el proceso indefinidamente se obtiene una rápida multiplicación del número inicial de brotes, teóricamente según una progresión geométrica. Dos aspectos principales afectan a la multiplicación: el tipo de yemas inducidas y los subcultivos. Según la concentración y el tipo de reguladores del crecimiento (principalmente citoquininas) y el explanto utilizado, podemos inducir dos tipos de yemas: axilares, que provienen de meristemos preexistentes derivados del meristemo apical, estables genéticamente, y que conservan la conformidad genética con la planta origen; y adventicias, derivadas de tejidos somáticos, principalmente de tejidos desorganizados (callo), y que no son estables genéticamente, pudiendo obtener aberraciones que den lugar a variabilidad genética, no deseada en la propagación clonal. Por lo que debe evitarse la formación de yemas adventicias (Marín**,** 1997).

- **Fase III.** ***Restablecimiento de las plantas a suelo***

Una vez obtenidos los brotes, si han alcanzado un tamaño que los haga manejables (unos 2 cm o más). Además, será necesario provocar la aparición de raíces para regenerar la planta completa. El enraizamiento, puede realizarse *in vitro,* pasando los brotes individuales a un medio con alta concentración de una auxina (generalmente IBA a 1-3 mg/l) y sin citoquininas, durante un periodo corto de inducción de raíces, para ser pasados luego a otro de desarrollo sin reguladores de crecimiento. También es posible realizar el enraizamiento *in vivo,* fuera de los frascos de cultivo, tratando a los brotes como microestaquillas y

aplicándoles tratamientos de auxinas, bien hundiendo la base en auxina en polvo, bien sumergiéndolas en una solución acuosa. Las ventajas del enraizamiento *in vivo* son evidentes, ya que se simplifica el método y disminuye el trabajo, las manipulaciones y el costo por planta. Posteriormente las plantas regeneradas deben sufrir un proceso de aclimatación que las adapte al ambiente exterior, con menor humedad relativa, mayor intensidad luminosa y pasando de un modo de nutrición heterótrofo a otro autótrofo. Durante este proceso, las plantas regeneradas son trasplantadas a túneles de plástico para la aclimatación en los que se mantiene una elevada humedad relativa para evitar la desecación, exponiéndolas diariamente a un ambiente con baja humedad relativa durante periodos de tiempo crecientes, permitiendo la recuperación de las plantas y estimulando las adaptaciones fisiológicas y anatómicas necesarias para controlar la pérdida de agua. La pérdida de agua moderada y controlada que sufren durante el proceso de aclimatación estimula el transporte a través de las raíces y del xilema de agua a los tejidos foliares, compensando la pérdida sufrida, pero también estimula el crecimiento de nuevas hojas, que pueden ser observadas en un corto plazo de una semana. En un plazo de 5 a 6 semanas las plantas pueden posteriormente pasar una temporada breve en umbráculo antes de ser trasplantadas a cajonera o vivero (Marín, 1997).

Limitaciones de la micropropagación

La experiencia de la micropropgación demuestra que se plantean unos problemas específicos en cada fase que limitan los potenciales resultados espectaculares. Las limitaciones ocurren tanto en el establecimiento del cultivo, como en el restablecimiento de las plantas al suelo. Durante la etapa inicial puede ocurrir; crecimiento lento o "cero", contaminación del cultivo, exudados que oscurecen el medio, debidos a la producción y liberación de compuestos fenólicos como respuesta a las heridas y al proceso de esterilización, vitrificación o hiperhidricidad de los tejidos, desorden fisiológico que reduce el crecimiento y multiplicación de los brotes, de origen complejo y difícil de predecir.

Las posibilidades teóricas predicen una multiplicación de los brotes según una progresión geométrica, cuya única limitación sería la falta de capacidad para manejar un número muy elevado de cultivos.

En la fase de restablecimiento de las plantas a suelo. Bajos porcentajes de enraizamiento, que en especies difíciles todavía se desconoce la causa. El complejo metabolismo de la auxina, la existencia de una fase sensitiva y otra inhibidora y la interacción con el estado fisiológico de la microestaquílla pueden tener un papel importante. También podría ocurrir la producción de planta no utilizable, bien por tener poco tamaño y por lo tanto difícil de manipular, bien por ser de baja calidad, con pocas probabilidades de adaptarse durante la aclimatación (Marín et al., 1999).

