

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
ESCUELA DE PRODUCCION VEGETAL  
RECURSOS GENETICOS NICARAGUENSES  
DEPARTAMENTO DE CONSERVACION

TRABAJO DE DIPLOMA

INTRODUCCION A LA TECNICA  
DE  
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Por

JOSE DOLORES CISNE CONTRERAS

Presentado a la consideración del Honorable Tribunal Examinador  
como requisito final para optar al grado de INGENIERO AGRONOMO.

---

Dirección de Investigación y post-grado  
( D.I.P. )

## CONTENIDO

### PRESENTACION

### INTRODUCCION

Capitulo	I.	TECNICAS Y PRINCIPIOS DE CULTIVO DE TEJIDOS	1
	1.1.	DEFINICIONES .....	1
	1.1.1	Crecimiento Organizado .....	1
	1.1.2	Crecimiento Desorganizado .....	2
	1.2	TIPOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS DESORGANIZADOS	2
	1.2.1	Cultivo de callo .....	2
	1.2.2	Cultivo de protoplastos .....	2
	1.2.3	Suspensiones celulares .....	4
	1.3	TIPOS DE CULTIVO DE TEJIDOS ORGANIZADOS ..	4
	1.3.1	Cultivos de organos .....	4
	1.3.2	Cultivo de embriones .....	6
	1.3.3	Cultivo de anteras o polen .....	6
	1.4	MORFOGENESIS .....	7
	1.4.1	Organogénesis Directa .....	8
	1.4.2	Organogénesis Indirecta .....	8
	1.5	EMBRIOGENESIS SUMATICA .....	9
	1.5.1	Embriogénesis Directa .....	10
	1.5.2	Embriogénesis Indirecta .....	10
Capitulo	II.	FACTORES QUE AFECTAN MORFOGENESIS Y CRECI- MIENTO .....	13
	2.1	GENOTIPO .....	13
	2.2	SUBSTRATO .....	13
	2.2.1	Macronutrientes .....	15
	2.2.2	Micronutrientes .....	16
	2.2.3	Vitaminas .....	17
	2.2.4	Aminoácidos .....	18
	2.2.5	Azúcar .....	18
	2.2.6	Agua .....	19
	2.2.7	Reguladores de crecimiento .....	19
	2.2.8	Carbón Activado .....	27
	2.2.9	PH del medio .....	27
	2.2.10	Agentes Quelatos .....	27
	2.2.11	Agentes Solidificantes .....	27
	2.2.12	Suplementos no definidos .....	28
	2.3.	AMBIENTE .....	28
	2.3.1	Temperatura .....	28
	2.3.2	Humedad .....	29
	2.3.3	Luz .....	29
	2.4	FACTORES QUE DEPENDEN DEL TEJIDO .....	30

Capítulo III.	APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS	33
3.1	SANEAMIENTO DE VIROSIAS A TRAVES DEL CULTIVO DE MERISTEMAS .....	33
3.2	ESTUDIO DE LA INTERACCION HUESPED PATOGENO	36
3.3	INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA .....	37
3.4	PROPAGACION CLONAL .....	37
3.4.1	Estados de la micropropagación .....	39
3.5	APLICACIONES EN EL MEJORAMIENTO GENETICO .	43
3.5.1	Obtención de mutantes a partir de células "in vitro" .....	43
3.5.2	Fusión de Protoplastos .....	44
3.5.3	Cultivo de embriones .....	45
3.5.4	Cultivos de plantas haploide .....	46
3.6	CONSERVACION DE GERMOPLASMA .....	47
3.6.1	Método de crecimiento continuo .....	48
3.6.2	Método de criopreservación .....	48
3.6.3	Método de conservación "in vitro" por limitación de crecimiento a tasas mínimas ..	48
3.7	PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	49
Capítulo IV	LABORATORIO	50
4.1	DISPOSICION ESPACIAL DEL LABORATORIO .....	50
4.1.1	Area para elaboración del medio .....	50
4.1.2	Cuarto de transferencia ....4.....	54
4.1.3	Cuarto de crecimiento .....	56
4.2.	CRISTALERIA INSTRUMENTAL Y EQUIPO .....	60
4.2.1	Cristalería .....	60
4.2.2	Instrumental .....	62
4.3.	OPERACIONES DE SIEMBRA Y RECULTIVOS .....	63
4.4.	PERSONAL .....	66
4.5	PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO.....	67
4.5.1	Alternativa para preparación del medio....	67
4.5.2	Preparación del medio basal.....	68
4.5.3	Preparación de reguladores de crecimiento	69
	CONCLUSION .....	71
	BIBLIOGRAFIA .....	72
	GLOSARIO .....	78

## PRESENTACION

Ante la imperiosa necesidad y deber de irnos apropiando del conocimiento tecnológico y científico para ponerlo al servicio de la clase obrera, constituida por los sectores más humildes y dignos de este histórico país que constituye el alma y nervio de la revolución, es que nos hemos avocado a la ardua y difícil tarea de elaborar un texto introductorio a la técnica de cultivo de tejidos, avanzada en el desarrollo de las ciencias biológicas y umbral del enmarañado mundo de la biotecnología e ingeniería genética.

Nuestro texto está dirigido más estrechamente a los estudiantes de educación superior, profesionales y técnicos que tienen como base de trabajo e investigación el reino vegetal, sobre todo las especies cultivadas.

Para dar inicio a la elaboración del texto nos planteamos primeramente definir la función que cumpliría el texto y los objetivos primarios, los cuales los abordamos dentro del marco que se presenta a continuación: hacer un esbozo del desarrollo histórico del cultivo "in vitro"; dar a conocer la terminología y metodología empleada en la técnica de cultivo de tejidos vegetales, presentar las principales aplicaciones y de esta forma hacer posible el empleo por investigadores de otras disciplinas o investigadores que laboran en la misma área; en la resolución de problemas que son difíciles o hasta imposible resolver a través de otras técnicas; exponer los factores principales que hay que tomar en cuenta al hacer uso de la técnica y plasmar de una manera general los elementos y factores a tomar en cuenta en la construcción y funcionamiento de un laboratorio de cultivo de tejidos.

Una vez establecidos los objetivos primarios se definió la forma de cómo estructurar la obra y como abordar cada uno de los temas que aboquiésemos en esta. Como podrá notar el lector, esta se estructuró de la siguiente manera: una introducción a la técnica del cultivo de tejidos mediante la descripción del desarrollo histórico del cultivo de tejidos y los eventos técnicos y científicos más relevantes; cuatro capítulos: capítulo I, en el que se define brevemente cada una de las técnicas desarrolladas hoy en día y términos de uso frecuente, capítulo II, donde se abordan los factores a través de los cuales se puede manipular el tipo de crecimiento y la formación de órganos (tallos, raíz etc.) "in vitro", capítulo III, se abordó de una manera general las aplicaciones prácticas que ofrece la técnica y un IV capítulo, en el que se dan algunas ideas generales sobre la construcción y organización de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Así mismo la obra presenta un listado bibliográfico que permita al lector ahondar sobre temas

específicos . Al final de nuestra obra se presenta un glosario con una serie de términos que se han venido incorporando en el transcurso del desarrollo del cultivo de tejidos.

Todo esto que nos planteamos desarrollar en este texto se fundamenta en consultas bibliográficas, la cual en su mayoría reza en inglés, siendo escasa dicha literatura en español, y en los dos años de experiencia que hemos tenido en el constante trabajo para crear y desarrollar dicha técnica en el área de conservación del Programa de Recursos Genéticos, Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias.

## INTRODUCCION

El cultivo "in vitro" de tejidos vegetales es una técnica que se ha desarrollado hace pocos años y que se inserta en la llamada "revolución biológica" que se está verificando en el campo científico, debido a los grandes avances que se han conseguido en la biotecnología en los últimos 20 años.

El cultivo de tejidos o cultivo "in vitro", según como se encuentra en literatura, se ha involucrado hoy día en diferentes ramas de la investigación en los campos de la producción vegetal, producción de metabolitos, bioquímica, fisiología y genética de las plantas y es además una técnica afirmada para la propagación clonal rápida de plantas con fines comerciales. La expresión "in vitro" deriva del latín y significa en vidrio, es debido al hecho que los cultivos se han efectuado desde el comienzo y hasta ahora en recipientes de este material y aún cuando se utilicen contenedores diferentes, por ejemplo en plástico, se sigue utilizando la expresión "in vitro".

Los orígenes del cultivo de tejidos se pueden individualizar en los estudios de los biólogos entre el final del siglo pasado y el comienzo del actual. Aún cuando sea difícil determinar un punto de partida, importantes antecedentes se remontan a 1860-1861 años en que SAICH (1860) y KNOP (1861) individuaron y aislaron las sustancias más importantes absorbidas por las plantas. Se volvió real entonces la posibilidad de cultivar plantas en un medio artificial que suministrase todos los nutrientes. El resultado de estas observaciones fue la elaboración de la solución de KNOP, emoleada hasta la fecha y que se usó como componente base de los medios de cultivo. Ya en ese tiempo los biólogos habían intuido y acuñado el concepto de totipotencia de las células vegetales (MORGAN, 1901): o sea de la capacidad que tiene cualquier célula vegetal, en condiciones adecuadas de regenerar un organismo completo.

HABERLANDT (1902) realizó experimentos de cultivo de células del mesófilo foliar de "Tradescantia" en medio artificial. El observó el crecimiento de una masa amorfa de células indiferenciadas que llamó callo, definición que aún se mantiene.

En 1934 WHITE, demostró la posibilidad de cultivar con éxito órganos vegetales, utilizando en sus experimentos raíces de *Lycopersicum esculentum*.

Desde esta fecha hasta los años 1950-60 se han sucedido muchas pruebas de cultivo de diferentes partes de plantas en medios artificiales, conllevando esto a indudables avances en la técnica; Skoog (1944) descubrió las cualidades nutricionales del agua de coco, Skoog y Miller (1957) avanzaron la hipótesis de que

la iniciación de tallos y raíces en callos cultivados, podían ser regulados por rangos de auxinas y citocininas. Pero sin embargo fueron escasos los resultados en la diferenciación "in vitro" de tejidos y en la regeneración.

La teoría de la totipotencia fue confirmada experimentalmente por primera vez por los experimentadores Stewart (1958) y Reinert (1959) los cuales, separadamente, lograron regenerar una planta completa a partir del cultivo de células del floema secundario en zanahoria.

El estudio guía en el moderno cultivo de tejidos es, sin embargo, la publicación de MURASHIGE y SKOOG del 1962 sobre el crecimiento de callo en cultivo de tabaco, partiendo de pequeñas porciones de mesófilo rolar y secciones de tallo, condujeron una serie de estudios sobre la composición del medio correspondiente a la velocidad máxima de crecimiento del callo.

Tomando en cuenta estudios precedentes perfeccionaron un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de callo de tabaco que todavía se utiliza, con pequeñas modificaciones, en muchos tipos de cultivo para una gran variedad de especies vegetales.

Los mismos autores, variando el medio de cultivo y las hormonas, sucesivamente lograron regenerar desde una célula rediferenciada del callo una planta completa, demostrando sin duda la validez de la teoría de la totipotencia celular, postulada por MORGAN en 1901.

A partir de esta publicación se intensificaron los estudios relativos al efecto de la composición del medio de cultivo sobre el tipo de crecimiento y sobre todo los efectos y las interacciones de los reguladores de crecimiento.

Alrededor de los años 70, sobre todo por los estudios de Morel sobre la propagación de orquídeas, se evidenciaron las posibilidades de aplicación práctica del cultivo de tejido en la propagación vegetal, demostrando la posibilidad de producir un número mayor de plantas, respecto a las metodologías tradicionales y en un tiempo menor.

Hoy en día casi todos los países de Europa, Asia y América existen laboratorios que de una u otra manera trabajan en cultivo de tejidos.

En el campo de la propagación clonal la introducción de la micropropagación "in vitro", así denominada por las reducidas dimensiones del material de partida o explante, ha sido una verdadera revolución, resolviendo el problema de la propagación de muchas especies que siempre había sido difícil.

Se considera también herramienta básica en la biotecnología, o sea en todas las posibles utilidades de microorganismos o células en la producción de metabolitos y en la utilización de reacciones bioquímicas. Se entiende la importancia de esas

técnicas cuando se considera que el 40% de los productos consumidos por el hombre son de origen biológico.

Es además una técnica de uso obligado en las investigaciones de ingeniería genética acerca de la posibilidad de intervenir en el patrimonio genético en manera dirigida, por ejemplo con manipulaciones de genes, al contrario de las metodologías tradicionales que actúan disfrutando de la variabilidad natural, a lo cual debe seguir una fase de evaluación para reconocer eventuales individuos promisorios.

En el cuadro mundial se puede relevar que la propagación clonal se lleva a cabo por su mayor parte en laboratorios privados que comercializan las plantas con fines lucrativos, siendo ésta ya una técnica de producción industrial, que en muchos cultivos ha pasado ya su fase experimental.

Las aplicaciones más sofisticadas, como las referentes a la ingeniería genética y a la producción de metabolitos, se encuentran en un estadio inicial y son efectuadas en laboratorios universitarios o de otras instituciones públicas y privadas que siguen investigando en búsqueda de otras posibles utilidades.

## CAPITULO I

### TECNICAS Y PRINCIPIOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS

Para apreciar todas las posibles aplicaciones y posibilidades que ofrece el cultivo de tejidos, es necesario antes de todo definir la terminología específica que ha ido desarrollándose acorde al perfeccionamiento de la metodología de esta nueva técnica.

En este capítulo nos proponemos describir principios, técnicas y terminología que se han desarrollado hasta ahora en relación al aislamiento y cultivo aséptico de material vegetal.

#### 1.1 DEFINICIONES.

Con la palabra "explante" se indica cualquier parte de planta que se siembre en condiciones de asepsia.

Cuando se siembra material vegetal en medio de cultivo estéril se pueden verificar dos tipos de crecimiento:

**1.1.1 Crecimiento Organizado:** Ocurre cuando partes organizadas de plantas como puntos de crecimiento de tallos o raíces, yemas florales, frutos pequeños y embriones transferidos a medios de cultivos estériles pueden desarrollar sus propias estructuras, y cuando se forman estructuras organizadas partiendo del cultivo de tejidos desorganizados. El procedimiento de formación de órganos "in vitro" se llamará organogénesis o morfogénesis.

**1.1.2 Crecimiento Desorganizado:** Este tipo de crecimiento raramente se encuentra en la naturaleza; a veces se observa en las plantas en correspondencia a heridas o traumas de varios tipos; que se presentan en estos casos como una multiplicación celular descontrolada que origina una estructura desorganizada (callo) en la cual todas las células son iguales y no especializadas. Ocurre con bastante frecuencia cuando porciones de plantas son cultivadas "in vitro".

Tejidos desorganizados se pueden incrementar en volumen a través de subcultivos y se pueden mantener en medio sólido o líquido por periodos largos.

La expresión "cultivo de tejidos" se usa en ambos casos, no obstante, en sentido estrecho se puede referir sólo a los agregados desorganizados constituidos por células, siendo el otro caso el cultivo de estructuras que comprende más de un tejido.

## 1.2 TIPOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS DESORGANIZADOS

### 1.2.1 Cultivo de callo

El callo es un tejido constituido por células parenquimatosas, coherente pero no organizado y amorfo producido por una vigorosa división celular. A menudo ocurre en la naturaleza en las plantas debido a traumas de varios tipos, por ejemplo cortes en el tallo o la raíz, ataque de algunos microorganismos (Braun, 1954); ataque de insectos (Pelet et al, 1967).

Con la técnica del cultivo de tejidos se puede inducir la formación de callos en órganos y tejidos que comúnmente no producen esta estructura (Street, 1969).

"In vitro" el callo se inicia de pequeñas partes de plantas sembradas en medio estéril. Tejidos típicamente cultivados incluyen el cambio vascular, parenquima de reserva, periciclo de raíces, cotiledones y mesófilo foliar (Yeoman y Macleoid, 1977).

Los requerimientos nutricionales para la iniciación dependen del tipo de explantes. La mayor parte de los tejidos excisos requieren la adición de uno o más reguladores de crecimiento. Se pueden clasificar los explantes según que necesiten de auxina, citocinina, auxina más citocinina, extractos naturales complejos. Hay callos que son muy lignificados y duros, otros que se pueden separar en fragmentos con facilidad; con respecto al color hay callos amarillos, blancos, verdes, pigmentados.

La característica más importante del callo desde el punto de vista funcional es que de este crecimiento cáótico se pueden potencialmente desarrollar raíces, tallos y embrioides (Hitchison et al, 1977).

En la masa del callo se presentan centros localizados de actividad meristemática, en condiciones oportunas es posible lograr la regeneración de plantas a partir de una o más células. Un problema asociado al uso del callo es el de la citología nuclear de las células durante cultivos prolongados (Sunderland, 1977), pues pueden ocurrir aberraciones cromosómicas, mutaciones génicas y reduplicación resultando poliploidía.

La frecuencia de estos cambios varía con la composición del medio, la edad del cultivo y la especie. Cultivo de callo se ha establecido en plantas dicotiledóneas, monocotiledóneas, gimnospermas, helechos y musgos.

### 1.2.2 Cultivo de protoplastos

Protoplasto es una célula vegetal privada de su pared, que se mantiene viable y que en medio líquido asume una forma esférica como resultado de la presión osmótica (fig. 1). La obtención de los protoplastos puede ocurrir de 3 maneras:

Rompimiento mecánico de las paredes celulares.

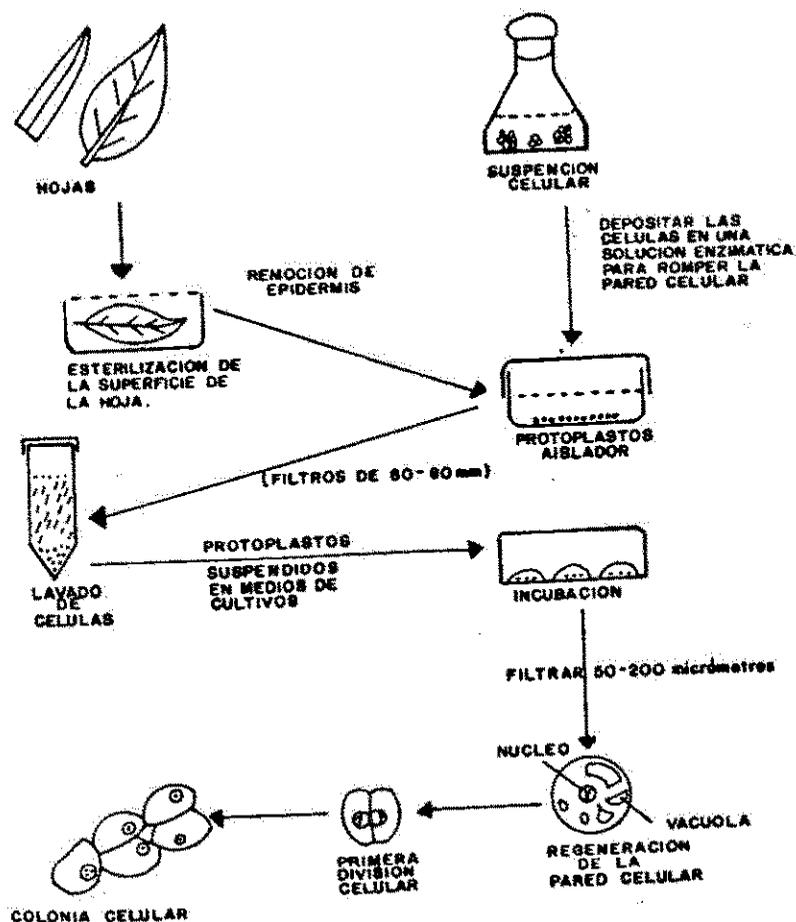
A través de digestión enzimática, que es el más empleado.

Combinando la acción mecánica y la enzimática.

La técnica que se está tratando de desarrollar a partir de este tipo de cultivo es la fusión de protoplastos; la que en pequeños porcentajes ocurre espontáneamente durante el aislamiento enzimático, se están perfeccionando técnicas para aumentar la frecuencia.

Hasta ahora se ha conseguido la fusión entre protoplastos de la misma variedad, entre protoplastos de la misma especie (Fusión intraespecífica), y entre plantas de especies diferentes (fusión interespecífica). En los últimos dos casos cuando se verifica la fusión de los núcleos se originan células híbridas llamadas heterocariocitas. Existen técnicas para individuar las células fusionadas y para regenerar de éstas plantas completas que son híbridos somáticos.

Figura 1. Cultivo de protoplastos.



### 1.2.3 Suspensiones celulares

Células vegetales pueden ser cultivadas en medio líquido agitado. Generalmente las suspensiones celulares se obtienen transfiriendo fragmentos de callos en medio líquido que se tiene en agitación por todo el periodo de cultivo.

Aunque se requiera más tiempo se puede obtener la suspensión a partir de otros tipos de explantes, por ejemplo fragmentos de cotiledones o hipocotilos. La obtención de una separación completa y por lo tanto una suspensión de células singulares es improbable (Ingram, 1976). El grado de dispersión es muy dependiente del tipo y cantidad de regulador de crecimiento, generalmente se puede incrementar con auxinas.

Existen 2 tipos de cultivos de células:

- Cultivo discontinuo: en el cual las células se cultivan en volúmenes determinados de medios hasta que se agoten los nutrientes.
- Cultivo continuo: se caracteriza por el crecimiento continuo de la suspensión celular debido a una renovación constante del medio.

La regeneración de plantas se puede obtener de dos maneras: directamente a partir de las células de la suspensión celular o trasplantando células sobre un medio sólido y estimulando la formación de callo del cual se tratará de lograr el desarrollo de plantas.

## 1.3 TIPOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS ORGANIZADOS

### 1.3.1 Cultivos de órganos

Se pueden cultivar "in vitro": órganos determinados, o sea, que están destinados a tener tamaño y forma definidas (hojas, flores, frutos) y órganos indeterminados, en los cuales el crecimiento es potencialmente ilimitado (meristemos de tallos y raíces).

El cultivo de órganos determinados se ha conseguido hasta ahora en pocas especies, por ejemplo en Nicotiana tabacum, Cucumis sativus, Viscarias etc. Se ha utilizado en varios estudios, por ejemplo, en la posibilidad de polinización "in vitro" y para determinar la influencia de los factores nutricionales sobre el desarrollo de las flores.

En el cultivo de órganos indeterminados se presentan el cultivo de raíces, de meristemos y de yemas.

El cultivo de raíces se establece a partir de meristemas de raíces primarias y secundaria, en muchas plantas. Raíces de Datura, Citrus y Solanum se han cultivado por tiempo

indeterminado. Generalmente el explante se obtiene de plantas germinadas en condiciones asépticas o desde semillas que están completamente axénicas. El explante produce un sistema radical completo.

Este tipo de cultivo ha sido utilizado en investigaciones sobre nemátodos como método para cultivar estos parásitos en condiciones asépticas. Se ha utilizado también para el cultivo de hongos de micorriza y para estudio sobre las bacterias que fijan el nitrógeno en las leguminosas.

Respecto al cultivo de yemas y meristemos se presentó el problema de determinar el tamaño mínimo del explante que no provocara pérdida de la capacidad regenerativa. Smith y Murashige (1970) consiguieron la regeneración de plantas partiendo del meristemo apical desprovisto de cualquier primordio foliar. La aplicación del cultivo de yemas de tallos fue realizada por primera vez por Morel (1960), mediante el cultivo de meristemos de orquideas, logrando la formación de tallos, los cuales generaron sucesivamente estructuras llamadas protocormos. Estos excisos y trasplantados en medio de cultivo fresco generaron plantas completas. Las dos técnicas difieren en la dimensión del explante: el cultivo de meristemos tienen dimensiones entre 0.1 y 1mm y está formado sólo por el meristemo y en el cultivo de yemas el explante presenta dimensiones mayores, desde 5 a 10mm y está acompañado de primordios foliares.

Del crecimiento de estos tipos de explantes se origina un pequeño tallo organizado, en un primer momento desprovisto de raíces. El cultivo de yemas es la técnica de mayor uso en la propagación clonal rápida de plantas. Tratados importantes sobre este argumento son los de Murashige (1974), De Fossard (1976) y Reinert y Bajaj (1977).

La aplicación más importante del cultivo de meristemos es referente la obtención de plantas libres de enfermedades (Vea cap. III).

Los requerimientos para crecimiento y desarrollo "in vitro" de yemas o meristemos varían con el tamaño del explante, el tipo de desarrollo que se quiere y el genotipo de la planta. Explantes de meristemos requieren siempre reguladores de crecimiento, yemas con algunos primordios foliares pueden no necesitarlos.

Algunos factores nutricionales juegan un papel importante, es esencial por ejemplo una alta concentración de iones K, como en el medio MS (Morel, 1975).

El cultivo requiere auxina exógena, la citocinina puede ser o no necesaria (Shabde y Murashige, 1977).

Se puede estimular también la formación múltiple de brotes, deseables en propagación clonal, generalmente con altos contenidos de citocinina; el ácido giberélico se requiere a veces para algunos cultivos.

### 1.3.2 Cultivo de embriones

Embriones sacados de semillas se pueden usar como explante en propagación. A menudo se aíslan embriones y se siembran para obtener plantas libres de microorganismos que se utilizan como fuentes de explantes. Esta técnica se usa también para la propagación de plantas que tienen semillas con un período muy largo de dormancia o viabilidad muy baja. Generalmente, el cultivo de embriones inmaduros es más fácil que el de los embriones maduros; la disección requiere de muchos cuidados para no dañar el embrión.

Hay plantas que producen semillas que no tienen estructuras de conservación y son de dimensiones muy pequeñas; así la disección no es posible por lo que se ponen a germinar "*in vitro*" las semillas enteras. El ejemplo más notorio es el cultivo de semillas de orquídea.

Mucho interés tiene esta técnica para el mejoramiento ante la presencia de los mecanismos naturales que impiden el cruzamiento sexual: incompatibilidad precigótica, que consiste en la no interacción polen-estigma debido a factores anatómicos o fisiológicos que impiden que ocurra la fertilización e Incompatibilidad postcigótica, en cuyo caso se da la formación del cigoto, pero éste no establece conexiones con el endosperma y en poco tiempo aborta.

La incompatibilidad precigótica se puede superar en ciertos casos por medio de una técnica perfeccionada por Kanta et al; (1962) llamada polinización "*in vitro*". La incompatibilidad postcigótica en algunos casos se ha resuelto aislando el embrión, generalmente desde semilla inmadura, y cultivándolo "*in vitro*".

Los híbridos producidos por la unión de especies incompatibles a veces resultan ser estériles, que sin embargo no constituye un problema en plantas que se reproducen vegetativamente.

Se han obtenido híbridos valiosos en algunos frutales (Tukey, 1934; Skirm, 1942), y en algunas hortalizas del género *Melongena* (Sharma et al. 1980)

### 1.3.3 Cultivo de anteras o polen

En 1953 se descubrió la posibilidad de cultivar "*in vitro*" tejidos haploides desde polen de Ginko; desde entonces se ha efectuado muchos estudios sobre este argumento.

En este tipo de cultivo el explante está constituido por granos de polen o por anteras, es decir, por células gaméticas que tienen genotipo haploide.

La importancia es que cultivando "*in vitro*" el polen es posible obtener directamente embriones o callos embriogénicos con el desarrollo de plantas que presentan genotipo haploide. Este módulo de formación de plantas se llama androgénesis.

Esta técnica ha sido empleada con éxito en 121 especies vegetales (De Fossard, 1976). Entre los géneros en los cuales se han obtenido mayores éxitos citamos: Datura, Nicotiana, Solanum y algunas Brassicaceae.

Esta técnica es de particular interés en el trabajo de fitomejoramiento y en la evaluación de híbridos de cereales.

#### 1.4 MORFOGENESIS

Se puede inducir en tejidos cultivados "in vitro" la formación adventicia de órganos como tallos, raíces, hojas y flores. Este proceso se denomina morfogénesis u organogénesis. También se puede dar la formación "in vitro" de embriones, los que se desarrollan desde células somáticas, pero en este caso, según una definición rigurosa no se puede hablar de organogénesis; no siendo calificable el embrión como órgano en cuanto a su capacidad de vida independiente.

Caulogénesis, rizogénesis y embriogénesis son de mucha importancia en la regeneración, la que se logra en la mayoría de los casos a través de la formación de tallo adventicios, los que son sucesivamente enraizados o desde embriones somáticos. Estas estructuras se originan de una célula o de un grupo de células que bajo el estímulo de las condiciones nutricionales y hormonales se vuelven activas y tienen la capacidad de producir un determinado órgano. Ese grupo de células que dan origen a los órganos adventicios se definen como meristema morfogenético; esta estructura puede surgir en dos vías diferentes: directamente desde células del explante, o sea, células diferenciadas o desde células no especializadas y desorganizadas, es decir, células de callo o de suspensiones celulares.

Hicks (1980) describió estos dos tipos de morfogénesis como directa e indirecta, respectivamente y desde entonces se ha adoptado en el uso común esta terminología.

Cuando la morfogénesis ocurre directamente desde el explante se define directa; cuando pasa por el tejido de callo la morfogénesis se define indirecta.

No siempre es posible distinguir el origen de la morfogénesis; así por ejemplo, tallos originados directamente del explante pueden encontrarse rodeados por tejidos proliferativos originados de células cercanas, por lo que aún con el auxilio del microscopio no es posible establecer con certeza si la nueva estructura se ha originado por organogénesis directa o organogénesis indirecta. La importancia de esta distinción radica en el hecho de que el tejido del callo es generalmente caracterizado por una activa mutabilidad genética en sus células, así pues, los riesgos de mutaciones en plantas originadas desde callo son mayores.

#### 1.4.1 Organogénesis directa

Cuando se transfiere al medio de cultivo un explante adecuado: brotes del tallo, raíces, embriones somáticos y primordios florales se desarrollan directamente sin pasar por el estado de callo. La organogénesis directa depende de las dimensiones del explante, del tipo de explante, de las condiciones nutricionales y de las condiciones ambientales. Así por ejemplo, explantes de dimensiones pequeñas pueden obstaculizar el proceso de morfogénesis directa.

El desarrollo de tallos adventicios pueden ser obtenidos de explantes provenientes de diversos órganos en muchísimas especies. Meristemos de tallos formados directamente del explante se pueden iniciar 48 horas después de la siembra en medio estéril. A veces el meristemo morfo-genético se origina de una célula; cuando se origina de más de una célula puede aparecer un alto porcentaje de quimera.

#### 1.4.2 Organogénesis Indirecta

Un medio de cultivo y reguladores de crecimiento que favorezcan la formación rápida de callo, generalmente nos conducen a la iniciación de un sistema morfo-genético que origina raíces y tallos. En algunos casos la organogénesis ocurre en el mismo medio de cultivo en que se desarrolló el callo, pero en la mayoría de los casos es necesario realizar transferencias a medios con combinaciones de reguladores de crecimiento diferentes. Las células que originan los órganos son células pequeñas con el citoplasma denso y el núcleo grande; estas células se llaman meristemoides. En el callo los meristemoides (y por tanto la formación de raíces y tallos) pueden estar situados en la superficie o interior; el primer caso es el más frecuente.

Es difícil estudiar los factores que influyen sobre la organogénesis, pudiendo depender su estímulo al mismo tiempo de los componentes del medio, compuestos endógenos producidos durante el cultivo, sustancias presentes en el explante, así como de los factores ambientales.

Un papel muy importante es jugado por las hormonas. Por ejemplo Skoog y Miller (1957) encontraron que una relación relativamente alta auxina-citocinina inducía la formación de raíces en callo de tabaco, mientras que una baja proporción entre las mismas hormonas favorecen la producción de brotes.

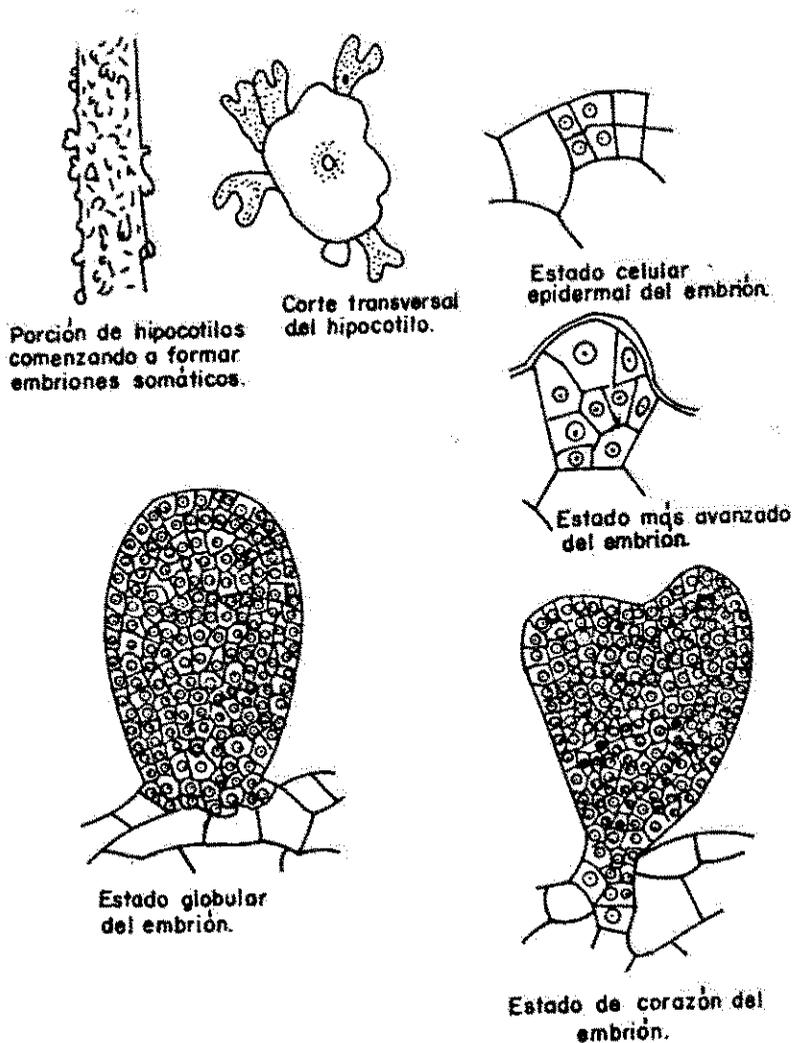
En ambos casos de morfogénesis, directa e indirecta, un grupo de células inicial del meristema morfo-genético, adoptan una determinación, que decide el sucesivo módulo de desarrollo. En el caso de cultivo de tejidos desorganizados, la determinación es aparentemente inducida por el efecto de los reguladores de crecimiento en combinaciones con los factores nutricionales correctos. En la morfogénesis directa, aunque los reguladores de

crecimiento influyen en el proceso, células del explante en muchos casos parecen tener una parcial predeterminación, hacia un particular tipo de desarrollo morfo-genético, condicionada para inducir a la formación del meristemo morfo-genético en vez de seguir una determinación que tenía en la planta completa. La magnitud de esta predeterminación varía entre las especies vegetales y los tejidos de la planta.

### 1.5 EMBRIOGENESIS SOMATICA

La capacidad de las plantas de producir embriones no está limitada al desarrollo de óvulos fertilizados. Se puede inducir la formación "in vitro" de embriones, que se desarrollan a partir de células somáticas, estructuralmente iguales a aquellos que proceden del cigoto; estos son llamados embriones somáticos o "embrioides" (fig. 2).

Figura 2. Embriogénesis somática.



Este fenómeno puede ocurrir a partir de tres tipos de células diploides: 1) células vegetativas de planta adulta 2) tejidos reproductivos diferentes del cigoto, 3) hipocotilo y cotiledones de embriones y plantas jóvenes sin ningún desarrollo previo de callo.

Los embriones se pueden originar desde una célula singular (Kolhembach, 1977), o pueden tener un origen multicelular (Wernicke, 1982); en ambos casos los estados de desarrollo de los embriones somáticos son iguales y se describen como sigue:

1. Proembrión: se distinguen pequeños grupos de células meristemáticas que son las que originarán el embrión.
2. Fase globular: Los grupos de células se hacen más grandes sin tener todavía apariencia de embrión.
3. Fase corazón: se nota una, característica, estructura trilobulada en la cual se distinguen los primordios cotiledonales y el polo radical.
4. Fase torpedo: La forma precedente aparece más elongada.
5. Plantita: Es visible la plantita completa, raíz y tallo primario.

#### 1.5.1 Embriogénesis directa

Este fenómeno ocurre con bastante frecuencia en la naturaleza; el embrión de la semilla de plantas superiores deriva del cigoto, algunas plantas sin embargo tienen la tendencia a formar embriones asexuales, es decir, sin que ocurra fusión entre gametos. Este tipo de reproducción se define apomixis y puede resultar de dos diferentes procesos: desde células diploides del saco embrionario (aposporia) o desde células de la nucela (embriónia nucelar)

La formación directa de embriones adventicios desde células somáticas puede ocurrir "in vitro" cuando se siembran óvulos, embriones nucelares, tejidos de la nucela y, caso más interesante, hipocotilos y cotiledones disectados de embriones cigóticos o somáticos, o desde plantas jóvenes.

La embriogénesis directa, por el escaso número de plantas que origina no tiene mucha importancia en micropropagación; tiene sí algún interés en el trabajo de fitomejoramiento

#### 1.5.2 Embriogénesis indirecta

La formación indirecta de embriones somáticos desde callo o suspensiones celulares se observa más frecuentemente que la directa.

En el callo los embriones se originan generalmente de grupos de células superficiales asociadas con células muy vacuolizadas que no participan directamente en el proceso.

Aunque en pocos casos no se necesiten reguladores de crecimiento exógenos, casi siempre la composición del medio, cantidad y tipo de reguladores son determinantes.

En la embriogénesis indirecta se consideran dos eventos problemáticos: 1) la inducción de la citodiferenciación de las células proembrioides. 2) El desarrollo de estas células en las diversas fases.

En los dos estados se requieren normalmente medios diferentes; en fase de inducción son determinantes un alto contenido de auxina exógena y la presencia de N en su forma reducida. El sucesivo desarrollo de las células embriogénicas requiere contenido muy bajo o ausencia de auxina.

La embriogénesis somática se ha obtenido experimentalmente en más de 30 familias (Raghavan, 1976; Narayanswamy, 1977)

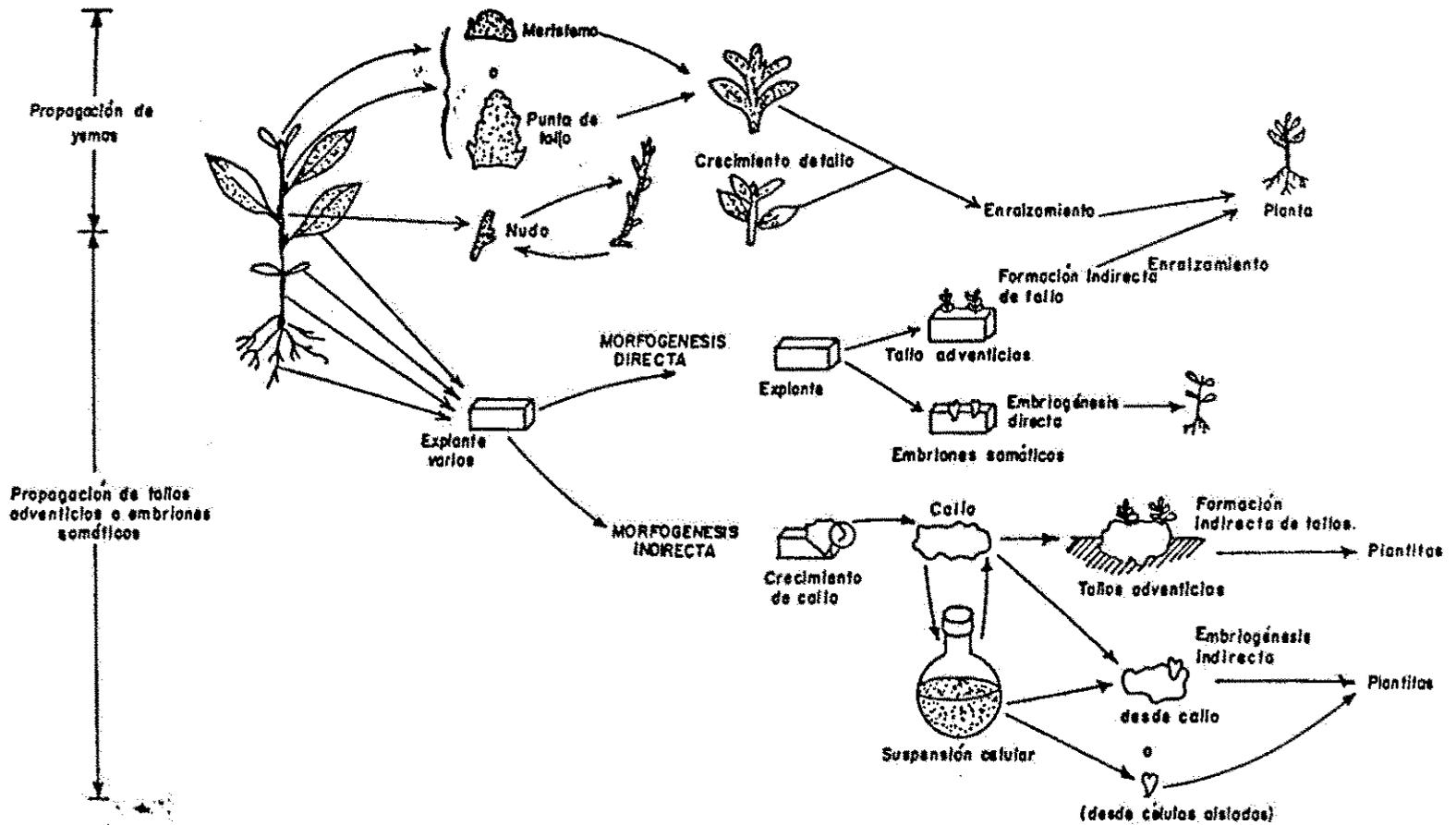


Fig.3 Principales métodos de propagación "in vitro".

## CAPITULO II

### FACTORES QUE AFECTAN MORFOGENESIS Y CRECIMIENTO

Los factores que afectan la morfogénesis y el crecimiento "in vitro" se pueden agrupar de la siguiente manera:

- 2.1 GENOTIPO: En este contexto el término genotipo y variedad son intercambiables. Siendo en virtud del genotipo que las variedades difieren.
- 2.2 SUBSTRATO: Incluye el efecto de todos los componentes del medio nutritivo.
- 2.3 AMBIENTE: Condiciones físicas en las cuales se desarrolla el cultivo.
- 2.4 FACTORES QUE DEPENDEN DEL TEJIDO.

#### 2.1 GENOTIPO

Probablemente el factor que más influye en el crecimiento y la morfogénesis "in vitro" es el genotipo. Generalmente géneros diferentes o especies o hasta variedades de la misma especie requieren substratos y condiciones físicas diferentes para un desarrollo óptimo, debido a sus diferentes genotipos. Los genes que regulan el desarrollo "in vitro" son, obviamente, no especializados para esta función, su influencia en el cultivo de tejidos es un efecto secundario al de sus funciones normales. Dado los diferentes tipos de crecimiento que se pueden producir "in vitro", se supone la existencia de grupos de genes que estimulados por los factores ambientales y el substrato dirigen el crecimiento hacia uno u otro tipo.

#### 2.2 SUBSTRATO

El substrato es el medio o conjunto de sustancias químicas, en un balance adecuado, que influyen directamente sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de tejidos vegetales.

Morfogénesis directa e indirecta son muy influenciadas por un balance correcto entre constituyentes orgánicos e inorgánicos y reguladores de crecimiento; no significa lo anterior que una única combinación de ingredientes pueda ser usada para todas las plantas. Formación directa de tallos ocurre en algunas especies en sólo agua, en otras es suficiente un medio con sales minerales y azúcar.

Los medios utilizados en el cultivo de tejidos vegetales se pueden clasificar por su constitución química en medios definidos y medios no definidos; y por su textura en medios líquidos y semisólidos.

**Medio definido:** es el medio nutritivo en el que se conoce completamente la composición y estructura química de cada uno de sus componentes.

**Medio no definido:** medio de cultivo en cuya composición entran a formar parte sustancias químicamente desconocidas, la más frecuentemente usada es el agua de coco.

**Medio líquido:** Es el medio en el que se omite la sustancia o sustancias gelificantes.

**Medio semisólido:** Medio nutritivo al que se le adiciona gelificante.

El medio sólido posibilita trabajar con explantes más pequeños, la formación de un sistema radical generalmente más ordenado y salvaguardar la integridad del cultivo de callo. En medio líquido, por otro lado, eventuales materiales tóxicos no se encuentran acumulados en la vecindad del explante sino que se dispersan en el medio.

Miller y Murashige (1976) compararon los 2 tipos de medio en 4 especies tropicales y encontraron que las respuestas pueden variar en los diferentes estados de la propagación.

-----

Substratos y condiciones bajo las cuales se obtuvo una mejor respuesta en el crecimiento en 4 especies tropicales

Especie	Estado I	Estado II	Estado III
<u>Cordyline terminalis</u>	Líquido (S o R)	Sólido	Sólido
<u>Dracaena godseffiana</u>	líquido (SF)	líquido (S)	sólido
<u>Scindopscis aureus</u>	sólido	sólido	sólido
<u>Singonium podophyllum</u>	líquido (R)	líquido (S)	sólido

-----

(S) Cultivo estacionario (R) cultivo agitado (SF) Cultivo con soporte.