La micropropagación y la mejora de especies

La productividad de la micropropagación en muchas especies y cultivares de orquídea ha sido la base de la prospera industria mundial productora de vitroplantas (Murashige, 1974); en plantas ornamentales como orquídeas se ha realizado muchos estudios sobre las metodología a utilizar y los estímulos adecuados (combinaciones hormonales) para el aumento de número de brotes axilares utilizando diferentes explantes como ápices caulinares.

Por otra parte en las especies frutales conformadas por plantas perennes que son propagadas vegetativamente. Suelen alcanzar gran tamaño, tener periodos juveniles largos, reposo invernal y un periodo productivo prolongado, y con pocas excepciones, como la fresa o el plátano, son leñosas.

Muchas tienen polinización cruzada por ser auto incompatibles, y son altamente heterozigóticas, siendo algunas especies, híbridos interespecíficos y poliploidescomplejos, por lo que se propagan vegetativamente para evitar que la recombinación genética, inevitable en los cruzamientos sexuales, desestabilicen las combinaciones de caracteres obtenidas mediante la selección.

Por otra parte, las técnicas se han adaptado para la aplicación comercial de la micropropagación. Como las variedades frutales se propagan vegetativamente por injerto de yema, la micropropagación tendrá aplicación principalmente en el caso de los patrones, generalmente propagados por técnicas tradicionales como el estaquillado.

La mayoría de los trabajos realizados en especies forrajeras ha sido para la propagación masiva, las investigaciones realizadas en base al mejor medio basal de soporte y el tipo de explante más adecuado y las combinaciones hormonales; tal es el caso de leguminosas Tagasaste *Chamaecytisus proliferus* (L.) Link subsp. *Proliferus* (Christ.) var. *Palmensis*, una planta endémica canaria, interesante como forrajera, de porte arbustivo alto, en el que se aplica las técnicas de microprapagación para obtener mayor número de brotes en los medios más adecuados de combinación de citoquininas-auxinas, y optimizar el proceso de enraizamiento.

El cultivo de tejido ha sido en los últimos años la técnica más eficiente para la propagación masiva del vetiver (*Vetiveria zizanioides L. Nash*), ya que no produce semillas viables, se reproduce asexualmente (por medio de hijos, vástagos y renuevos). Es de gran importancia por su amplio uso, como protección de suelos contra la erosión, fitoremediador, esta planta produce un aceite que es utilizada en la industria de perfumería, además tiene grandes cualidades como planta medicinal por lo que es considerada como planta milagrosa en Tailandia.

Efecto de la salinidad en la organogénesis directa de plantas.

Una alternativa para estudiar la influencia de las sales sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas es el cultivo de fragmentos nodales con yemas axilares o apicales en medios inductores de organogénesis directa.

La micropropagación ha sido utilizada para estudiar los efectos de altas concentraciones salinas sobre el contenido y la actividad ascorbato peroxidasa en *Morus alba* cv. Khonpai, variedad tolerante a la salinidad. Múltiples brotes de un cultivar fueron crecidas en medios con concentraciones crecientes de NaCl. Al incrementarse el NaCl hasta 150 mM se produjo una ligera reducción del crecimiento, el cual fue completamente inhibido produciéndose necrosis del tejido foliar para 200 mM de NaCl (Harinasut et al., 2000).

La influencia del NaCl en la brotación de segmentos nodales ha sido estudiada en diferentes cultivos como *Solanum tuberosum* (Gómez-Galera et al., 2006), en *Saccharum officinarum* (Akhtar et al., 2004) y en la especie forrajera *Chloris gayana* Kunth. En el caso de la papa, la formación de raíces fue estimulada para concentraciones de 30 mM de NaCl, mientras que para concentraciones mayores el crecimiento no se afectó. Sin embargo, la salinidad fue más perjudicial para el desarrollo de raíces que de brotes. En el caso de la caña de azúcar el ritmo y porcentaje de emergencia de los brotes, la longitud y masa seca de tallos y raíces y el número de raíces nodales decreció con el aumento de las concentraciones de NaCl. La habilidad de tolerar la salinidad fue atribuida al desarrollo de una mayor masa radical y mayor concentración de nutrientes en el genotipo tolerante (Gómez-Galera et al., 2006). Los estudios en *Chloris gayana* Kunth sugirieron a sus autores Kunth Córdoba et al., (2001) que los cambios en la capacidad de las raíces para metabolizar las reservas pudieron tener mayor influencia en que la propia capacidad para reservar las sustancias en el control de la elongación de las raíces.