Al hablar de substrato nos referimos a los siguientes componentes:

- Macronutrientes
- Micronutrientes
- Vitaminas
- Aminoácidos
- Azúcar
- Agua
- Reguladores de crecimiento
- Carbón activado
- PH
- Agentes quelatos
- agentes solidificantes
- suplementos no definidos

### 2.2.1 Macronutrientes

Los macronutrientes proporcionan los elementos minerales indispensables y cuantitativamente más abundantes en las plantas: N, P, K, Ca, Mg y S. Las sales que se usan generalmente proporcionan también el Cl y el Na.

El N se adiciona en gran cantidad como iones amonio ( $\text{NH}_4$ ) o nitrato ( $\text{NO}_3$ ), o en ambas formas.

El sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) aporta el Mg y el S.

El P se puede adicionar como  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

El K, el catión presente en cantidad más grande, se aporta como  $\text{KCl}$ ,  $\text{KNO}_3$  o como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

La adición de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  suministra el Ca.

El Cl está presente en  $\text{KCl}$  y en el  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Aunque el Na no se requiera generalmente en las plantas superiores a veces es esencial en el cultivo de halofitas y de plantas con ciclo fotosintético  $\text{C}_4$ .

La absorción de cada elemento es influenciada por la concentración de otros elementos, pH, temperatura y estado bioquímico y fisiológico del tejido.

Se han elaborado, hasta ahora, muchas combinaciones de macroelementos (cuadro 1). Una lista de ésta se encuentra en De Fossard (1977) que menciona 130 combinaciones las cuales difieren en tres aspectos fundamentales:

- Los iones realmente disponibles (en miliequivalentes).
- El balance entre los iones más importantes.
- La concentración iónica total.

Cuadro 1. Macroelementos en algunos medios de cultivos (mg/L)

macroelementos minerales	Gautheret 1942	White 1943	Heller 1953	Murashige e Skoog 1962	White 1963	Morel 1974
KCl	--	65	750	--	65	1000
NaNO <sub>3</sub>	--	--	600	--	--	--
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	125	360	250	370	720	125
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	--	16.5	125	--	16.5	--
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	--	--	75	440	--	--
KNO <sub>3</sub>	125	80	--	1900	80	--
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	--	88	--	--	200	--
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	--	--	--	1650	--	--
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	--	--	--	--	--	1000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125	--	--	170	--	125
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	500	200	--	--	300	500

Según Margara (1978) se pueden individuar 8 composiciones de macroelementos en los cuales la composición de N total, K, Ca y NH es variada. Dentro de estas 8 combinaciones es posible establecer la composición de macronutrientes adecuada para que ocurra la morfogénesis.

### 2.2.2 Micronutrientes

Los micronutrientes esenciales Mn, Fe, Zn, Bo, Cu, Co y Mo que generalmente se encuentran presentes en los medios nutritivos (cuadro 2) son componentes de proteínas de importancia fisiológica y metabólica. Cinco de estos elementos son necesarios para la síntesis de la clorofila y la función de los cloroplastos. De tal forma que cada uno de éstos elementos tiene su función específica que incide sobre la morfogenesis y crecimiento.

**Manganeso (Mn).** Es necesario para el mantenimiento de la ultra estructura y el proceso fotosintético (la actividad del fotosistema II es proporcional al contenido de Mn). Experimentalmente falta de Mn ocasiona menor formación de yemas.

**El hierro (Fe).** Es requerido para la formación de precursores de la clorofila.

**El zinc (Zn).** Es importante en la síntesis del triptófano y la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos.

Boro (Bo). Su exigencia no es tan evidente al utilizar contenedores de borosilicato. Es requerido para la actividad meristemática, está involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas, uracilo particularmente.

Cobre (Cu). Es necesario en la oxidación hidroxilación de fenoles.

Cobalto (Co). Componente de la vitamina B.

Molibdeno (Mo). Forma parte de las enzimas nitrato reductasas.

Cuadro 2. Microelementos en algunos medios de cultivos (mg/L)

microelementos minerales	Gautheret 1942	White 1943	Heller 1953	Murashige e Skoog 1962	White 1963	Morel 1974
NiSO <sub>4</sub>	0.05	--	--	--	--	--
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.05	--	--	27.8.	--	--
Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	--	--	--	37.3.	--	--
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	3	--	0.01	22.3	7	0.1
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	--	--	--	--	--	--
KI	0.05	0.75	0.01	0.83	0.75	0.01
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	--	--	0.03	--	--	0.03
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	--	--	--	0.025	--	--
Ti(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0.2	--	--	--	--	--
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.18	1.5	10	8.6	3	1
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.05	0.013	0.03	0.025	0.013	0.03
BaSO <sub>4</sub>	0.1	--	--	--	--	--
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	0.05	1.5	1	6.2.	1.5	1
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	--	--	--	--	--
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	--	2.5	1	--	--	--
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	--	--	--	0.25.	--	--
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	--	0.0017	--	--	--	--
AlCl <sub>3</sub>	--	--	0.03	--	--	0.03
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	--	--	--	--	2.5	--

### 2.2.3 Vitaminas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas que más frecuentemente se usan son:

Tiamina (vitamina B 1 ). Se agrega como tiamina HCl en cantidades que varían de 0.1 a 3 mg/lit. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de las células "in vitro".

Acido nicotínico (niacina).

piridoxina (vitamina B 6). Se agrega como piridoxina HCl.

Mioinositol. Se denomina también meso-inositol o I-nositol, no es una vitamina propiamente, sino un azúcar alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfoqénesis. Probablemente participa en la biosíntesis del ácido galacturónico, ayuda a la formación de varios constituyentes celulares como el ácido ascórbico y la pectina, y además a otros compuestos que intervienen en la división celular.

Acido Pantoténico.

Acido fólico. Disminuye la proliferación de tejidos en la oscuridad, mientras que en luz la aumenta. Esto es debido a que en la luz es hidrolizado a ácido P-aminobenzoico.

Riboflavina. Es inhibidor del crecimiento de raíces.

Vitamina E. Ayuda a la formación de callos que provienen de embriones, y en cultivos en suspensión ayuda a la viabilidad de células individuales.

#### 2.2.4 Aminoácidos

Los aminoácidos son fuente inmediata de nitrógeno y pueden actuar como agentes quelantes. Ningún aminoácido se ha encontrado que es esencial para el crecimiento en cultivo de tejido, sin embargo, existen varios que se han utilizado. Por ejemplo:

- Glicina: es el que se utiliza con más frecuencia.
- Glutamina y aspargina: transportadores de nitrógeno.
- L. Arginina: estimula raíces.
- L. Serina: empleada en el cultivo de microsporas.
- L. cisteína: agente reductor.

#### 2.2.5 Azúcar

Se ha individuado sólo un número muy reducido de plantas que cultivadas "in vitro" son autotróficas, las que muestran un crecimiento lento.

Generalmente en el cultivo de células, tejidos u órganos es necesario incorporar una fuente de energía y carbono en el medio; la sacarosa es la fuente comúnmente empleada. El grado de pureza del azúcar de uso doméstico es suficiente para agregarlo al medio. La presencia de sacarosa en el medio inhibe en cierta medida la formación de clorofila, afectando el crecimiento autónomo.

La concentración de sacarosa en el medio es de 2 a 4%. Otros azúcares empleados son la glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa y galactosa.

Cuadro 3. Compuestos orgánicos en algunos medios de cultivos (mg/l)

constituyentes Organicos	Gautheret (1942)	White (1943)	Heller (1953)	Murashige v Skoog 1962	White 1963	Morel 1974
Sacarosa	30,000	20,000	20,000	30,000	20,000	20,000
Glicina	3	3	-	2	3	-
Mioinositol	-	100	-	100	-	-
IAA	-	2	-	1-30	-	-
NAA	-	-	-	-	-	1
Cisteina	10	-	-	-	1	-
vitamina B (Tiamina HCl)	0.1	0.1	1	0.1	0.1	-
vitamina B (Piridoxina HCl)	0.1	0.1	-	0.5	0.1	-
Acido nicotínico	0.5	0.5	-	0.5	0.5	-
Pantetonato de calcio	-	-	-	-	1	-
2-4-D	-	-	-	-	6	-
Kinetina	-	-	-	0.04-10	-	-
Acido cítrico	-	-	-	-	-	125

#### 2.2.6 Agua

El agua bidestilada es normalmente requerida en cultivo de tejidos ya sea para preparación de medio, como para la preparación de las soluciones madres. El agua bidestilada es requerida sobre todo para la investigación, más para algunos trabajos de rutina el agua desionizada puede ser aseptable.

Se debe tener cuidado de no guardar agua bidestilada en recipientes de polietileno para evitar la presencia de sustancias tóxicas para los tejidos. Pero en general lo recomendable es no guardar agua por mucho tiempo.

#### 2.2.7 Reguladores de crecimientos

Sabemos hoy en día, que el crecimiento de las plantas no sólo está determinado por la absorción de sustancias minerales y por hidratos de carbonos, sino también, por ciertas sustancias químicas que actúan como agentes específicos, y correlacionan el crecimiento entre la diversas partes de la planta.

Estas sustancias que se producen dentro de la planta en bajas concentraciones (endógenas) o sintéticamente (exógenas) y que en esas minúsculas cantidades son capaces de promover, inhibir o modificar cualitativamente el crecimiento y desarrollo en vegetales son llamadas de diversas formas, no existiendo hasta

ahora una terminología mundialmente aceptada. Nosotros en nuestro texto, utilizaremos el arreglo presentado por De Fossard.

A los compuestos que se encuentran en forma natural en los tejidos vegetales (endógenos) les denominaremos hormonas vegetales o sustancias de crecimiento y a las sustancias sintéticas químicas y fisiológicamente similares a las hormonas vegetales (exógenos) les llamaremos reguladores de crecimiento. Es a través de estas sustancias las cuales adicionadas al medio nutritivo solas o combinadas en diferentes concentraciones (cuadros 4 y 5) se induce la formación y desarrollo, a partir de tejidos u órganos sembrados en medios asépticos, de plantitas completas.

Estas sustancias las podemos clasificar de la siguiente manera:

- Auxinas
- Citocininas
- Giberelinas
- Etileno
- Abscisinas

### Auxinas

Se denomina auxina a una serie de compuestos que controlan ciertos procesos como el crecimiento y elongación celular. La auxina natural más común es el AIA, ácido Indolacético, (en la bibliografía Inglesa y Europea conocida como IAA). La concentración de auxinas naturales (endógenas) en el tejido depende de la planta madre de la cual fue extraído el explante; su estado de crecimiento y desarrollo, las condiciones ambientales en las cuales se desarrolló la planta y la estación del año. Cuando un explante tiene la capacidad de desarrollarse en un medio sin adición de auxina se denomina "auxin autonomous o auxin habituated".

Las auxinas se utilizan ampliamente en micropropagación y se incorporan al medio de cultivo para promover el desarrollo de callos, de suspensiones celulares, de órganos (como meristemas y yemas) y para regular la morfogénesis, especialmente en combinación con citocininas. La elección del compuesto y la concentración dependerá de:

- El tipo de crecimiento o desarrollo requerido.
- El nivel natural de auxinas presente en el explante al momento de la exsición.
- La capacidad del tejido de sintetizar auxinas naturalmente.
- La interacción, si hay, entre la auxina aplicada y la auxina natural endógena.

En el cultivo de tejidos, es frecuente el uso de auxinas sintéticas que tienen las mismas propiedades del AIA natural, generalmente las más usadas son:

2-4-D	ácido diclorophenoxiacético
IBA	ácido 3 Indolbutírico.
NAA (ANA)	ácido Naftalenacético

El AIA en el medio de cultivo no es muy efectivo para promover el crecimiento y morfogénesis. Probablemente porque es destruido al esterilizar el medio, por oxidación enzimática o fotooxidación (Rubino Mejía 1987).

En el cultivo de tejidos se han reportado los siguientes efectos de las auxinas:

**Inducción de callo.** La auxina más utilizada para este fin es el 2-4-D, la que se emplea generalmente en cantidades de 1 a 3 mg/lit, pero las células han mostrado cierto porcentaje de mutaciones genéticas, por lo que a veces se prefiere emplear el ANA o el AIA. Otros investigadores recomiendan iniciar el callo en 2-4-D y transferirlo después a un medio con ANA o AIA.

**Formación de tallos y raíces.** Caulogénesis y rizogénesis en cultivo de callo requieren necesariamente un cambio en el nivel de auxina y citocinina. Para la formación de tallos se requieren cantidades de citocininas altas respecto a las auxinas. La rizogénesis, al contrario, requiere más auxinas que citocininas.

Las auxinas son casi universalmente requeridas para promover el crecimiento inicial de explantes de puntas de tallo. Una baja concentración de auxinas a menudo se utiliza en conjunto con un alto nivel de citocinina en el estado II (ver pág. 41), cuando se requiere proliferación de tallos, aunque hay casos en los cuales sólo citocinina es suficiente.

**Embriogénesis.** Para la iniciación de embriones somáticos se requiere elevada concentración de auxinas (generalmente 2-4 D), pero para pasar a las sucesivas fases de desarrollo del embrión es necesario pasar a un medio con un contenido más bajo de auxina.

### Citocininas

Las citocininas naturales son: Zeatina 6-(4-Hidroxi-3metil-2-butenilamino) y 2 ip o IPA (2-Isopentiladenina).

No obstante, ocurra en la planta entera síntesis de citocininas, muchos tejidos y órganos cultivados "in vitro" no

sintetizan cantidades suficientes para promover el desarrollo, por lo que el empleo de citocininas exógenas se hace necesario. Las citocininas sintéticas más empleadas en el cultivo de tejidos son:

Kinetina 6 - furfurylaminopurina.  
BAP O BA 6 - Bensylaminopurina.

En el cultivo de tejido vegetales las citocininas han mostrado tener efecto sobre:

**Proliferación de callo de dicotiledóneas.** Generalmente para la proliferación de callo en esta clase de vegetales se requiere la presencia de auxina y citocinina.

**Formación de tallos adventicios.** Las citocininas son muy efectivas en promover la iniciación directa o indirecta de tallos.

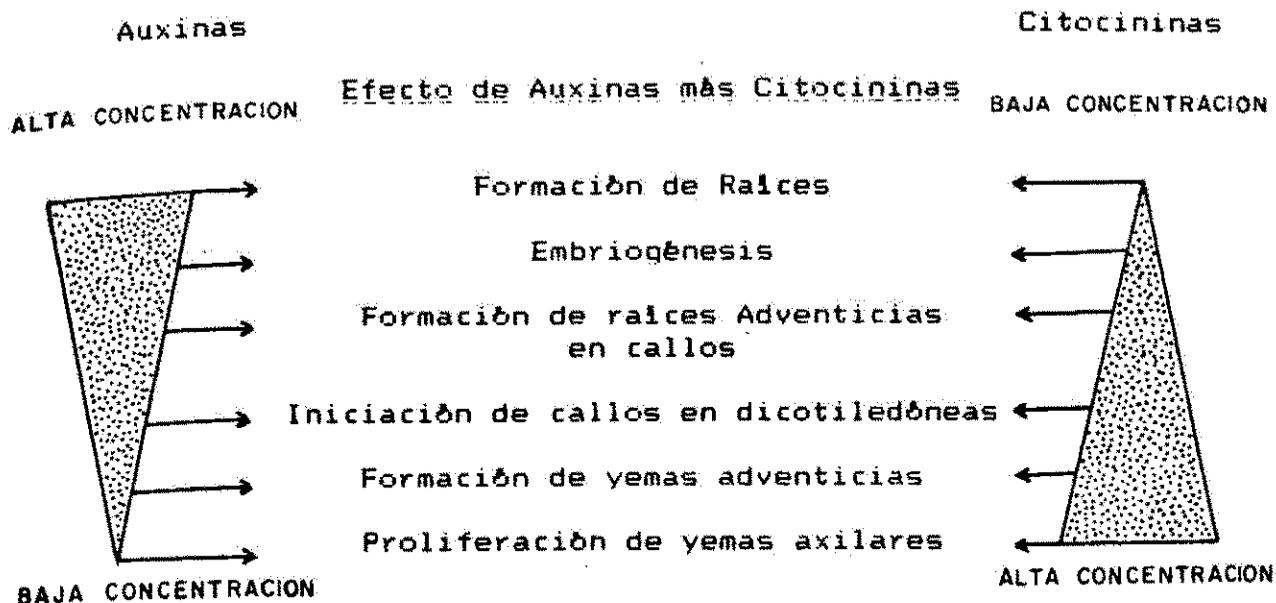
**Cultivo de ápices.** Niveles relativamente altos de citocininas son incorporados al medio en el estado II para impulsar el crecimiento de yemas axilares y reducir la dominancia apical, en esta forma se pueden producir varios tallos no enraizados desde un único ápice, en un período generalmente corto, entre 2 y 6 semanas. Estos tallos pueden ser separados y recultivados en el mismo medio o enraizados mediante transferencia a medios diferentes que proporcionen una rápida propagación.

**Formación de raíces.** Altas concentraciones de citocininas (0.5 - 10mg/L) generalmente inhiben la formación y crecimiento de las raíces y el efecto promocional de las auxinas sobre la formación de raíces. Por esta razón en el cultivo de punta de tallo cuando se quiere enraizar tallos adventicios para producir plantitas completas, se transplantan en un medio privado de citocininas. Obviamente el efecto de estos reguladores puede variar dependiendo del compuesto, del tipo de cultivo y la variedad cultivada.

### Interacción auxina citocinina

Skoog y Miller (1957) demostraron que la formación de tallo se podía inducir en callo de tabaco usando un nivel relativamente bajo de auxinas y relativamente alto de citocininas. Desde ese trabajo, muchos aspectos de la regeneración en el cultivo de tejidos, han sido correlacionados a la interacción auxina-citocinina.

El balance que se requiere para las diferentes funciones se puede resumir como sigue:



Existen algunas excepciones a estas reglas, las cuales son agrupadas de la siguiente forma:

- En algunas especies la proliferación de tallos se puede promover con auxinas o con citocininas.
- Tejidos de monocotiledóneas se inducen o forman callo sólo cultivándolos en altos niveles de auxinas.
- Organogénesis en monocotiledóneas es promovida en muchos casos transfiriendo el cultivo en medios sin auxinas; reduciendo la concentraciones de auxinas altamente activas, como el 2-4-D o sustituyendo el 2-4-D con otra auxina (ANA o AIA).

### Giberelinas

De esta clase de sustancias de crecimiento existen pocos productos comerciales. El ácido giberélico ( $GA_3$ ) es el más utilizado en el cultivo de tejidos. Aplicado a la planta entera, la giberelina puede influenciar el crecimiento y desarrollo de diversas formas. Por ejemplo, estimulando la elongación del tallo, la floración o induciendo la fructificación. Estos efectos son ocasionados por el estímulo en las síntesis y actividad de mecanismos enzimáticos y/o un cambio en la disponibilidad de auxinas endógenas.

En cultivo de tejidos generalmente se puede regenerar sin la utilización de giberelina. Cuando se agrega GA<sub>3</sub> al medio de cultivo, muchas veces ocasiona efectos que son disímil a los efectos de las auxinas; dentro de esos efectos podemos enumerar los siguientes:

**Indució en crecimiento de callo.** Altas concentraciones de GA<sub>3</sub> (arriba de 5x10<sup>-6</sup> M; 1 a 8 mg/L ), inducen el crecimiento de callo , combinado con auxinas y una baja concentración de citocininas.

**Formación de tallos y raíces.** Cuando al medio de cultivo se adiciona ácido giberélico, a menudo impide la formación de tallos y raíces. Así el tratamiento preventivo del callo o explante con GA<sub>3</sub> o en el adicionamiento al medio junto con auxina y citocininas en concentraciones bajas que promuevan caulogénesis , es generalmente inhibitoria de la rizogénesis.

**Desarrollo de embrioides.** En el proceso de embriogénesis somática el ácido giberélico, ha ocasionado, casi siempre la inhibición de la formación de embrioides. A veces la "germinación" de embriones somáticos ya formados es estimulado por la presencia de GA<sub>3</sub> en el segundo medio; o sea, el medio post-iniciación.

**Cultivo de meristemas y ápices.** Mientras que en ausencia de citocininas el ácido giberélico tiende a inhibir la formación de tallos y raíces; este promueve el crecimiento y elongación en órganos preformados.

El ácido giberélico es ocasionalmente adicionado al medio junto con auxinas y citocininas en el estado I y II en el cultivo de punta de tallo, para impulsar el crecimiento del cultivo. El efecto es variado en dependencia de la especie. En algunas variedades se utiliza usualmente para estimular la elongación de los entrenudos. En otros casos el GA<sub>3</sub> promueve la elongación del tallo inhibiendo al mismo tiempo el desarrollo de yemas axilares. Puede ser necesario sustituir el GA<sub>3</sub> cuando se quiere conseguir enraizamiento.

### Acido abscisico

El ácido abscisico se ha encontrado en la naturaleza en muchas especies, es sintetizado en los plastidios o en los cloroplastos (Milberrace, 1974). El ácido abscisico (ABA) es considerado un inhibidor en el crecimiento de las plantas, su actividad es generalmente contraria a la de los otros reguladores

de crecimiento. Aunque en la planta el ABA está comprometido con la inducción de la dormancia, tiene diversas funciones, como la regulación de la apertura estomática y en cultivo de tejido puede actuar como estimulador o inhibidor. El ABA ha resultado ser un ligero inhibidor sobre el desarrollo de callos, pero existen varias excepciones reportadas por diferentes investigadores, los cuales reportan que el ABA tiene un efecto promotor.

El efecto del ABA en la morfoqénesis es generalmente inhibitorio. En publicaciones de IBPGR (International Board of Plant Genetic Resources) se reporta el empleo del ABA en la conservación de germoplasma "in vitro" a tasas mínimas de crecimiento.

## Etileno

Recientemente se ha encontrado producción de etileno en las plantas y se considera como una substancia con muchas funciones y de regulador. A menudo hay un balance óptimo entre el nivel de etileno y auxinas endógenas. Se ha demostrado que se da la producción de etileno en cultivo de tejidos, se ha podido observar una acumulación de gas en los frascos del cultivo.

La acumulación de etileno parece no tener ningún efecto sobre la división y el crecimiento de las células en el cultivo de callo. El efecto sobre la morfoqénesis no es tan claro, pareciese que existe una concentración crítica que estimula la morfoqénesis. Concentraciones muy altas o muy bajas son inefectivas o inhibitorias.

**CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTOS COMUNMENTE EMPLEADOS**

**Cuadro 4.** Reguladores de crecimiento usados en cultivo de vemas (estados I, II Y III). Basados en 23 protocolos de 21 reportes sobre 21 especies

Reguladores de crecimientos	Estado I			EstadoII				EstadoIII		
	N	Rango uM	Promedio uM mg/l	N	Rango uM	Promedio uM mg/l	N	Rango uM	Promedio uM mg/l	
<u>Auxinas</u>										
NAA	7	0.3-5.4	1.8 0.3	6	0.3-1.6	0.7 0.1	5	0.5-26.9	4.8 0.9	
IBA	5	0.05-4.9	1.1 0.2	2	0.3-9.8	4.5 0.9	5	1.5-9.9	4.7 1.0	
IAA	4	0.3-5.7	3.2 0.6	4	0.3-8.6	4.8 0.8	3	1.7-28.6	11.5 2.0	
NINGUNO	6	-	- -	9	-	- -	5	-	- -	
<u>citocininas</u>										
BAP	11	0.9-13.3	3.6 0.8	15	0.4-22.2	5.0 1.1	0	-	- -	
Kinetina	6	1.4-10.0	5.4 1.2	5	1.4-9.8	4.9 1.0	0	-	- -	
2iP	2	4.0-16.0	10.0 2.0	1	8.0	8.0 1.6	0	-	- -	
ninguno	1	-	- -	0	-	- -	23	-	- -	
<u>Giberelinas</u>										
GA <sub>3</sub>	1	0.3	0.3 0.1	1	0.5	0.5 0.2	0	-	- -	
NINGUNO	22	-	- -	22	-	- -	23	-	- -	

**Cuadro 5.** Reguladores de crecimiento usados en el cultivo de meristemos. Basados en 30 protocolos de 24 reportes sobre 23 especies.

Reguladores de Crecimientos	Estado I ,II y III			
	N	Rango uM	Promed uM mg/l	
<u>Auxinas</u>				
NAA	7	0.1-10.0	2.1	0.4
IBA	6	2.5-4.9	4.5	0.9
IAA	7	0.06-11.4	5.3	0.9
picloram	1	0.02	0.02	0.004
<u>Citocininas</u>				
BAP	14	0.1-10.1	1.9	0.4
Kinetina	5	0.5-14.0	5.9	1.3
2iP	1	0.4-	0.4	0.4
Zeatina	4	0.01-10	2.8	0.6
<u>Giberelinas</u>				
GA <sub>3</sub>	7	0.1-2.9	1.7	0.6

### 2.2.8 Carbón activado.

El carbón activado posee cualidades que tienen efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Cuatro tipos de efectos positivos han sido reportados, dependiendo del tipo de cultivo.

- Absorbe compuestos producidos por los tejidos o presentes en el agar, que puedan inhibir el crecimiento.
- Previene el crecimiento de callo no deseado.
- Promueve morfogénesis, principalmente caulogénesis.
- Promueve la formación de raíces, probablemente debido a la interferencia sobre la luz.

### 2.2.9 pH del medio

El pH del medio debe ser tal que no dañe la función de la membrana celular o el pH del citoplasma. Dentro de estos límites fisiológicos su valor afecta la solubilidad de las sales, la absorción de los ingredientes del medio, los reguladores de crecimiento y la eficacia quelificante del agar. El rango efectivo del pH en el medio varía entre 4.5 y 6.5.

El ajuste del pH se hace generalmente utilizando KOH o HCl justo antes de la esterilización en el autoclave. La esterilización a menudo puede provocar una alteración del pH.

Murashige y Skoog aconsejan adicionar el agar y precalentar el medio y luego regular el pH para el cual recomiendan ajustarlo a 5.7 o 5.8.

### 2.2.10 Agentes Quelatos

Los agentes quelatos son compuestos cuyas moléculas son capaces de retener un ión metálico mediante varias uniones químicas formando un anillo completo al cual se le denomina quelato. Ejemplo el EDTA (Ácido Etilenaminotetraacético) que se utiliza para quelar el hierro evitando que se oxide y garantizando su disponibilidad en el medio.

### 2.2.11 Agentes solidificantes

Los agentes solidificantes se utilizan en la preparación de medios semisólidos, y de esta forma crear un sistema de soporte que permita el contacto del explante con la solución nutritiva.

Dentro de los agentes solidificantes más empleados tenemos gelatina, geles derivados de almidón (Gelrite) y el agar.

El agar es entre los 3 compuestos mencionados anteriormente el que comúnmente se utiliza. Este producto que se obtiene de sustancias mucilaginosas de algas marinas del género Gelidium y que se encuentra, disponible en polvo, presenta las siguientes ventajas:

- Con agua el agar forma geles que se derriten a 100° c y solidifican a 45°c. Esto significa que el gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- El agar no es digerido por las plantas.
- El agar no reacciona con los constituyentes del medio.

El Difco-bacto-agar y el agar sigma son los más utilizados, siendo el último uno de los más baratos. Por otro lado se ha podido observar que el noble agar y el agar purificado que presentan un alto grado de pureza respecto a los dos primeros han mostrado efectos negativos sobre el crecimiento y desarrollo del explante.

#### 2.2.12 Suplementos no definidos

Como decíamos al comenzar a hablar del substrato estas son sustancias cuya composición química se desconoce, pero en muchos cultivos son utilizados debido a que han mostrado efectos positivos sobre el desarrollo y crecimiento de estos.

Algunos de los suplementos utilizados han sido extracto de levadura, jugo y extracto de frutos (plátano, tomate, agua de coco), caseína hidrolizada y antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico, cisteína)

### 2.3 AMBIENTE.

#### 2.3.1 Temperatura

Temperaturas diferentes adoptadas en el cultivo "in vitro" han mostrado un efecto muy leve sobre el crecimiento o propagación. Existen bastantes datos en literatura de la existencia de especies cuyos requerimientos de temperaturas son disímiles, sin embargo muchos laboratorios poseen sólo un cuarto de crecimiento en el cual la temperatura es necesariamente uniforme, para todas las especies y tipos de cultivos.

La temperatura reportada por la mayoría de los investigadores es de 25°C pocos grados más o menos. Plantas tropicales o subtropicales se pueden cultivar a temperaturas levemente más altas en promedio de 27 a 28°C. La mayoría de los autores reportan temperatura constante noche y día, hay investigadores que recomiendan una fluctuación, en este caso una temperatura diurna más alta que la común se alterna con una temperatura de 6 a 8° C.

más baja en el período de oscuridad.

Para la conservación de germoplasma, a través del método de tasa mínima de crecimiento, el empleo de la temperatura varía en un rango entre 10 C y 18°C.

### 2.3.2 Humedad.

La humedad no es generalmente objeto de investigación o mucha preocupación en el cultivo de tejidos, es obviamente importante sobre todo para prevenir la deshidratación de los cultivos.

La humedad relativa en los cuartos de crecimiento es generalmente alrededor del 70% y en los frascos de 90%.

### 2.3.3 Luz.

Las unidades standard ergio y Joule, se usan para cuantificar la energía de la luz.

La cantidad de energía radiante emitida por una fuente luminosa por unidad de tiempo se llama flujo radiante. El flujo emitido por unidad de superficie es denominado densidad del flujo radiante. Y la cantidad interceptada por unidad de superficie es la irradiación o densidad del flujo radiante en la superficie.

La energía que sale de una fuente luminosa se dirige en todas direcciones, su intensidad se mide, independientemente de la distancia como la energía emitida por unidad de tiempo por ángulo sólido, o sea una porción de espacio limitado por una superficie cónica o piramidal.

El lumen es el flujo luminoso de un foco cuya densidad es una candela. La medida que se encuentra generalmente en literatura inherente al cultivo de tejido es el lux. El lux es la unidad de iluminación, o sea el flujo luminoso que recibe la unidad de superficie.

1 lux = 1 lumen/m<sup>2</sup>. Raramente la iluminación se mide en footcandle (1 lumen/pie<sup>2</sup>).

Crecimiento y desarrollo dependen en gran medida de la luz. Fotosíntesis y morfogénesis están influenciadas por la luz. La fotosíntesis llevada a cabo por las plantas "in vitro" es relativamente baja, dependiendo los cultivos principalmente del azúcar adicionado al medio. La importancia de la luz radica esencialmente en su efecto sobre la fotomorfogénesis.

Las cualidades de la luz que más influyen en el crecimiento y morfogénesis "in vitro" son: Longitud de onda, intensidad y fotoperíodo.

Las fuentes luminosas que se usan para proporcionar luz a los cultivos son generalmente tubos fluorescentes y en pocos casos con bulbos incandescentes.

Luz blanca fría, blanca caliente o tubos o gro-lux se han mostrado óptimas para el cultivo "in vitro".

El fotoperiodo necesario para inducir la floración puede ser diferente del requerido para la regeneración de tallos y raíces o para la proliferación de tallos. Formación de yemas "in vitro" o crecimiento de yemas preforadas son muy influenciadas por el fotoperiodo. Todavía no es claro si el efecto del fotoperiodo sea debido a las diferencias de energía luminica o a un cambio fotoperiódico específico.

Generalmente la morfogénesis "in vitro" es favorecida más por el día largo que por el día corto. En la fase de enraizamiento generalmente se necesita un cambio en el régimen lumínico. No siempre la luz tiene un efecto favorable en la inducción y crecimiento de raíces. La formación de raíces a menudo es mayor cuando se somete el material cultivado a un período preliminar de obscuridad en presencia de auxinas. Muchos investigadores sugieren que el período de obscuridad es más útil en la fase de iniciación de raíz que para el crecimiento de las mismas.

Respecto a la iluminación se ha observado que explantes de puntas de tallo se mantienen en condiciones óptimas en iluminación de 500 a 3000 lux durante el estado I y II de la micropropagación. Una iluminación más alta, entre 3000 a 10,000 lux en el estadio III, aumenta la sobrevivencia de las plantas al ser transferidas al campo.

En algunas especies la proliferación de callos o formación directa de tallos desde el explante es favorecida por una alta iluminación en el estado II.

En el caso de micropropagación acelerada, Murashige sugiere que el nivel de iluminación en el estado I y II sea de 1000 lux suministrados por grolux o tubos fluorescentes blancos.

## 2.4 Factores que dependen del tejido

Crecimiento y morfogénesis son regulados por muchas propiedades físicas y fisiológicas del tejido, que generalmente no dependen de su constitución genética, aunque seguramente deben de guardar alguna interacción con el genotipo. Los factores dependientes del tejido que afectan al cultivo "in vitro" son:

- La parte del código genético total expresado.
- El manejo que se le ha dado a la planta madre.
- La naturaleza física del explante usado.

Tipos de expresiones génicas estables y hereditables en generaciones sucesivas de células vegetales son llamados epigenéticos. Varios estados semi-permanentes se pueden inducir y mantener "in vitro":

- Varias fases fisiológicas de crecimiento.
- La actitud del meristemo apical a producir órganos de un tipo.

particular por varios periodos.

- La capacidad de crecimiento del tejido v/o morfogénesis.
- Habitación, por lo cual células vegetales no dependen por mucho tiempo de las sustancias de crecimiento exógenas.

Cada uno de estos tipos de expresiones se pueden inducir o modificar en el cultivo de tejidos, particularmente por los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo.

Las plantas atraviesan diferentes fases de crecimiento, el más evidente es el pasaje desde el estado juvenil al estado adulto. Otros cambios pueden ser los relativos a la capacidad de echar ramas, o modificaciones en la resistencia a hongos. Finalmente las fases de crecimiento tienen una base epigenética. La juvenilidad tiene una base celular. Células derivadas de fase adulta y juvenil tienen características diferentes, que se mantienen "in vitro".

Plantas propagadas por cultivo de punta de tallos generalmente tienen la forma adulta de la planta madre, sólo se ha reportado algunos casos en que la micropropagación continua ha ocasionado retorno a la juvenilidad. Característica de un tallo juvenil es que enraiza más fácilmente que uno adulto. La velocidad y frecuencia de enraizamiento a menudo aumenta durante subcultivos sucesivos.

Respecto a las plantas que se utilizan como fuente de explantes o plantas madres, es notorio que los mejores explantes son los que se sacan de plantas vigorosas que se hayan mantenido en crecimiento activo sin stress.

Cambios de temperatura, fotoperiodo, intensidad lumínica, disponibilidad de agua influyen en el contenido de carbohidratos, proteína y sustancias de crecimiento en la planta madre. Se pueden encontrar diferencias entre cultivos comenzados en diferentes periodos del año o procedentes de plantas madres que han crecido en condiciones diferentes.

Respecto al explante, su tamaño, edad y la manera en la cual se cultiva afecta al tipo de cultivo y al tipo de morfogénesis.

Cuando se define la edad del explante se tienen que considerar las siguientes características:

- Edad del material: o sea el tiempo desde su inicio.
- Fase de crecimiento o edad fisiológica: en este sentido un explante se puede calificar de joven o adulto, según proveniga de una parte de la planta en fase juvenil o adulta.
- Edad Secuencial: Según este concepto las partes más jóvenes de la planta son consideradas como células no diferenciadas en

división y las células diferenciadas de órganos que han derivado secuencialmente desde estos, se consideran adultos. Meristemos apicales de muchas plantas tienen la capacidad teórica de gozar de juvenilidad perpetua y vivir sin límite de tiempo "in vitro".

Cuando se da inicio a la siembra del explante se tiene que considerar otro factor denominado periodo de cultivo: es el tiempo transcurrido desde el establecimiento "in vitro" del explante.

- Respecto a la edad secuencial, explantes de órganos recién formados tienen mayor capacidad de organogénesis.
- Respecto a la edad fisiológica, explantes de tejidos juveniles enraizan con más facilidad que aquellos de tejidos viejos de la planta.
- Concerniente al periodo de cultivo, hay un breve periodo en el cual la capacidad morfogénica aumenta y después comienza a declinar.
- En relación al tamaño del explante, existe un tamaño óptimo para iniciar el cultivo "in vitro", el cual se tiene que determinar experimentalmente para cada especie y hasta variedades. Explantes pequeños sean punta de tallos, fragmentos de tejidos, trozos de callo es más difícil su establecimiento "in vitro", y explantes largos pueden ser difícilmente esterilizados y menos manejables.

### CAPITULO III APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS

respecto a las aplicaciones del cultivo de tejidos mencionaremos:

- Limpieza y saneamiento de plantas.
- Estudio de la interacción huésped-patógeno.
- Intercambio de germoplasma.
- Propagación clonal.
- Conservación de germoplasma.
- Mejoramiento Genético

#### 3.1 SANEAMIENTO DE VIROSIS A TRAVES DEL CULTIVO DE MERISTEMAS.

La mayoría de las plantas propagadas agámicamente están afectadas por virus de varios tipos, a veces con ausencia de síntomas, pero siempre influenciando las calidades agronómicas del cultivo, como productividad, longevidad, calidad del producto, etc.

Esto explica la atención que recibe a nivel mundial la terapia de saneamiento "in vitro". El cultivo de meristemas (ver pág. 4 ) como técnica de saneamiento de plantas afectadas por virus, se fundamenta en el hecho de que la distribución de los virus en los tejidos vegetales no es uniforme, sino acropetal; por lo tanto las probabilidades de que las células meristemáticas se encuentren con un menor número de partículas virales, o que estén completamente libre de éstas, son mayores que en los tejidos diferenciados.

Se plantean dos posibles explicaciones a este fenómeno:

1) que las células meristemáticas por su metabolismo particularmente activo sean competitivas con los virus, quizás con producción de inhibidores

2) y que la velocidad de crecimiento del meristemo sea mayor que la velocidad de propagación del virus, por eso el domo meristemático estaría libre de partículas virales.

La técnica consiste en aislar asépticamente el domo meristemático de las yemas apicales o axilares, con uno o dos primordios foliares y sembrarlo en un medio nutritivo estéril.

Se ha comprobado que el cultivo de meristemas tiene un mayor éxito cuando se combina con la termoterapia o quimioterapia.

La combinación cultivo de meristemo-quimioterapia no es tan utilizada, a pesar de que muchas sustancias químicas son capaces de disminuir o erradicar los virus, y esto debido a los riesgos de fitotoxicidad y los efectos mutágenos que provoca la aparición de razas más virulentas.

La combinación cultivo de meristemo-termoterapia, se emplea rutinariamente en el saneamiento y limpieza de muchas especies. La termoterapia es la terapéutica mediante el calor ó frío aplicado a una planta, órgano o tejido.

Figura 4. Sensibilidad de virus y hospedantes al calor.

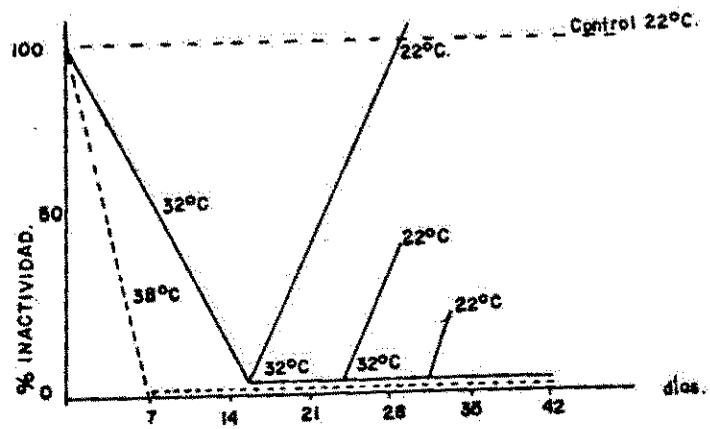
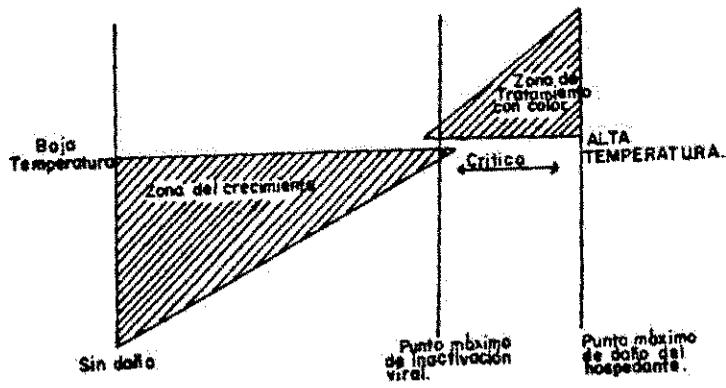
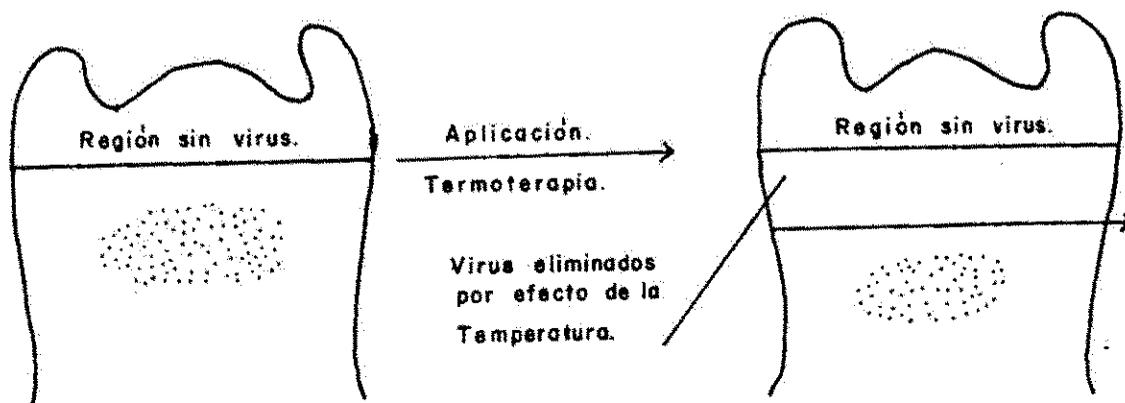


Fig.b- Inactivación de virus por altas temperaturas (fuente: Walkey, 1976)

El efecto de las altas temperaturas (fig. 5) es de inhibir o por lo menos disminuir la multiplicación del virus. Aplicando la termoterapia antes de la extracción del explante se asegura una parte más grande (fig. 5) libre de partículas virales. El manejo de explantes más largos hace que el trabajo sea más rápido y exitoso.

Figura 5. Efecto de la termoterapia en la expansión de la zona limpia de virus del meristemo.

☐ VIRUS



El tratamiento termoterápico puede ser aplicado a las plantas madres o a plantas cultivadas "in vitro". Por lo general, la temperatura empleada es alrededor de los 40°C y por un tiempo de dos hasta 8 semanas; la aplicación de altas temperaturas puede ser intermitente durante el día, bajando así el porcentaje de plantas dañadas.

**Especies de propagaación vegetativa saneadas de virus aplicando termoterapia y los cultivos de meristemos**

Especie	Virus
<u>Allium sativum</u>	mosaico
<u>Citrus</u> spp.	exocortis, psorosis, tristeza
<u>Colocacia esculenta</u>	mosaico
<u>Ipomoea batata</u>	mosaico, punto amarillo
<u>Catleya</u> spp. (orquidea)	mosaico
<u>Chrysanthemum</u> spp.	B. moteado, flores verdes, enanismos
<u>Manihot esculenta</u>	mosaico común
	mosaico africano
<u>Musa</u> spp.	mosaico
<u>Sacharum officinarum</u>	mosaico
<u>Solanun</u> spp.	X Y. S. A, M, decoloramiento

### 3.2 ESTUDIO DE LA INTERACCION HUESPED-PATOGENO

Es objetivo de la fitopatología comprender la razón por la cual algunas plantas son resistentes o tolerantes y otras susceptibles al mismo patógeno. El conocimiento de la interacción patógeno-huésped posibilitaría dar respuestas más prácticas y contundentes en la lucha contra las enfermedades. Muchas de esas interacciones ha sido posible observarlas inoculando el patógeno en el cultivo de suspensiones celulares, protoplastos, cultivo de órganos.

Las ventajas que presenta la técnica son las siguientes:

- Permite regular los factores ambientales: luz, temperatura, humedad relativa, intercambio gaseoso.
- Permite observar cada una de las etapas del desarrollo del patógeno.
- Pueden realizarse observaciones sobre células individuales.
- El estudio es realizado con rapidez y homogeneidad en la inoculación y observación.
- Las células en el cultivo están libres de microorganismos ajenos al objeto de la investigación.

La técnica permite conocer con eficacia las interacciones bioquímicas entre el huésped y el patógeno. Tiene la desventaja que no se pueden evaluar mecanismo de defensa de la planta que sólo se expresan en condiciones ambientales como la presencia de inhibidores, mecanismo de defensa que resulta de la interacción celular y barreras del tipo cutícula.

#### Estudio de algunas interacciones huésped-patógenos

Huésped	Patógeno	Referencia
Tomate	<i>Phytophthora infestans</i>	Warren y Rotley (1970)
Papa	<i>Phytophthora infestans</i>	Ingram y Robertson (1965)
Tabaco	<i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	Moraher y Hendr (1978)
Maíz	<i>Helminthosporium maydis</i>	Gengenbach y Green (1975)
Tabaco	<i>Pseudomonas tabaci</i>	Huang y van Dyke (1971)
Frijol	<i>Botrytis cinerea</i>	Dixon y Fuller (1978)
Tabaco	TMV	Rosell Halliwell (1974)
Soya	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Gurlitz (1982)

### 3.3. INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA

El desarrollo de la agricultura está estrechamente vinculado a la resolución de muchos problemas tales como la obtención de variedades con alto rendimiento, resistencia a plagas y enfermedades, resistencia a salinidad, etc., para lo cual se requiere de una adecuada disponibilidad de recursos genéticos; sin embargo, el intercambio de germoplasma de una zona a otra, de un país a otro, conlleva altos riesgos de introducción de plagas y microorganismos patógenos.