La etapa de micropropagación puede ser la etapa culminante de una estrategia de mejora en la que una vez obtenida los clones tolerantes, estos sean micropropagados para aumentar el número de individuos.

Conclusiones

El cultivo *in vitro* constituye una técnica biotecnológica de gran importancia como apoyo en la búsqueda de somaclones tolerantes a salinidad de leguminosas forrajeras. El aporte fundamental se basa en la posibilidad de regenerar clones de plantas de elevada resistencia a estrés salino y la micropropagación acelerada, para la obtención de grandes volúmenes de plantas con características deseables. Por otra parte, la inducción de mutaciones a partir de los medios de cultivo, brinda la posibilidad para una selección de los regenerantes de mayor tolerancia a este estrés abiótico a partir de la variabilidad genética que se puede lograr por esta vía. *Stylosanthes guianensis* constituye una especie promisoria para el su mejora por cultivo *in vitro*, ensayos posteriores con este cultivar permitirá la obtención por vía organogénica de somaclones tolerantes de alto valor en la ganadería.

REFERENCIAS

Akhtar, N. 2006. Callogénesis and Organogénesis Response of Wheat Cultivars under sodium Chloride Salt stress. Pakistan Journal of Biological Sciences. 9 (11): 2092-2096.

Amaya, I.; Botella, M.A.; de la Calle, M.; Medina, M.I.; Heredia, A.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M.; Quesada, M.A. & Valpuesta, V. 1999. Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Letters*. 457: 80–84.

Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants, *Critical Reviews in Plant Science*. 13: 17-42.

Bohnert, H.J. & Sheveleva, E. 1998. Plant stress adaptations, making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology* .1: 267–274.

D'Ammato, F. 1985. Cytogenetics of plants cell and tissue cultures and their regenerates. CRC Crit. *Rev. Plant*. Sci. 3: 73-112.

Foyer, C. H, and Groten, K. 2003. Oxidative Stress. *Genetic Modification, Applications/Oxidative stress*. 419-430.

Fuentes, Leticia. 2001. Estudio de la organogénesis indirecta de *Stylosanthes guianensis* (Aubl) Sw cv. CIAT-184. La Habana. Tesis presentada en opción al título académico de Master en Ciencias y Biología Vegetal.

Fuentes, L.; Mesa, A.; Ruíz, M. L.; Peláez de Lucas, M. I. y Fernández, M. 2005. Estudio histológico en callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. *Pastos y Forrajes*. 28(3):199-202.

Gmitter, F. G.; Ling, X.; Cai, C. and Grosser, J. W. 1991. Colchicine- induced polyploidy in Citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Sci*. 74: 135- 141.

Godwin, I. D.; Cameron, D. F and., Gordon, G. H. 1990. Variation among somaclonal progenies from three species of *Stylosanthes*. *Austr. J. Agric. Res*. 41: 645- 656.

Harinasut, P.; Srisunak, S.; Pitukchaisopol, S. y Charoensataporn, R. 2000. Mechanisms of Adaptation to Increasing Salinity of Mulberry: Proline Content and Ascorbate Peroxidase Activity in Leaves of Multiple Shoots. *Science Asia*. 26: 207-211.

Hassanein, A.M. 2004. Effect of relatively high concentration of mannitol and sodium chloride on regeneration and gene expression of stress tolerant (*Alhagi graecorum*) and stress sensitive (*Lycopersicon esculentum L*.) plant species. Bulg. *J. Plant. Physiol*. 30 (3-4): 19-36.

Jiménez, E. 1998. Generalidades del Cultivo In Vitro. In: Perez Ponce, JN. (ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. p. 369-390.

Khanna-Chopra, R. Sinha, S.K. 1998. Prospects of success of biotechnological approaches for improving tolerance to drought stress in crop plants. *Current Science*. 74:25-34.