La utilización del cultivo de tejidos ha venido a ser una herramienta fundamental para el intercambio de germoplasma. En tal sentido podemos mencionar que los riesgos de introducción de plagas o enfermedades a una región no contaminada son menores; así mismo, desde el punto de vista económico es significativo la reducción de los costos, tomando en cuenta los enormes gastos realizados por los programas de cuarentenas, gastos de infraestructura como invernaderos, cuartos fríos, laboratorios, gastos de personal el cual tiene que ser numerario, transporte, etc.

En el uso de cultivo de tejidos como método para el intercambio de germoplasma, podemos decir que de todos los patógenos que pueden afectar determinados materiales, los que representan el mayor peligro son los virus, dado que tienen un alto grado de transmisión y son de difícil detección y diagnóstico. Además es importante mencionar que muchas enfermedades pasan desapercibidas por desconocerse la etiología y sintomatología de éstas.

Sin embargo, estos problemas pueden ser franqueados mediante una adecuada cadena de asepsia, saneamiento a través de cultivo de tejido e indexados virales sobre los recursos genéticos conservado en los bancos de genes "in vitro".

### 3.4 PROPAGACION CLONAL

Después que Morel hace más de 20 años, escribiera sobre la propagación "in vitro" de orquídea, innumerables publicaciones han sucedido alrededor de la propagación de plantas de amplio interés económico.

En 1974, Murashige mencionaba 110 especies herbáceas cultivadas "in vitro". Abbot (1977) refería sobre cuarenta especies arbóreas. Hoy se puede afirmar que cualquier planta se puede propagar "in vitro" y que sobre todo para muchos cultivos, esta forma de propagación es más conveniente desde el punto de vista económico. Si hay actividades como el fitomejoramiento o la conservación de germoplasma, que se llevan a cabo en institutos de investigación, en sí la propagación aqãmica "in vitro" o

micropropagación, se realiza la mayor parte en laboratorios que comercializan las plantas y que en muchos cultivos han suplantado los viveros que empleaban como metodología tradicional, presentando en el mercado un producto de mejor calidad y más barato.

La micropropagación es un tipo de propagación vegetativa y por lo tanto consiste en la reproducción de clones con el mismo patrimonio genético de la planta madre. Las características de esta técnica se pueden resumir de la siguiente manera:

- Los cultivos se comienzan a partir de piezas de plantas muy pequeñas, la disponibilidad de material es más abundante siendo cada yema un explante.
- La propagación se lleva a cabo en condiciones de asepsia, libre de patógenos.
- La técnica es aprovechable para sanear las plantas afectadas por virus.
- Es posible producir plantas cuya propagación es difícil o hasta imposible por otros métodos.
- La producción es continua siendo independiente de las variaciones estacionales.
- El material reproducido se puede conservar por períodos largos en caso que no haya posibilidad de venta inmediata.
- El espacio que se requiere es mínimo, generalmente en un frasco de aproximadamente 30 cm ; se desarrollan alrededor de veinte plantas o más, en 1 m caben 80 frascos, en promedio 1.600 plantas. Los cuartos de crecimiento son generalmente de dimensiones muy reducidas con un gasto para el acondicionamiento que influye poco en el costo de producción.
- Las plantas no requieren atenciones significativas entre subcultivos sucesivos, resultando un ahorro de mano de obra significativa.
- La regulación de los factores que influyen en el crecimiento como nutrientes, reguladores de crecimiento, luz y temperatura es más flexible; consecuentemente se puede conseguir una tasa de propagación más grande, respecto a los métodos tradicionales.

Estimulando el explante trámite, condiciones físicas, medio nutritivo, reguladores de crecimiento se obtiene la emisión de yemas axilares que se separan y subcultivan.

La tasa de multiplicación depende del número de yemas cuya emisión se logra estimular del explante y del tiempo necesario para que alcancen el tamaño adecuado para ser separados o recultivados.

Dentro de las posibles desventajas del método podemos mencionar las siguientes:

- Aunque se obtengan en gran cantidad las plantas, son generalmente de dimensiones más pequeñas que las obtenidas por los métodos tradicionales.
- Las plantas que se obtienen, inicialmente no son autotróficas y necesitan un periodo de transición para ser capaces de elaborar sus nutrientes.
- En los primeros días del transferimiento las plantas son más subceptibles a la falta de agua.
- Técnicas no perfeccionadas pueden llevar a la producción de genotipos mutados.

En micropropagación, los tallos originados de las yemas axiliares son excisos y subcultivados cada vez que alcanzan el tamaño adecuado, en este caso es posible calcular la tasa de multiplicación teórica.

Un incremento de 3 tallos cada 4 semanas, permite una producción teórica de más de un millón de nuevos tallos en un año a partir de un explante. Sin embargo estos datos no son reales, una producción tan grande requiere de espacio y mano de obra excesiva. Además no es aconsejable crear una población tan grande a partir de un único explante por el riesgo de una excesiva uniformidad genética.

Algunos datos reales son los siguientes: en propagación de caña de azúcar Sauvaire y Galzy (1987) plantean que se pueden obtener 10,000 plantas enraizadas en un año a partir de un explante. Sin embargo según Pérez et al. (1988) es posible obtener en el mismo cultivo, 10,000 plantas enraizadas en solo 6 meses.

Damasco y Barbe (1983) indican una producción teórica de 200,000 tallos en un año en el clon "Saba" de banano.

#### 3.4.1 Estados de la micropropagación

Para definir las diferentes etapas en el proceso de propagación "in vitro" estas se pueden clasificar en grupos o estados. Las etapas desde la selección de la planta donadora del explante hasta la transferencia de las plantitas a las condiciones naturales ambientales se pueden clasificar en cuatro estados, más la fase preparativa considerada como estado "0" (Denbergh y Maene 1981).

Es importante tener en cuenta que los estados estaran acorde a los métodos de propagación "in vitro" empleados (fig. 6-7).

#### Estado 0. Selección y Preparación de la planta madre

Antes de iniciar la micropropagación debe realizarse una selección cuidadosa de las plantas donadoras de explantes, las cuales tiene que ser plantas sanas y sobre todo libre de virus.

En este estado es importante aplicar tratamientos preventivos a la planta para disminuir los niveles de contaminación, dado que la contaminación del propágulo por microorganismos patogénicos y no patogénicos es uno de los factores más crítico en el cultivo de tejidos.

Dentro de los tratamientos preventivos que se pueden aplicar a la planta madre podemos mencionar los siguientes:

- Que la planta madre crezca y desarrolle en condiciones aisladas (invernadero, vivero).
- Exponer las plantas durante su crecimiento y desarrollo a altas o bajas temperaturas (termoterapia), sobre todo cuando las plantas presentan virosis, en dependencia del comportamiento del patógeno y la especie o variedad a la que pertenece la planta madre.
- Cultivar las plantas en condiciones ambientales, pero efectuando control de la maleza y aplicando control químico, como tratamientos preventivos contra hongos, bacterias y controlando las poblaciones de insectos vectores de virus.

#### Estado I. Establecimiento del cultivo aséptico

El estado I, es el paso inicial para el proceso de la micropropagación en el cual el explante se inocula en medio nutritivo adecuado, previa desinfección en algunas de las soluciones desinfectantes que hoy en día son utilizadas. (ver pág. 64).

El medio nutritivo inicial se caracteriza por poseer todos los macro y micro elementos, vitaminas, carbohidratos más la adición de reguladoras del crecimiento que son agregados para estimular el crecimiento y desarrollo del explante. Estas hormonas por lo general son auxinas y citocininas, (ver pág. 19), las cuales se adicionan juntas o individualmente de acuerdo a la especie y los objetivos que se persigan.

## Estado II. Propagación de propágulos deseables

El objetivo del estado II, es inducir la propliferación de órganos y estructuras que sean capaces de dar origen a plantas enteras.

conforme el procedimiento "in vitro" que se esté desarrollando: inducción a la formación de yemas axilares o adventicias, formación de embricoides o la formación de órganos propagativos (cormos, bulbos, etc.), es que se elabora un medio nutritivo nuevo al cual se transfieren los órganos o plantas obtenidas en el estado I. Las variaciones del nuevo medio sobre todo estribarán en la manipulación de los reguladores de crecimiento que en éste caso, los más utilizados son las citocininas y giberelinas (ver pag.19).

## Estado III. Preparación para el crecimiento en el medio ambiente.

Las yemas o plantitas derivadas del estado II son muy pequeñas y no son capaces de sobrevivir por si solas en el suelo o en el compost.

Los pasos en el estado III son realizados para que las plantitas puedan fotosintetizar y sobrevivir sin la suplementación de carbohidratos artificiales. Por otra parte aunque algunas especies formen raíces adventicias durante el estado III, existen otras que necesitan de un tratamiento especial para la formación de raíces, como el caso de aquellas que requieren de una elongación de su tallo y' la posterior transferencia a un medio nutritivo nuevo en que se estimulará el enraizamiento. Para reducir los costos de la micropropagación algunos laboratorios comerciales trasladan las plantitas de las condiciones "in vitro" a las condiciones de invernadero y bajo estas condiciones inducir la formación de raíces. Para la inducción a la formación de raíces por lo general son utilizadas las auxinas y citocininas (ver pag. 19). Tomando en cuenta todos los aspectos expresados en el estado III, este se ha subdividido en estado IIIa y IIIb. (Deberrqh y Maene, 1981).

### Estado IIIa.

En este estado se realiza la elongación de las yemas formadas durante el estado II. para uniformarlas para el estado IIIb. Por lo general para inducir la elongación de las yemas se utiliza ácido giberélico. (ver pág. 23).

### Estado IIIb.

Estado IIIb, enraizamiento de las yemas "in vitro", obtenidas en IIIa o de las plantitas extra vitrum.

## Estado IV.

Este estado se refiere al traslado de las plantitas de las condiciones "in vitro" a las condiciones ambientales naturales, es de extrema importancia. Si no es realizado con cuidado, transferir las plantas a las condiciones externas, puede ocasionar pérdidas considerables de plantas. Hay 2 razones principales: las yemas desarrolladas "in vitro" tienen que ser expuestas a condiciones de alta humedad relativa y baja intensidad luminica, esto debido a que las plantas "in vitro" pierden rápidamente agua al ser expuestas a condiciones naturales por presentar una membrana epicuticular menos desarrollada que las plantas que han crecido en condiciones de vivero o invernadero.

Las plantas "in vitro" son suplidas con carbohidratos y mantenidas bajo luz, en estas condiciones son incapaces de autoalimentarse a través de la actividad fotosintética. Las plantas al ser transferidas requieren de un periodo de varios días para que sean capaces de producir sus propios alimentos a través de la fotosíntesis.

En el caso de micropropagación por cultivo de yemas a menudo se encuentra una terminología más práctica (fig. 6 y 7) que define las cuatro fases así: establecimiento, ahijamiento, enraizamiento y adaptación.

Figura 6. Propagación in vitro de platano.

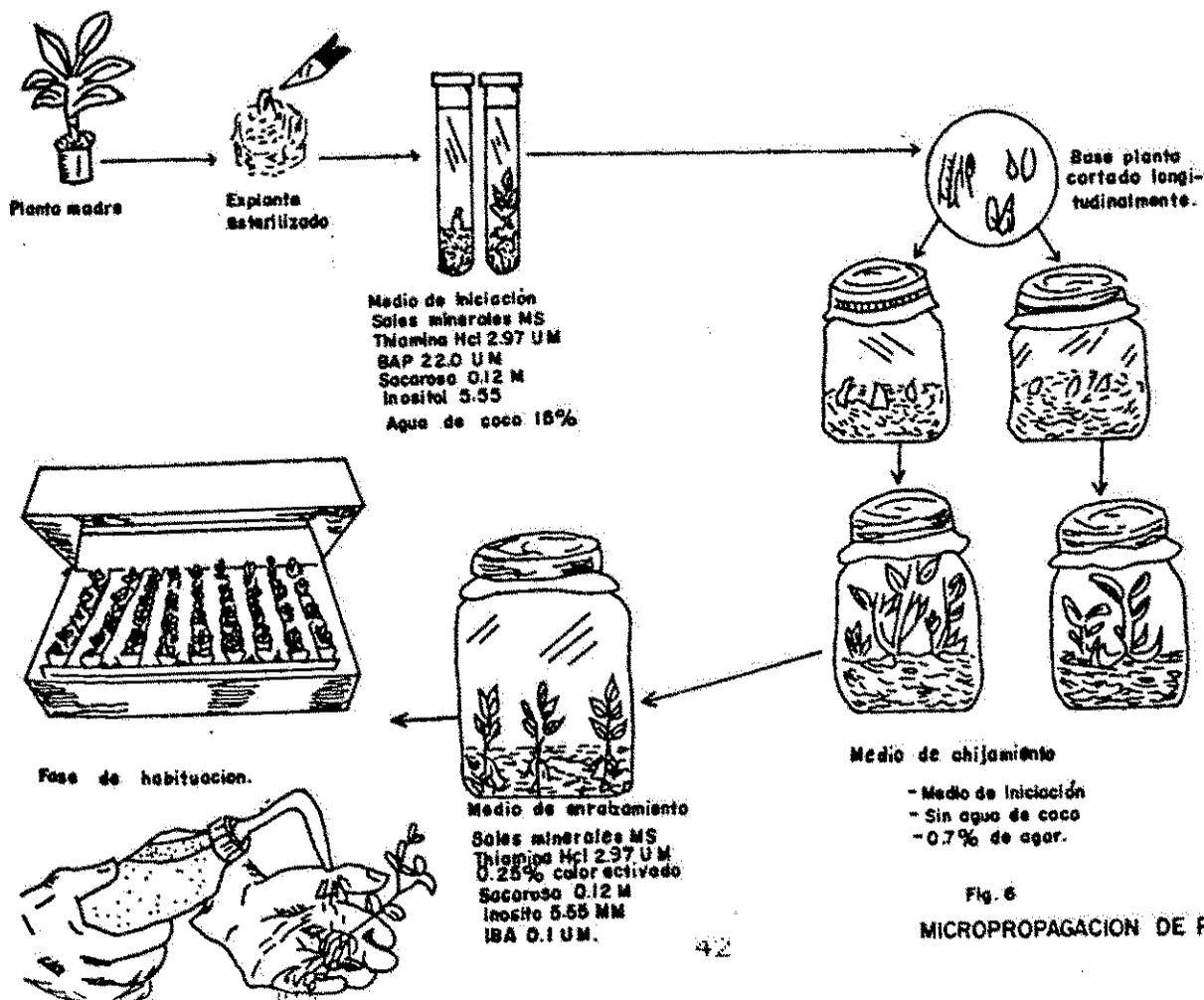


Fig. 6  
MICROPROPAGACION DE PLATANO.

Figura 7. Propagación "in vitro" de yuca por cultivo de nudos.

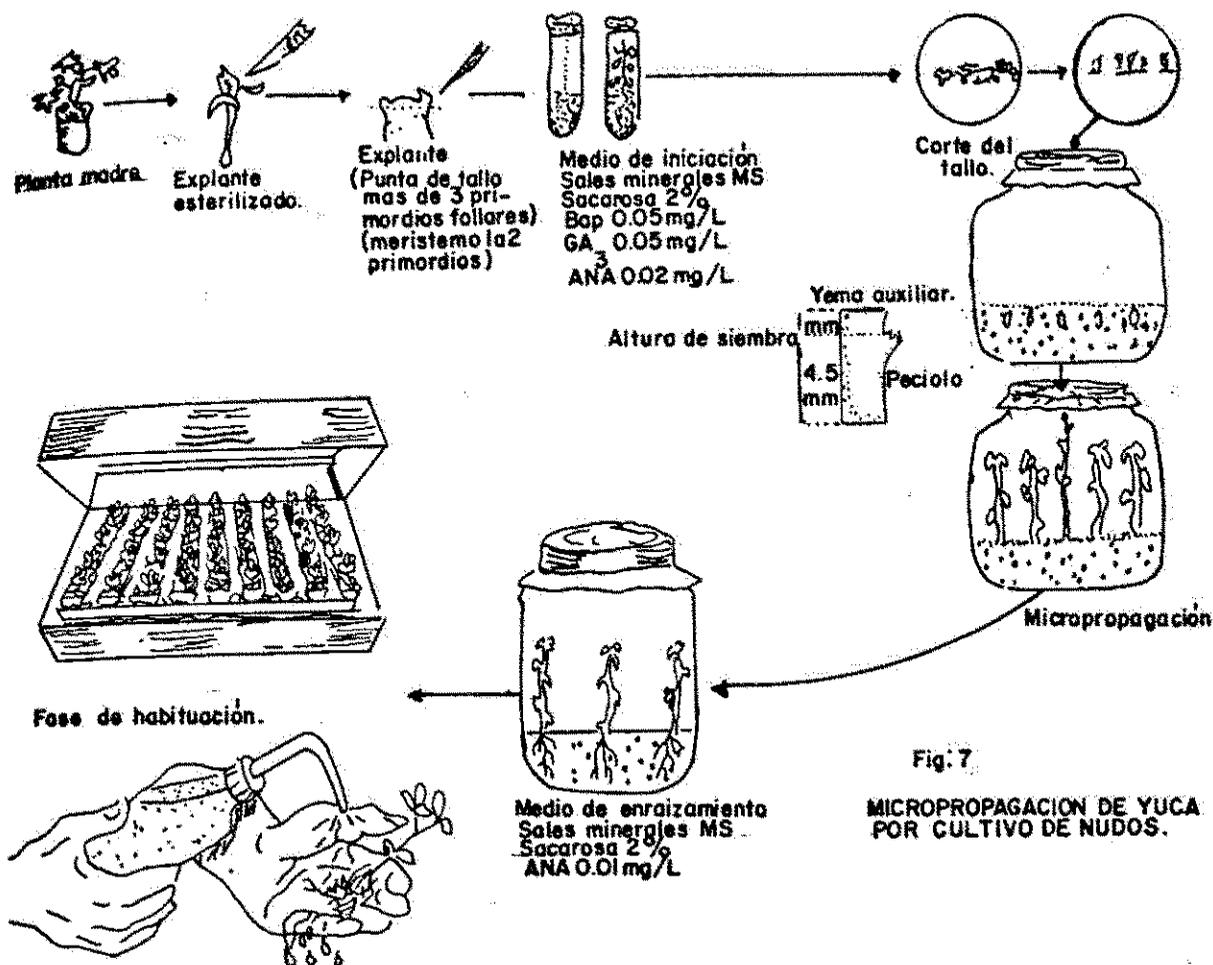


Fig. 7

MICROPROPAGACION DE YUCA POR CULTIVO DE NUDOS.

### 3.5 APLICACIONES EN EL MEJORAMIENTO GENETICO.

Los reciente avances han abierto nuevas posibilidades tanto en el área de la investigación en genética básica, como en el mejoramiento de los cultivos. Se han desarrollado en la actualidad técnicas tales como:

#### 3.5.1 Obtención de mutantes a partir de células "in vitro".

Para incrementar la variabilidad genética y búsqueda sucesiva de variantes y mutantes. La técnica más utilizada es el cultivo de suspensiones celulares siendo más fácil y más probable inducir mutaciones en una célula aislada que en una planta entera.

Se puede tratar suspensiones celulares con agentes mutágenos de varios tipos. Existen métodos para reconocer y aislar las células mutadas; desde estas células con el auxilio de un subtrato con hormonas adecuadas se trata de regenerar una planta completa.

Otra metodología de trabajo se usa cuando se opera para adquirir resistencia a factores adversos. en éste caso, se cultivan las células en presencia del factor, por ejemplo, las toxinas producidas por un hongo o el principio activo de un herbicida. Las células que sobreviven se presume sean resistentes; cuando se logra regenerar una planta se obtiene un individuo resistente.

Por este método Chaleff y Parsons (1980) obtuvieron líneas celulares de tabaco resistentes a picloram; las plantas regeneradas de callo se mostraron resistentes y transmitieron este carácter a su descendencia. En caña de azúcar se han producido variedades resistentes a *Helminthosporium sacchari*, *Sclerotinia sacchari* y al virus del mosaico.

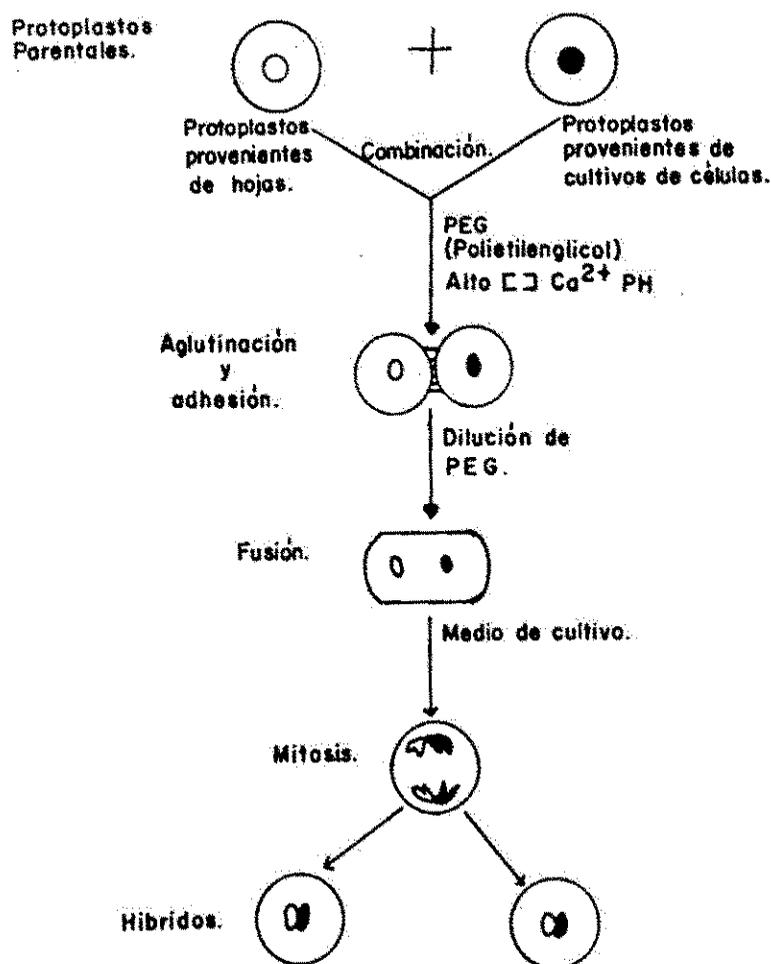
Pese a la eficiencia de los agente mutágenos en la inducción de mutaciones o variaciones, parece ser cada vez menos indicado su empleo debido a que se puede afectar las características deseables, sin que estos cambios se manifiesten "in vitro" y que existe en la naturaleza una fuente de variación amplia la cual es posible detectar aún a baja frecuencia. Larkin y Scowcraft (1981) descubrieron una enorme variabilidad morfológica en plantas regeneradas "in vitro", desde entonces este fenómeno ha sido observado en un gran número de especies y dependiendo del tejido de origen se denomina variación somaclonal (células somáticas), gametoclinal (gameto), mericlinal (meristemo). En general se le denomina variación clonal.

### 3.5.2 fusión de protoplastos

Esta técnica permite unir material genético de especies diversas y producir combinaciones genética ordinariamente imposibles por la presencia de barreras como la incompatibilidad o la autoincompatibilidad, que impiden que una vez realizada la fecundación se desarrolle la semilla, ya sea por rasgos genéticos o bioquímicos (fig. 9).

A nivel interespecífico es necesario el uso de un agente químico, generalmente polietilenglicol (PEG) para lograr la fusión y obtener células heterocariontes.

Figura 8. Fusión de protoplastos.



### 3.5.3 Cultivo de embriones

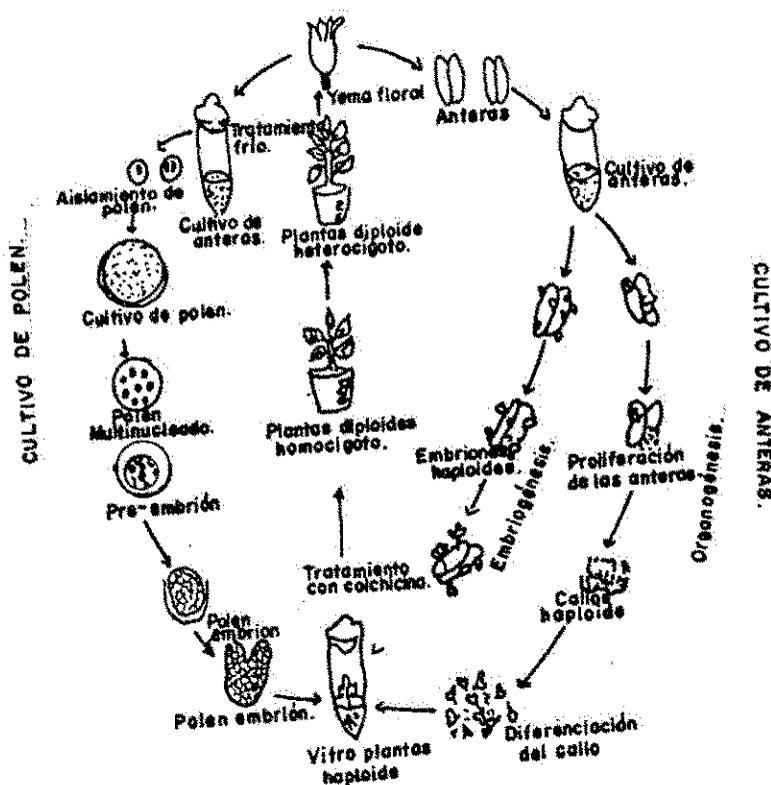
El embrión ha sido entre los primeros órganos que se han cultivado "in vitro". En 1904, Haming describió el desarrollo de embriones excisos de semillas inmaduras de crucíferas. Es de uso común en fitomejoramiento por cuanto permite recuperar productos de cruzamiento que no alcanzarían la madurez. Es muy frecuente cuando se realizan hibridaciones interespecíficas que ocurra la fertilización pero el embrión no se desarrolla y al poco tiempo aborta. Estos embriones aislados precozmente y sembrados en un medio generalmente sin hormonas, en la mayoría de los casos se desarrollan normalmente. Dada la dificultad material (el embrión debe tener por lo menos 50 células) esta práctica no es aplicable a gran escala, pero se han obtenido buenos resultados en más de 40 familias.

### 3.5.4 Cultivos de plantas haploides

El polen tiene debido a la meiosis, un número de cromosomas igual a la mitad del número característico de la especie. En medios de cultivos oportunos esta célula haploide se desarrolla en una plantita con número haploide de cromosomas (fig. 9).

La ventaja es que siendo una única serie de cromosomas, se pueden evidenciar caracteres mutantes dado que no hay ningún efecto modificador de genes recesivos por parte de genes dominantes. Las plantas procedentes de polen son útiles en la inducción de mutaciones para producir sucesivamente variedades puras por autofecundación, para producción de híbridos y en experimentos de selección recurrente.

Figura 9. Cultivo de plantas haploides.



Por medio de técnica diploizante, generalmente con uso de colchicina, es posible duplicar el número cromosómico, originando cromátides idénticas o sea líneas puras.

Los mayores éxitos se han conseguido en Solanáceas, Gramíneas y Compuestas. Nakamura y Coll, han obtenido variedades de tabaco resistentes a enfermedades en solo dos años.

La producción de plantas haploides puede seguir dos vías:

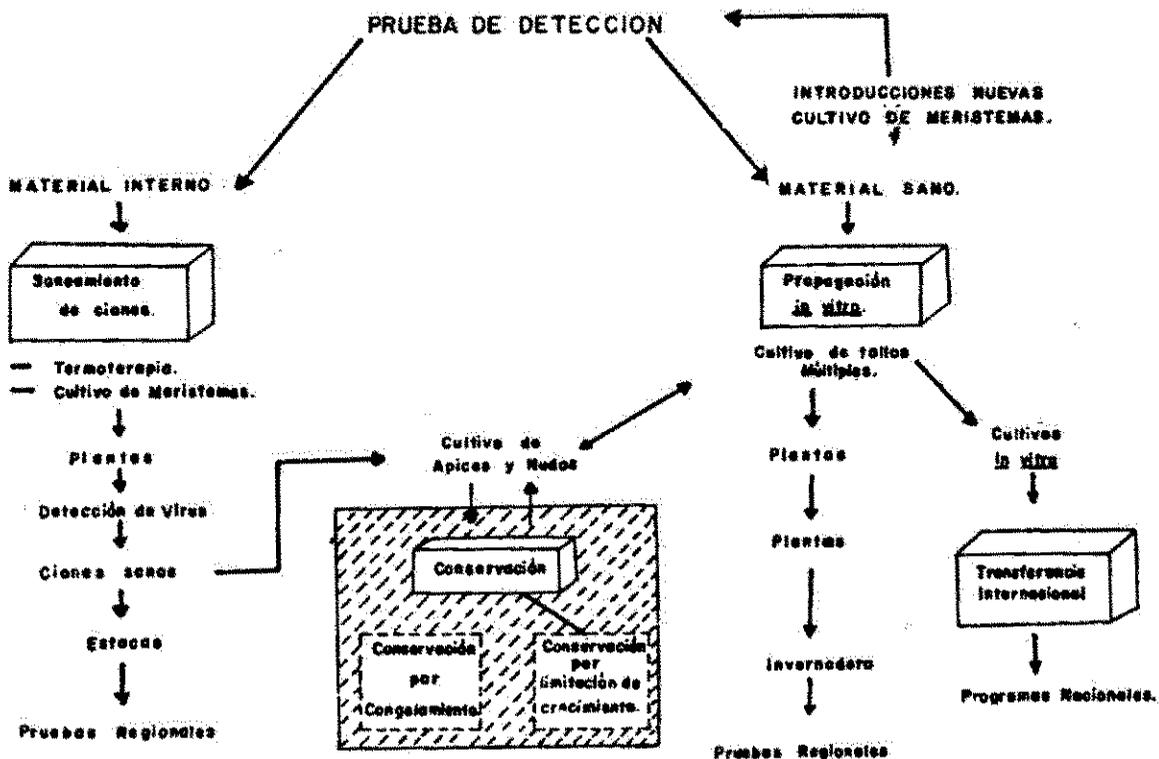
- Por morfogénesis directa: en este caso de la antera o óvulo inoculados en el medio nutritivo se forman embriones somáticos de los cuales se originan las plantitas directamente.
- Por morfogénesis indirecta: en esta otra forma se obtiene primeramente un callo, que se cultiva después en un medio deferente para inducir la formación de embriones somáticos.

### 3.6 CONSERVACION DE GERMOPLASMA.

En la conservación de germoplasma el cultivo de tejidos ha venido a desempeñar un papel fundamental en la preservación de los recursos genéticos vegetales.

Materiales que con muchas dificultades son conservados, ya sea por problemas fisiológicos, genéticos, económicos, patológicos etc, ha sido posible conservarlos "in vitro", significando esto una considerable reducción en los costos económicos u una mayor seguridad para los bancos de genes.

Figura 10. Banco de germoplasma de meristemas de yuca: usos.



## Para la conservación "In vitro" existen tres métodos:

- 3.6.1.- Método de crecimiento continuo .
- 3.6.2.- Método de supresión total del crecimiento y metabolismo o criopreservación.
- 3.6.3.- Método de crecimiento a tasas mínimas.

### 3.6.1 Método de crecimiento continuo

Este primer método hoy en día no es empleado, por el reducido tiempo de la fase de conservación, que conlleva a continuos y perennes subcultivos y con ello el riesgo de alta inestabilidad genética.

### 3.6.2 Método de criopreservación

La criopresevación, criogénesis o supresión total del crecimiento y metabolismo es el método en el cual las células o tejidos pueden en teoría mantenerse vivos indefinidamente en un estado de suspensión inanimada, es decir, que cesan las reacciones bioquímicas sin que estas pierdan la viabilidad, mediante la aplicación de ultrabajas temperaturas (-196 C, temperatura del nitrógeno líquido). A través de estudios se ha determinado que el material más adecuado para utilizar en la conservación son aquellas células o tejidos (conjunto de células) que presentan una alta densidad citoplasmática y un bajo contenido de agua; ejemplo, células meristemáticas. Sin embargo, la crioconservación se encuentra todavía en su etapa investigativa.

### 3.6.3 Métodos de conservación "in vitro" por limitación de crecimiento a tasas mínimas.

Este método consiste en mantener los cultivo (yemas, plántulas derivadas de nudos o directamente del meristemo etc.) en condiciones físicas (factores-ambientales) y/o químicas (composición del medio de cultivo) que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia a medios frescos.

La tasa de crecimiento de los cultivos "in vitro" se puede controlar usando los siguientes factores:

1. Temperatura: de acuerdo a la tolerancia de las especies a las bajas temperaturas.
2. Nutrientes orgánicos e inorgánicos: por reducción de 1/2, 1/3 o más.

3. Reguladores de crecimientos: Utilizando inhibidores.
4. Concentración osmóticas del medio: Utilizando como sustancias osmóticas sacarosa, manitol u otros agentes.
5. Otros Factores: tamaño de los tubos o frascos, intensidad de la luz y fotoperíodo.

### 3.7 Producción de metabolitos secundarios.

El cultivo de tejidos ha abierto la posibilidad de la industrialización biológica. en tal sentido se plantea la posibilidad de producir o cultivar tejidos a gran escala como una fuente potencial de proteínas para el hombre, esto partiendo del hecho que para muchas de las especies comestibles ya se han definido los medios nutritivos, (Byrne y Koch, 1962).

Hay investigadores que trabajan desde hace algunos años en el uso de los cultivos "in vitro" como alimentos y para favorecer el intercambio gaseoso en situaciones especiales como por ejemplo viajes espaciales, (Hildebrandt, 1966).

## CAPITULO IV

### LABORATORIO

Factor muy fundamental para el éxito de la técnica de cultivo de tejidos es la organización del laboratorio. Esto implica la correcta construcción y adecuada distribución de equipo e instrumental. Existe relación estrecha entre la organización del laboratorio, las condiciones de asepsia y la eficiencia del trabajo.

#### 4.1 DISPOSICION ESPACIAL DEL LABORATORIO

En un laboratorio de Cultivo de tejidos las diferentes fases del trabajo requieren áreas específicas: se pueden distinguir (fig. 7) las siguientes:

- 4.1.1 Área para elaboración del medio.
- 4.1.2 " " Aseptica para transferencias.
- 4.1.3 Uno ó más cuartos de Crecimiento climatizados.

##### 4.1.1 Área para elaboración del medio

Comprende tres zonas:

- Zona para el lavado de la cristalería.
  - Zona para preparación del medio de cultivo.
  - Zona de esterilización.
- Zona para el lavado de la cristalería

Esta zona debe ser amplia y espaciosa, de tal forma que permita un movimiento fácil. Debe contar con todas las condiciones e implementos requeridos para realizar el lavado, limpieza y secado de la cristalería.

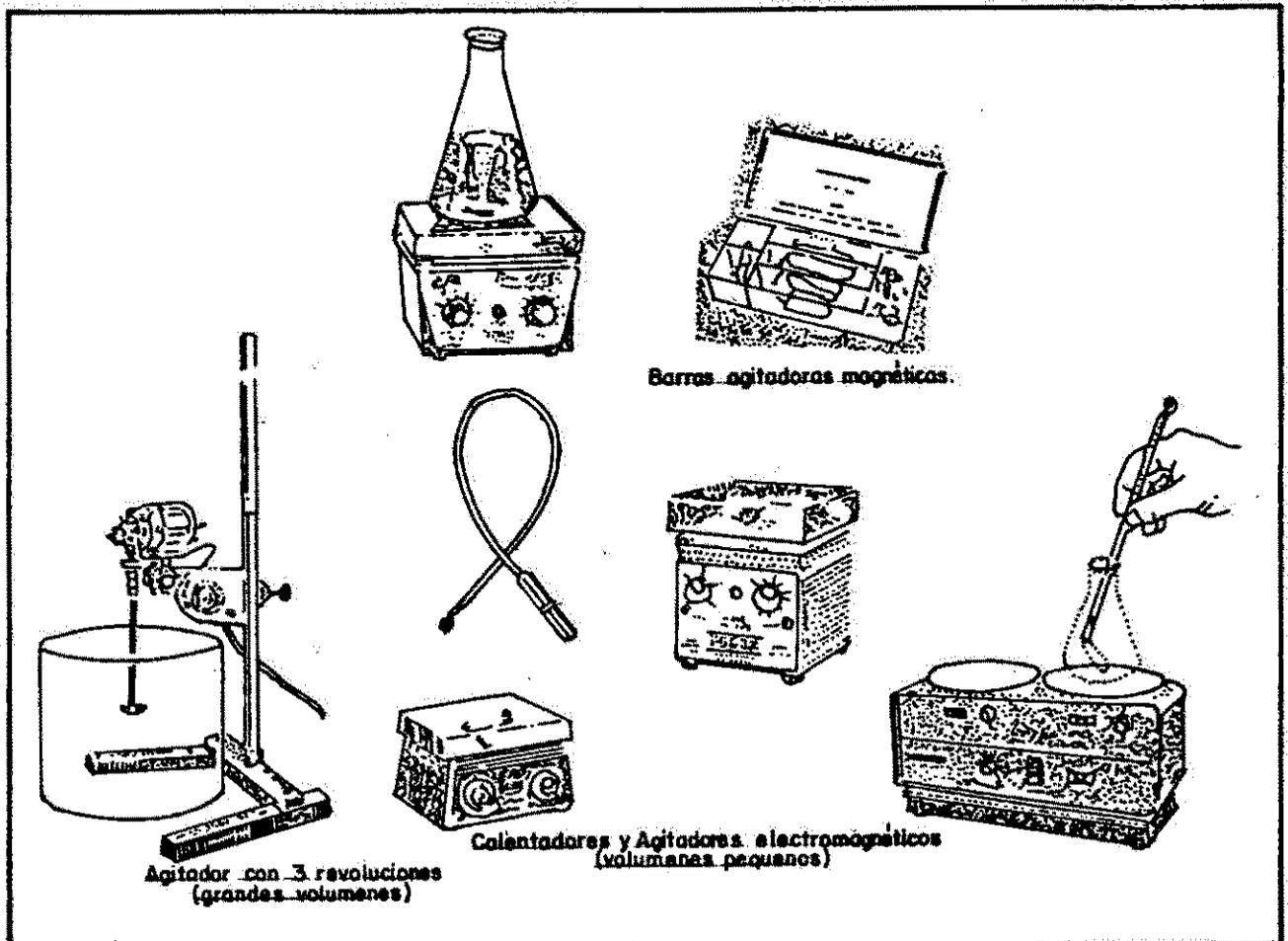
La zona de lavado, poseerá un lavabo doble de tamaño grande conectado a un sistema de drenaje construido con material que resista a los reactivos. en lo posible deberá poseer agua fría y caliente. Puede utilizarse como fuente de agua caliente, el agua que emana del destilador. El destilador (metálico) debe estar conectado al demineralizador ó a un destilador de vidrio para la obtención de agua bidestilada. Se deberá contar también con un juego de escobillas de diversos tamaños, un horno de aire caliente para el secado de la cristalería, un lavapipetas, cubetas de acero o polipropileno con tapa, detergentes y desinfectantes.

- Zona para preparación de medios de cultivos

Esta zona es donde se realiza todo el proceso para la elaboración de los medios de cultivos. En ella encontraremos los siguientes implementos: balanza analítica, con una precisión de 0.001 g; 2 o más agitadores electromagnéticos, con plancha calentable y regulador de temperatura, los cuales son utilizados en la disolución de las sales y el cocimiento del agar cuando los volúmenes de medios nutritivos son pequeños, en el caso que el volumen de medio es muy grande lo más recomendable es utilizar un agitador mecánico con una fuente de calor, que generalmente es una hornilla de gas (fig. 11); una balanza técnica, para pesadas mayores de 1gr; un potenciómetro el cual sea sensible a los cambios de temperatura; un dispensador para distribuir el medio nutritivo en los frascos; un refrigerador con dos compartimentos de diferentes rangos de temperatura, uno entre 5 y 10 C y el otro entre 0 y -5 C. En el primero se almacenan las sales y soluciones madres y en el otro hormonas y vitaminas.

También esta zona deberá poseer planos de trabajo suficientemente amplios y de material de fácil limpieza, por ejemplo formica, y muebles para guardar la cristalería y el instrumental.

Figura 11. agitadores.



- Zona de esterilización

Esta zona es donde se realiza todo el proceso de esterilización para garantizar que el material no este contaminado. Se requiere una cadena de asepsia desde el momento de la esterilización del explante hasta el momento del transferimiento de las plantitas a la intemperie.

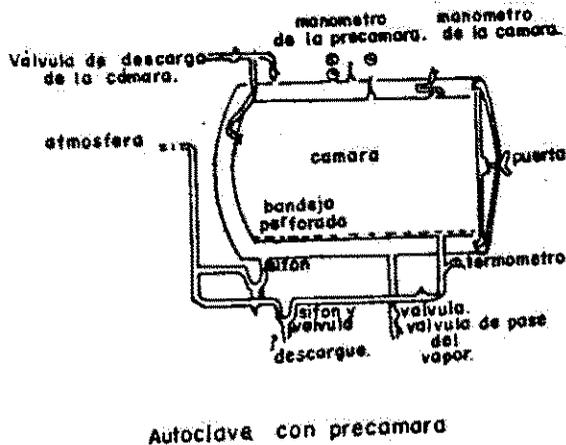
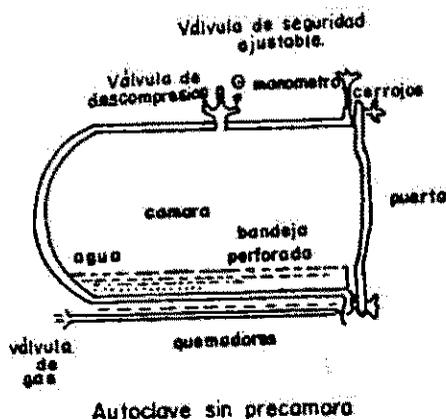
El medio de cultivo, los frascos, instrumentos y sustancias que se pongan en contacto con el explante esterilizado o con las plantas ya establecidas "in vitro" deben ser esterilizados.

En la zona de esterilización para realizar el tratamiento con alta temperatura al medio, instrumentos y cristalería se cuenta con un autoclave (fig. 12) para tratamiento con calor húmedo, que garantice temperaturas entre 120 C y 130 C y dos atmósferas de presión.

Figura 12. Autoclave.

Recomendaciones del uso del autoclave  
Particularmente para tipo no automático

1. Chequear el volumen de agua en el autoclave.
2. Chequear la posición de la válvula de seguridad.
3. Colocar en el autoclave los artículos a esterilizar y dejar entre estos un espacio que permita el flujo del vapor.
4. Cerrar la puerta y asegurar con los cerrojos; los cerrojos pueden estar a nivel o diagonalmente.
5. Abrir la válvula del pase del vapor.
6. Preparar los controles automáticos del autoclave.
7. Encender el gas o conecte el interruptor eléctrico.
8. Permitir el paso del vapor de agua. Cerrar la válvula de pase del vapor.
9. Una vez alcanzada la presión requerida, esta se regula a través de la temperatura, si es automático no es necesario hacerlo.
10. Cuando los artículos han estado a la presión requerida y el tiempo correcto, se desconecta el autoclave y se espera a que la temperatura esté por debajo de 100 C y el manómetro de la presión se encuentre en cero.



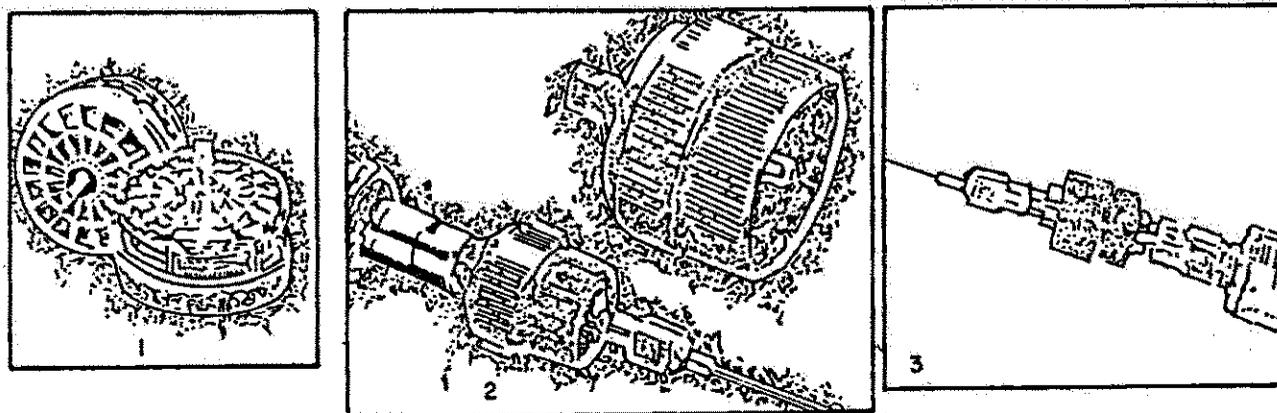
Esterilización en húmedo		Esterilización en seco	
Temperatura	Tiempo de Esteriliza.	Temperatura	Tiempo de Esteriliza.
100 C	20 HORAS	120 C	8 HORAS
100 C	2.5 HORAS	140 C	2.5 HORAS
115 C	50 MIN.	160 C	1 HORA
121 C	15 MIN.	170 C	40 MIN.
125 C	6.5 MIN.	180 C	20 MIN.