Kitto, S.L. 1997. Commercial Micropropagation. *Hort Science*. 23 (6).

Leidi E.O. y Pardo J.M. 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias -UNR-*. 2 : 069-090.

Murashige, T. and Skoog, F.; 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15, 473-497.

Meijer and Steinbiss, H. H. 1984. Plantlet Regeneration from Suspension and Protoplast Cultures on the Tropical Pasture Legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Annals of Bot.* 52: 305-310.

Meijer and Szabados, L. 1990. Cell and tissue culture of *Stylosanthes spp*. In: Bajaj, Y. P. S., de. Biotechnology in agriculture and forestry. Legumes and oil seed crops. *London Springer Verlag*. Vol 10: 312-322.

Meijer, E.G. 1984. Some Aspects of Long- Term Tissue Culture of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (*Leguminosae*). *J. Plant Physiol*. 117: 131-135.

Mesa, A.R.; Lajonchere, G.; Prieto, M. and Toral, Odalis. 1993. Organogénesis en *Stylosanthes guianensis* cv.CIAT-184. *Pastos y Forrajes* .16 (3): 207-210

Miles, J. W.; Roca, W.M. and Tabares, E. 1991. Assesment of somaclonal variation in *Stylosanthes guyanensis*. (Aubl). Sw., a tropical forage legume. In: Roca, W. M. and Miles, J. W. (eds). Application of tissue Culture in Agriculture. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali. Colombia. p. 249- 256.

, M. 1994. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. FAO agricultural Mills, D., G. Zhang and A. Benzioni, 2001. Effect of different salts and ABA on growth and mineral uptake in Jojoba shoots grown in vitro.*J. Plant Physiol*., 158: 1031–9 services bulletin 108. 87 p.

Morel, G. and Martin, C. 1955. Guerison de pomme de terre demaladie a virus. C. R. Acad. Sci. Paris. p. 1315-1324.

Nabors, M.W.; Gibbs, S.E.; Bernstein, C.S. and Meis, M.E. 1980. NaCl-tolerant tobacco plants form cultured cells. *Zeitscrift fur Pflanzenplysiology*. 97: 13-17.

Peschke, Virginia M. and Phillips, R. L. 1992. Genetic implication of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics*. 30: 41-75.

Phillips, R. L.; Kaeppler, S. M. and Olhoft, P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 91: 5222-5226.

Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo in vitro de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Quecini, V.M.; de Oliveira, C.A.; Alves, A.C.; Vieira, M.L.C. 2002. Factors influencing electroporation-mediated gene trasfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. *Genetics and Molecular Biology*. 25 (1): 73-80.

Roxas, V. P., Smith, R. K., Jr, Allen, E. R. and Allen, R. D. (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. Nature Biotechnology, 15, 988–991.

Sairam, R. K. and Srivastava, G. C.2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long-term salt stress. *Plant Sci*.162: 897–904.

Sairam, R. K.; Deshmukh, P. S. and Shukla, D. S. 1997. Tolerance to drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *J. Agron. Crop Sci.* 178: 171–177.

Sairam, R. K.; Srivastava, G. C. and Saxena, D. C. 2000 Increased antioxidant activity under elevated temperature: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biol. Plant*. 43: 245–251.

Sairam, R.K. y Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*. 86 (3).

Valarini, M. J.; Otsuk, I. P. and Vieira, M. L. C. 1997. Changes in N2 fixation in Stylosanthes scabra derived from tissue culture. *Brazilian Journal of Genetics*. 20 (4): 713- 716.

van den Bulk, R. W.; Laffler, F. J. M.; Lindhout, W. H. and Koornnef, M. 1990. Somaclonal variation in tomato. : Effect of explant source and comparison with chemical mutagenesis. *Theor*. *Appl. Genet*. 80: 817-825.

Willekens, H.; Chamnongpol, S.; Davey, M.; Schraudner, M.; Langebartels, C.; Van Montagu, M.; Inze, D. & Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H O and is indispensable for stress2 2defense in C plants. *EMBO Journal*. 16(3): 4806–4816.

Withers, L. A. 1985. Preservation of germplasm. Intl. *Rev. Phytology*. Suppl., 11B. p.101-136.

Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 53: 247-273.