En el autoclave se esteriliza el medio nutritivo exceptuando algunos de sus constituyentes los cuales presentan cierto grado de degradación, por lo que se tendrán que esterilizar en frío. Linsmaier y Skoog (1965), reportan que la tiamina es parcialmente destruida durante la esterilización. Dodds y Roberts (1982), dicen que hay descomposición rápida particularmente si el pH del medio está por encima de 5.5.

Algunos de los productos potencialmente termolábiles enlistados por Liao y Boli (1970), son: riboflavina, ácido nicotínico, nicotianamida L-glutamina, urea, L. asparagina, sulfato de adenina, vitamina B12, ácido fólico y cloruro de colina.

Los componentes termolábiles se esterilizan por ultrafiltración a temperatura ambiente; lo más recomendable es utilizar filtros millipores de diámetro de 0.22  $\mu\text{m}$  (fig. 13) que retienen las bacterias más pequeñas. Para esterilizar pequeñas cantidades se conecta el filtro a una jeringa.

Figura 13. Esterilización por filtración o en frío.



La esterilización por filtración se utiliza especialmente cuando se desea preservar intacta las propiedades químicas de sustancias termolábiles a temperaturas de esterilización.

Para la filtración pueden emplearse los filtros millipore descartables (Figura 1) o utilizar porta filtros (fig. 2) los cuales pueden ser esterilizado y reutilizado nuevamente. En el porta filtro deberá colocarse el prefiltro y el filtro, una vez realizado esto se ensambla a una jeringa y se procede a esterilizarlos. Una vez esterilizados se procede a la filtración (figura 4) dentro del flujo laminar.



Uno de los prefiltra utilizado es el Millipore AP 25-02200 con 10mm de diámetro y soporta presiones hasta de 7  $\text{kg cm}^2$ .

De los filtros se puede utilizar el Millipore GS con poros de 0.22  $\mu\text{m}$  el HA con 0.45  $\mu\text{m}$ .

Las condiciones de esterilización en autoclave pueden variar de acuerdo al volumen de medio nutritivo (fig. 12), pero la mayoría de la literatura reporta que la exposición del medio a 120 C, 2 atmósferas de presión y un tiempo de exposición de 15 a 20 minutos garantiza la esterilización del medio. Para evitar la contaminación de los frascos en el transporte del autoclave a la cámara de flujo laminar es recomendable envolver los frascos con papel y desempacarlos bajo la cámara previo a su utilización. Existen diferentes tipos de materiales para envolver los frascos, papel de celulosa, teflón y otros más caro como el papel de aluminio.

Para evitar que el explante se deshidrate durante su permanencia en el flujo laminar, es oportuno mantenerlo en agua, por ello se recomienda esterilizar cierta cantidad de agua junto con el medio nutritivo. La esterilización de la cristalería e instrumental se realiza en el horno dado que el calor húmedo aumenta la oxidación del instrumental metálico y que para el trabajo se requiere que la cristalería esté seca. Por el hecho expuesto anteriormente es indispensable envolver todo en papel y desempacarlos al momento de utilización.

Una consideración general para esterilizar la cristalería e instrumentos es la siguiente:

Temperatura C	Tiempo Minutos
121	15-30
140	10-25
160	7-15
180-180	5-10

Cabe señalar que esta temperatura depende del material a esterilizar, por lo que se sugiere comprobar diferentes condiciones.

#### 4.1.2 Cuarto de transferencias

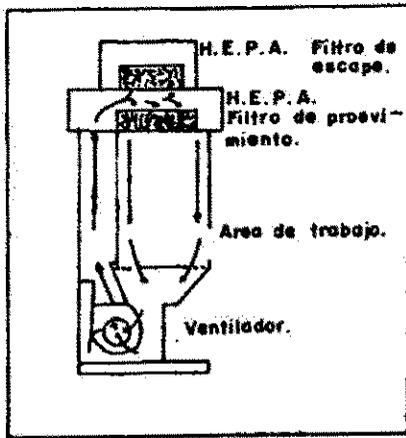
Es el Área del laboratorio donde se realizan las inoculaciones y transferencias periódicas de los explantes en medio nutritivo fresco. En esta zona el flujo de gente debe de ser mínimo y las condiciones de limpieza más rigurosas.

En esta Área deberá encontrarse la cámara de flujo laminar, única superficie que posee una alta probabilidad de estar completamente libre de microorganismos después de algunos minutos de funcionamiento. En el flujo deberán estar los siguientes accesorios: Un mechero bunsen o un mechero de alcohol o un hornillo con resistencias eléctricas; un estereoscopio, una cubeta para depositar los desperdicios durante el trabajo y una lámpara ultravioleta para la esterilización del cuarto. La cámara garantiza el flujo de aire filtrado libre de polvo y microorganismos.

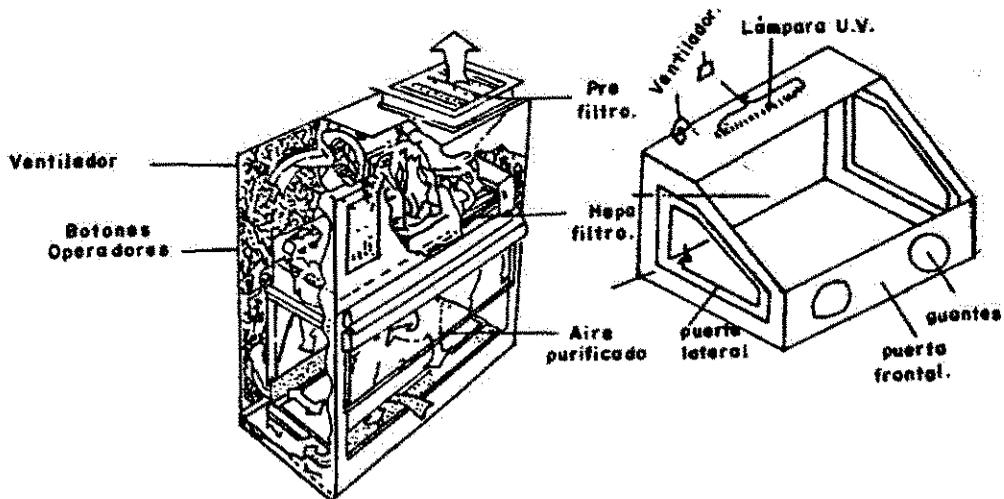
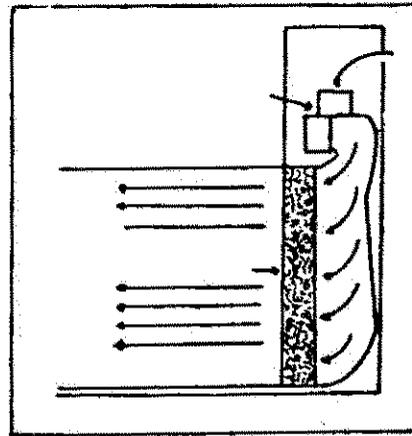
Existen 2 tipos de flujos laminares, horizontal y vertical (Fig. 14). En el cultivo de tejidos es preferible el flujo horizontal que no ocasiona turbulencia y que experimentalmente ha reportado menor contaminación. Existen de diferentes tamaños, con espacio hasta para cuatro operadores siendo el espacio adecuado por operario de 90 cm aproximadamente.

Figura 14. Lámparas de flujo laminar.

Cámara de flujo laminar vertical.



Cámara de flujo laminar horizontal.



Antes y durante el trabajo es importante limpiar la superficie de trabajo en la cámara con alcohol al 70%. Se aconseja tener la lámpara ultravioleta encendida algunas horas antes de iniciar el trabajo. Por ningún motivo se deberá ingresar en el cuarto de transferencia mientras esté encendida la luz dado que los rayos ultravioleta son muy dañinos para la vista.

El trabajo en la cámara requiere una buena manualidad, antes de abrir y cerrar cada frasco debe flamearse el cuello de este por algunos segundos, evitar en lo posible el contacto de la tapa del frasco con el plano, flamear las pinzas y bisturios previo a una rápida inmersión en alcohol después de haber concluido el trabajo en cada uno de los frascos. Cada operador deberá poseer un frasco con alcohol al 70% y un mechero, se aconseja disponer de al menos 2 bisturios y dos pinzas para alternarlas, de manera que exista tiempo suficiente para que éstas se enfrien.

También se puede utilizar en vez de un flujo laminar, para realizar la transferencia, una pequeña área bien aislada y con altas condiciones de asepsia.

#### 4.1.3 Cuarto de crecimiento

El cuarto de crecimiento o de cultivo es el área donde los explantes se desarrollan y crecen bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

La temperatura se regula con un acondicionador termostático. En cuartos grandes es importante un equipo de ventilación para evitar bolsas de aire que hagan variar la temperatura. Se aconseja poner afuera del cuarto de crecimiento todo aquello que fuese fuente de calor, por ejemplo, los balastos. La temperatura óptima para el cultivo de la mayoría de las especies está aproximadamente entre los 20 C y 30 C.

En los cuartos de conservación de germoplasma, la temperatura puede bajar hasta los 8 a 10 C. Para el ahorro de energía el cuarto de crecimiento deberá ser aislado térmicamente.

La luz es proporcionada a través de candelas fluorescentes con espectro similar a la luz solar, las cuales se colocan en los estantes por encima de los tubos que contienen los explantes (fig. 15). El equipo de iluminación deberá estar controlado por un reloj o nema para regular el fotoperíodo. Cada lámpara tendrá apagadores independientes (fig. 16). La intensidad luminica variará en un rango de 500 a 10.000 lux, en dependencia del tipo de cultivo y fines, que se persigan.

Figura 16. Controles de las fuentes de luz.

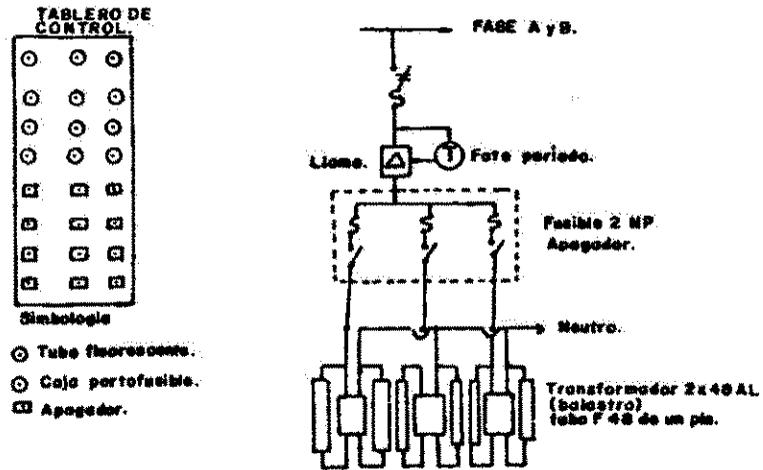
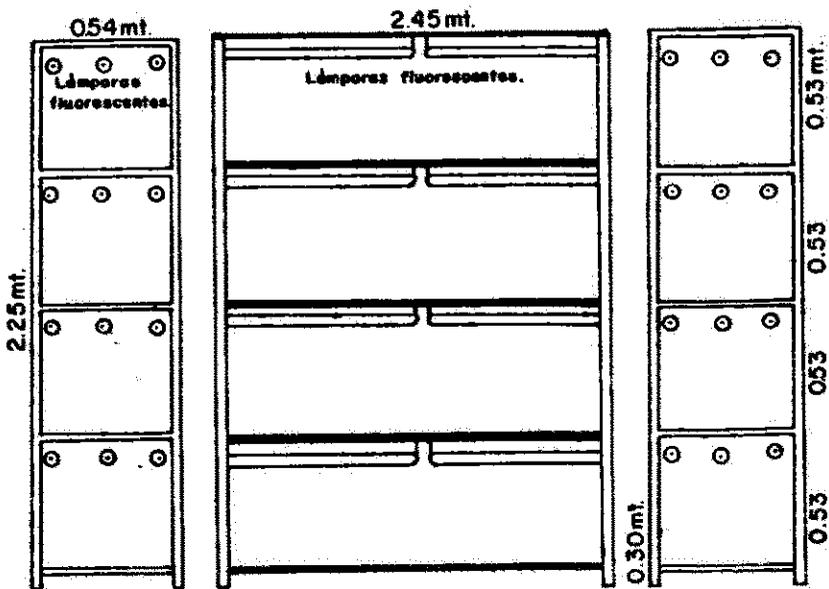


Figura 15. Distribucion de la luz.



La humedad no es un factor de mucha importancia y esta será empleada únicamente en trabajos que requieran de su control.

Existen en el comercio cámaras climatizadas de diferentes tipos y tamaños, pero generalmente es más conveniente acondicionar un cuarto con todos los requerimientos mencionados anteriormente. En este caso los anaqueles tendrán dimensiones de 80 - 90 cm de ancho, la distancia entre las mesas dependerá

de la disposición de las lámparas y del tamaño de los frascos variando generalmente entre 30 y 70 cm (tio. 15).

Puede ser útil instalar algunos tomacorrientes en el cuarto de crecimiento. El flujo de personal a esta área deberá ser limitado y es recomendable que exista un sistema de alarma en el caso que la temperatura aumente y un generador eléctrico de emergencia.

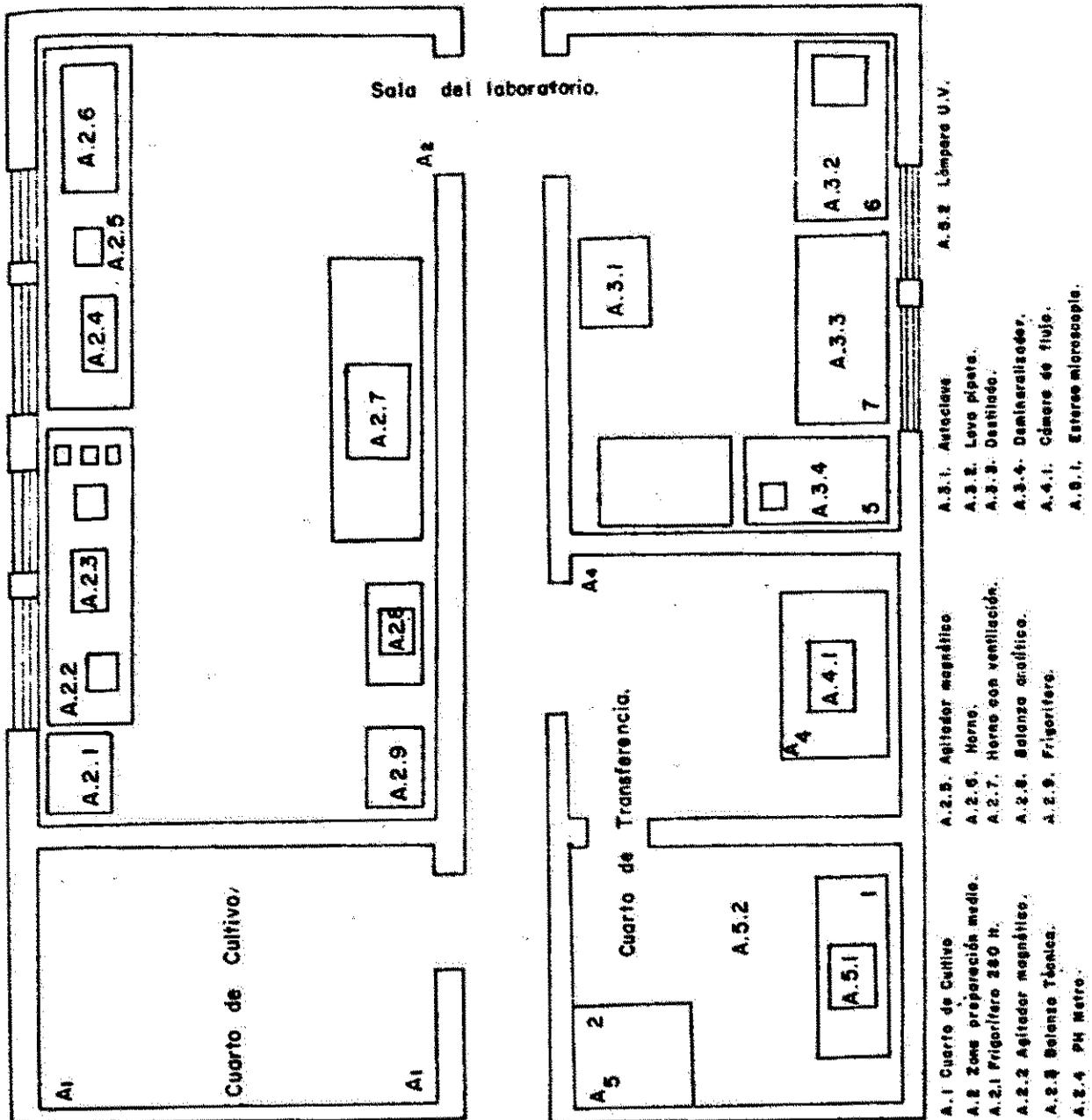
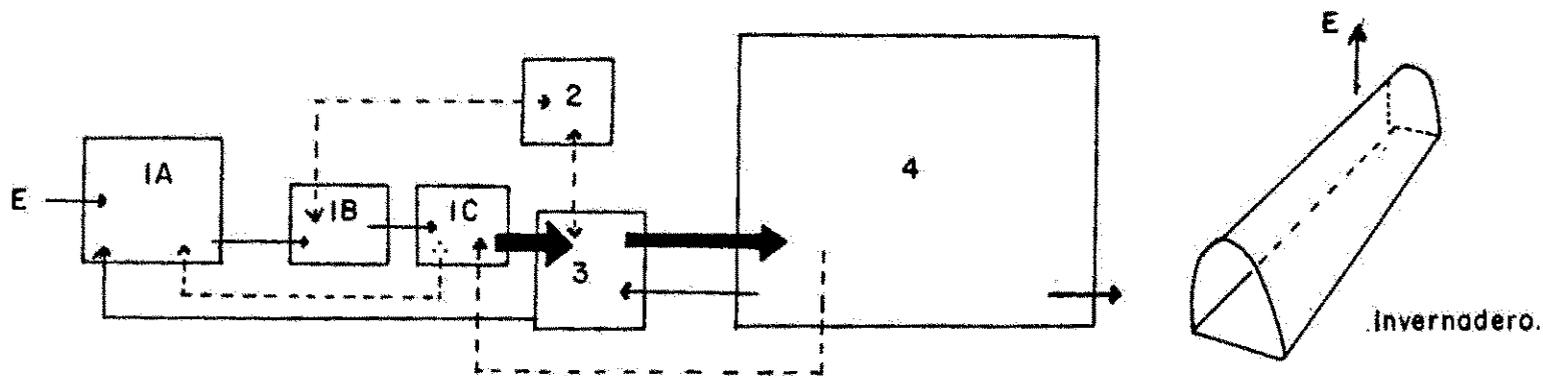


Fig.17 Plano, laboratorio de cultivo de tejidos vegetales (REGEN, 1968).

Fig. 18. Laboratorio de Cultivo de Tejidos (Esquema de Area y Flujo)



Las diferentes áreas están en relación volumétrica.

I Cocina: IA Lavado Cristalería.  
 IB Preparación de medios.  
 IC Autoclave.

2 Balanza analítica y microscopio.  
 3 Area de transplante (cámara de flujo)  
 4 Cuarto de Crecimiento.  
 E Ambiente externo.

Las flechas indican los movimientos (personas y materiales): dirección, intensidad (relacionar espesor), ocasionalidad (línea-punteada).

- |         |                                       |        |  |
|---------|---------------------------------------|--------|--|
| E → IA  | Abastecimiento desde el exterior.     | 4 → 3  | Vasos con material vegetal.            |
| IA ↔ IB | Vasos de cultivo; productos químicos. | 3 → IA | Vasos vacíos.                          |
| IB → IC | Vasos con medio; autoclave.           | 4 → IC | Vasos contaminados.                    |
| IC → 3  | Vasos con medios esterilizados.       | IC → 4 | Vasos esterilizados al lavavo.         |
| 3 → 4   | Vasos con material vegetal.           | IB ↔ 2 | Pesada productos químicos.             |
| 4 →     | Invernadero. Plantas enraizadas.      | 2 ↔ 3  | Preparación y extracción de explantes. |
| E       | Plantas aclimatadas.                  |        |  |

## 4.2 CRISTALERIA INSTRUMENTAL Y EQUIPO

### 4.2.1 Cristalería

Dentro del equipamiento del laboratorio es importante tener en cuenta la cristalería la cual debe cumplir con cada una de las funciones dentro del proceso de trabajo, funciones como:

#### Medición de volúmenes

- pipetas
- micropipetas
- probetas
- balones aforados
- contenedores graduados

#### Preparación de medios

- beaker
- balones
- erlenmeyer
- cilindros

#### Contenedores de soluciones y medios

- frascos transparentes
- frascos oscuros
- botellas
- contenedores plásticos

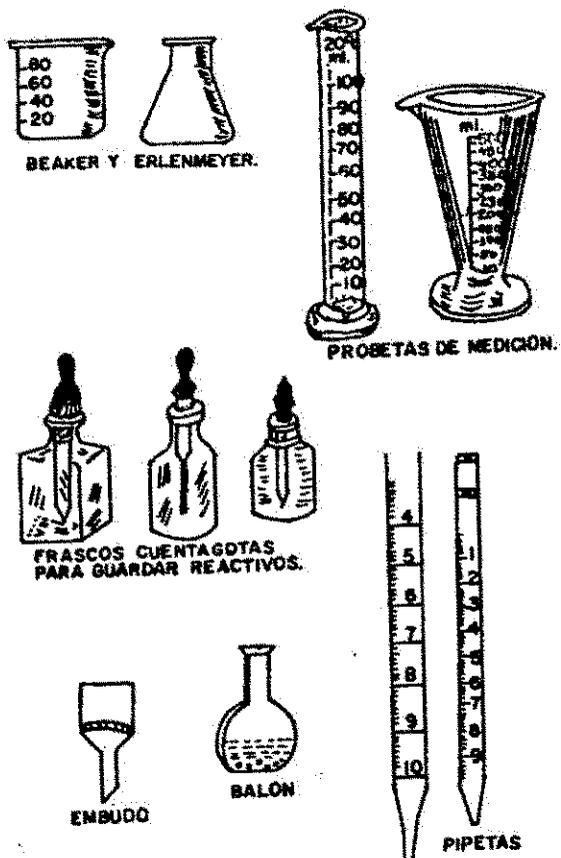
De cada una de las cosas mencionados anteriormente se deberán poseer de volúmenes variados.

#### Contenedores para las plantas.

Dependiendo del tipo de cultivo se necesitan diferentes contenedores. En el caso de propagación clonal la siembra del explante se efectuará en contenedores individuales, generalmente tubos con un tamaño de 2 a 3 cm de diámetro por 10 a 15 cm de largo. En la fases sucesivas se utilizan vasos más grandes en los cuales se pone el número más alto posible de explantes. Existe una infinidad de tamaños utilizables pero el más frecuente es el de 10 cm de diámetro y 10 - 12 cm de alto.

Es importante tener en cuenta la dimensión del cuello del frasco, siendo preferible los de cuello amplio para evitar que durante la extracción y introducción del material haya contacto

Figura 19a. Cristalería.

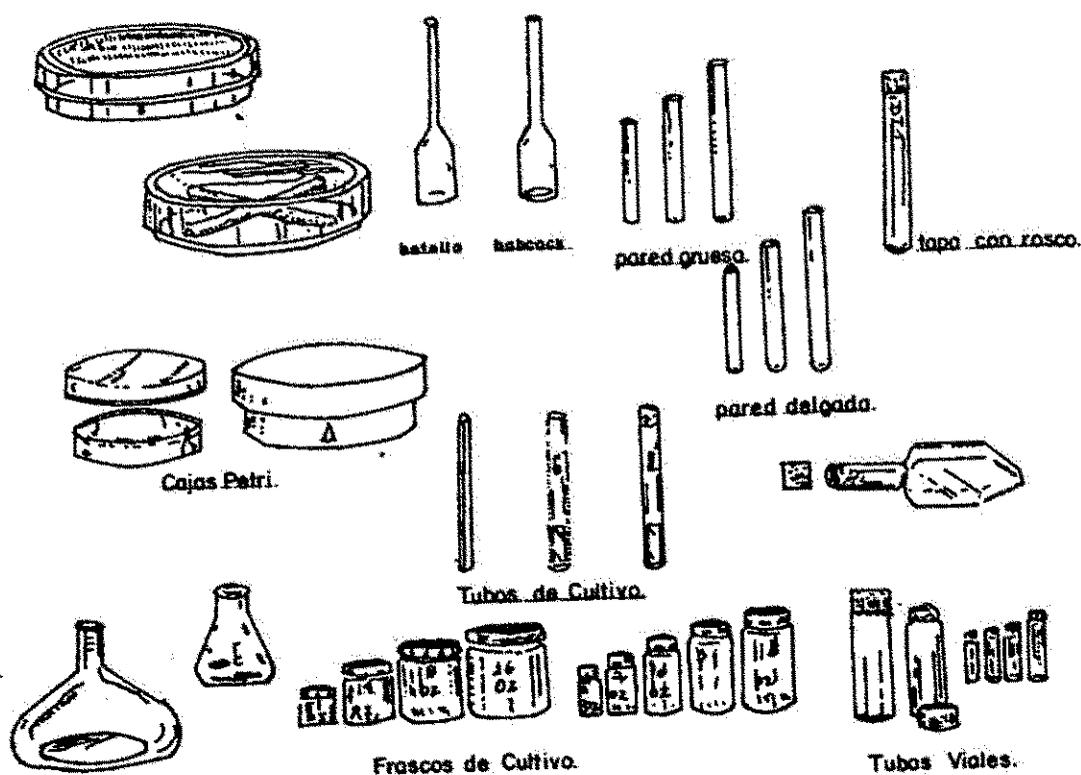


con las paredes. Las cajas petri tienen un uso bastante limitado y se utilizan como plano de trabajo estéril.

Todos los recipientes necesitan ser tapados con cierta hermeticidad, para lo cual se puede utilizar tapas de vidrios, metálicas, de algodón, plásticas y vaquelita. Cualquiera que sea el material debe ser resistente a la temperatura de esterilización y a la flama del mechero.

Para aminorar los riesgos de contaminación se coloca alrededor de la tapa papel parafinado o teflón.

Figura 19b. Cristalería



Básicamente toda la cristalería empleada está hecha a base de la combinación de silicato y óxidos metálicos, fusión que mediante variados procesos de manufacturación da origen a los más diversos tipos de cristalería. Desde los que poseen poca resistencia a las altas temperaturas. Hasta los que soportan elevadas temperaturas. Así encontramos cristalería a base de boro silicato, silicato de aluminio, etc. Esta cristalería aparece en los catálogos con número que también está marcado sobre el recipiente, el cual expresa las propiedades de dicho cristal. Así por ejemplo encontramos cristalería con el número

de código 7740 y el cual nos indica que esta es a base de boro silicato, resistente a ácido y alcalis, coeficiente de expansión bajo etc.

Aunque la mayoría de los laboratorios generalmente utiliza recipientes de cristal, estos pueden ser sustituidos por recipientes plásticos, siempre y cuando cumplan con los requisitos mínimos, resistencia a altas temperaturas, resistencias a altas presiones, facilidad de limpieza, bajo coeficiente de fricción y translucidez. Dentro de los materiales plásticos podemos mencionar el teflón (polimero fluorinado). resina epoxy, nylon, polimetil penteno, etc.

Con respecto a los frascos de cultivo, no necesariamente se debe emplear cristalería manufacturada con alta tecnología y de altos costos, como el pyrex, sino también se puede utilizar los frascos de vidrios empleados por la agroindustria en el envase de mermeladas, alimentos para niños, etc.

#### 4.2.2 Instrumental

Existe una enorme cantidad de instrumentos de diversas y variadas formas para la preparación y disección de órganos y tejidos para el cultivo y sub-cultivo "in vitro".

A continuación enumeramos y mostramos algunos.

Bisturries	espátulas
pinzas	saca bocados
tijeras	aguas de disección
hojas de rasurar	

Figura 20. instrumental de disección y inoculación.



## Consideraciones Económicas

A partir de lo expuesto resulta que es posible armar un laboratorio de cultivo de tejidos para propagación y conservación utilizando equipo de tecnología media. Los costos comparados con la mayoría de los laboratorios de investigación es relativamente accesibles. Presentamos a continuación un listado del equipo básico

Lámpara U.V.  
balanza técnica  
autoclave  
cámara de flujo laminar  
lava pipeta

potenciómetro  
agitador magnético  
horno con ventilación  
refrigerador  
demineralizador

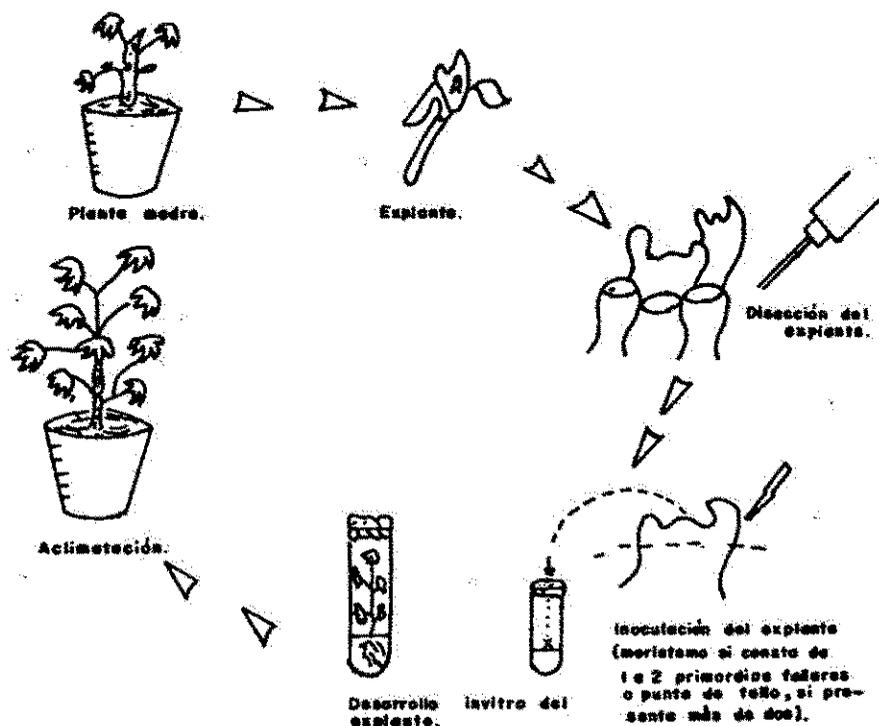
balanza analítica  
microscopio  
destilador  
estereoscopio

Al momento actual, a un cálculo aproximado del costo del equipo básico según los precios del mercado Internacional resulta una suma alrededor de \$20.000 dólares.

### 4.3 OPERACIONES DE SIEMBRA Y RECLUTIVOS

Los explantes se extraerán de las plantas madres previamente seleccionadas el mismo día de la siembra "in vitro" (fig. 18). El transporte de el material del campo al laboratorio se efectúa en bolsas de papel separando e identificando cada variedad o clon. El tamaño del explante tomado en el campo no es el definitivo, en el laboratorio se procede a la esterilización y se efectúan reducciones sucesivas hasta el tamaño adecuado para la siembra.

Figura 21. Extracción y desarrollo del explante.



Los microorganismos que contaminan el explante no son patogénicos bajo condiciones normales, sin embargo, durante el cultivo "in vitro" en un medio enriquecido su crecimiento es acelerado y limita el desarrollo de las células o brotes por lo que para eliminar la contaminación, se requiere de una serie de operaciones:

Un lavado prolongado en agua corriente a veces con unas pocas gotas de jabón, esto se realiza con el objetivo de retirar del explante las partículas de polvo y suelo. Se procede después a una primera reducción del explante con un corpiño dejando algunas capas que protejan el meristemo de la acción directa del agente esterilizante.

Dentro de los diversos productos químicos que se pueden utilizar, se aconseja usar aquellos que sean fácilmente removibles para no provocar daños al tejido. No es posible definir de una manera absoluta un tratamiento de validez general para cualquier explante. Dentro de los productos más utilizados tenemos: El Hipoclorito de Sodio, Hipoclorito de calcio (menos tóxico pero de rápida degradación), clorhidrato de mercurio, cloro comercial (concentración generalmente al 5%) y alcohol. La efectividad de los agentes esterilizantes puede ser mejorada por pequeñas cantidades de detergentes incorporado en la solución desinfectante para bajar la tensión superficial. Otro método es una rápida inmersión en alcohol absoluto y luego el tratamiento desinfectante.

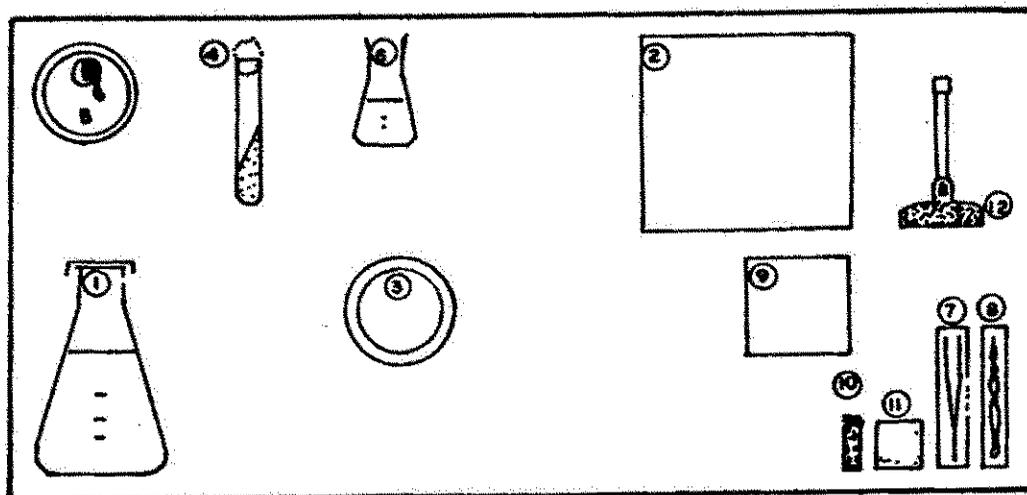
Las variables que influyen en la esterilización son la concentración y el tiempo de duración del tratamiento. (ver cuadro 6). Esto estarán en dependencia del explante, de su susceptibilidad al producto y a la presencia de barreras físicas.

Cuadro 6. Comparación de efectividad y propiedades de algunos agentes esterilizantes.

Agente Esterilizante	%	Facilidad de remoción	Tiempo
Hipoclorito de Ca	9-12%	+++	5-30
" " " Na	0.32%	+++	5-30
Cloro comercial	5-50%	+++	5-30
Hq Cl	0.1-1%	+	2-10

Una vez realizada la inmersión de los explantes en la solución esterilizante, se procederá a remover completamente el agente químico mediante el enjuague con agua destilada y esterilizada, por lo menos 3 veces. Esta operación se deberá realizar bajo el flujo laminar, para evitar la recontaminación del material. En la cámara de flujo laminar ya se encontrará el medio de cultivo esterilizado, todos los implementos, y una cantidad suficiente de agua destilada y esterilizada (Fig. 22).

Fig. 22. Items para la inoculación en la cámara de flujo laminar.



- |                                    |                             |
|------------------------------------|-----------------------------|
| 1. Agua bidestilada y esterilizada | 7. Escalpelos esterilizados |
| 2. Papel de aluminio esterilizado  | 8. algodón                  |
| 3. Cajas petri esterilizadas       | 9. Alcohol al 70 %          |
| 4. Medio nutritivo                 | 10. Explantes               |
| 5. Porta pinzas                    | 11. Mecheros                |
| 6. Alcohol 70 %                    | 12. Pinzas esterilizadas    |

Desde este momento se manejará el explante con los implementos estériles y para evitar que los explantes se deshidraten durante la siembra, es oportuno tenerlos en agua estéril. Cada explante deberá ser reducido al tamaño definitivo, y al momento de la siembra flamear el frasco, con una pinza estéril tomar el explante, inocularlo y flamear el frasco nuevamente antes de taparlo.

La siembra se hace en frascos individuales para evitar posible contaminación de uno a los demás explantes. Si la tapa del frasco no garantiza el aislamiento es necesario enrollar alrededor del cuello, papel parafinado o teflón. Los frascos conteniendo el explante se llevan al cuarto de crecimiento por

Un periodo de 15 a 40 días para que el explante se desarrolle y verificar que no haya contaminación. Esta fase corresponde al establecimiento “in vitro” del cultivo.

Luego se pasa a la fase de ahijamiento. La primera operación en esta fase es preparar el medio con el balance hormonal adecuado para estimular la emisión de las yemas axilares. Se preparará la cámara con todas las recomendaciones ya dadas para efectuar la transferencia. En la fase de ahijamiento se utilizan frascos de mayor volumen en los cuales se colocan de 15 a 20 explantes.

Se extraen los explantes: flameando antes el cuello del frasco, colocándolos sobre una superficie estéril, por ejemplo papel aluminio esterilizado o una caja petric esterilizada, cuando se ha extraído el número fijado por frascos se procede a la siembra, flámeando siempre el cuello del frasco antes y después de la siembra. La misma operación se efectuará para pasar a la fase de enraizamiento, al final de esta fase nos encontramos con una estructura constituida por varios tallos. Se procederá con los implementos a separar tallos singulares para que enraicen separadamente.

La fase de enraizamiento dura un periodo variable en dependencia de la especie, siendo generalmente de 1 a 2 meses, al término nos encontramos con plantas con todas las estructuras necesarias para sobrevivir a las intemperies y que sólo necesitan un cambio de condiciones que no sea traumático. En este punto se interrumpe la cadena de asepsia, se abre el frasco en ambiente no estéril se remueve todos los residuos de agar de las raíces y se lavan las plantitas en una solución fungicida muy diluida y se siembran en un sustrato adecuado y condiciones ambientales más o menos controladas dependiendo de la especie y considerando que el factor más importante es la humedad relativa la cual debe ser alta. Algunas especies necesitan permanecer en invernadero hasta 2 meses y otras pueden ser transferidas directamente al campo.

#### **4.4 PERSONAL**

Para la actividad de investigación se necesita personal lo más calificado posible. Para la actividad de producción comercial se requiere personal con buen adiestramiento técnico. Para actividades que requieren habilidad manual como operaciones de trasplante bajo la cámara, se aconseja realizar test preliminares para seleccionar el personal más apto. El porcentaje de contaminación además de los otros factores ya mencionados estarán determinados en buena medida por el operario.

#### 4.5 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

##### 4.5.1 Alternativa para la preparación de medio MS propuesto por Dodds y Roberts en 1982, modificada

###### Soluciones Madres

Micronutrientes (x 100)		cantidades/lit.
Mn SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	2230 mg
Zn SO <sub>4</sub>	7 H <sub>2</sub> O	860
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		620
KI		83
NaMoO <sub>4</sub>	2H <sub>2</sub> O	25
CuSO <sub>4</sub>	5 H <sub>2</sub> O	2.5
CoCl <sub>2</sub>	6 H <sub>2</sub> O	2.5
-----		

Hierro / EDTA (200x)		cantidad en 100ml de H <sub>2</sub> O
FeSO <sub>4</sub>	7H <sub>2</sub> O	557 mg.
Na <sub>2</sub> EDTA		745 mg.

Solución madre de Citocinina se sugiere X 1000.

###### Operaciones Directas

Para un litro de medio pesar directamente.

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg.
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

Disolverlos en 400ml. de agua bidestilada, aproximadamente.

Adicionar 10ml. de solución madre de microelementos.

Adicionar 5ml. de solución madre de hierro.

Disolver 100mg. de mioinositol y agregarlo.

Adición alícuota de la solución madre de citocinina.

Preparar las auxinas separadamente y adicionarlas al medio.

Lleve el volumen del medio a 800 ml. adicionando agua bidestilada.

Adiciones 30gr. de sacarosa y 0.7% de agar.

Solución madre de vitaminas. Para un volumen de 100 ml.

	Cantidad En 100 ml. de H <sub>2</sub> O
Glicina	200mg.
Acido Nicotínico	50 mg.
Piridoxina HCl	50 mg.
Tiamina HCl	10 mg.

Se adiciona en los niveles que sean requeridos.

Las vitaminas se esterilizan en frío porque presentan un cierto porcentaje de degradación.

↓  
Enrase el medio a un litro, con agua bidestilada. Caliente y agite el medio hasta que se disuelva el agar.

↓  
Espere que la temperatura lleve a 60°C. aproximadamente y ajuste el pH. a 5.7 . 5.8

↓  
llevar el medio al autoclave.

↓  
Cuando el medio alcanza una temperatura bajo 50°C. adicionar 1ml de vitamina.

↓  
Dispensar el medio en tubos de cultivo y almacenar en el refrigerador si es necesario.

El medio se prepara disolviendo en agua los componentes químicos ajustando el pH, adicionando agar y esterilizando. Para simplificar el trabajo se pueden preparar soluciones madres de los ingredientes a concentraciones más altas.

#### 4.5.2 Preparación del medio basal

##### Macro elemento

Cuando se requiere pequeñas cantidades de medio o se prepara con poca frecuencia, es probablemente mejor pesar y disolver los macronutrientes en cada preparación.

Casi siempre una solución madre facilita el trabajo, se prepara generalmente a una concentración 10 veces más alta que la concentración final en el medio nutritivo. Así de 1 litro de solución madre se sacaron 100ml. para preparar 1 litro de medio de cultivo.

Algunos investigadores sugieren preparar soluciones madres, separadas, de calcio y cloruro de cobalto, para evitar precipitaciones.

La solución madre se conserva en el refrigerador, se puede mantener hasta 4 a 5 meses, pero es recomendable conservarlas no más de un mes.

## **Micronutrientes**

Exceptuando el hierro; la mayoría de los autores sugieren la preparación de soluciones madres de micronutrientes. Usualmente la concentración es 100 veces más alta que en el medio; algunos autores reportan hasta concentraciones de 1000.

Aunque no sea estricto, es aconsejable guardar las soluciones madres en el congelador. La conservación puede durar hasta 4 a 5 meses.

## **Hierro**

Soluciones de Fe/EDTA, se prepara generalmente a concentraciones 200 veces más alta. Así para preparar un litro de medio se toman 5 ml. de 100 ml. de solución madre.

La solución madre de hierro es muy susceptible a precipitaciones, por lo que se aconseja conservarla en la oscuridad y refrigerada, soporta un período de conservación hasta de 4 meses.

## **Vitaminas**

Las vitaminas se preparan en una concentración de 100 a 1000 veces más altas y se conservan en el congelador, por un tiempo de uno a dos meses.

### **4.5.3 Preparación de los reguladores de crecimiento**

#### **Citocininas**

Son estables en soluciones. Para la preparación de la solución madre se disuelve la citocinina en pocas gotas de HCl de 0.1 a 1.0 normal (generalmente 0.5 normal); se calienta ligeramente, si fuera necesario, y enrasar al volumen deseado una vez se haya diluido bien la citocinina en el HCl.

Las soluciones madres pueden tener una concentración 100 a 1000 veces mayor y se conservan en el refrigerador. Schmits y Skoog encontraron que la citocinina se disuelve también en pequeñas cantidades de dimetil sulfoxido (DMSO).

## Auxinas

Todas las auxinas se pueden disolver en 1 a 2 ml de hidróxido de potasio (KOH) a 0.5 normal. el AIA, se puede disolver en un pequeño volumen de etanol absoluto y calentado ligeramente.

## Acido giberélico

El ácido giberélico se disuelve en hidróxido de potasio a 0.5 normal, al igual que las auxinas.

Es posible conservar en el congelador (0 C) el medio nutritivo. por ejemplo: Gamborg y Shiluk (1981) encontraron que el medio MS. concentraciones completas de macro y micro elementos y hierro, se pueden mantener en el congelador por varias semanas.

## CONCLUSIONES

Este trabajo enfoca de forma general la técnica del cultivo de tejidos vegetales. Siendo interés nuestro poder transmitir al lector argumentos que le permitan visualizar de una manera concreta las perspectivas de aplicación. A la vez develar el mito creado alrededor de ésta. Lo cual conlleva muchas veces a pensar que es una tecnología que no está al alcance de los países subdesarrollados o a creer que a través de ella se pueden resolver todos los problemas que aquejan a la agricultura Sin embargo, como habrá podido captar el lector, esta técnica presenta ventajas y limitaciones. Por lo cual, se deben de tomar las determinaciones necesarias para su aplicación.

Para nosotros las posibles aplicaciones que pueden tener a lo inmediato en nuestras condiciones serian las siguientes: micropropagación in vitro, tomando en cuenta los aspectoseconómicos, es posible aplicarlo sobre todo a cultivos de reproducción asexual debido a los altos riesgos a que se expone la agricultura cuando se homogenizan las especies (erosión genética), entre éstos destacamos el plátano, banano y plantas ornamentales; Conservación de germoplasma, sobre todo para materiales que producen semillas recalcitrantes, las cuales no pueden ser conservadas por periodos largos, o para materiales de reproducción agámica, por ejemplo: yuca, quequisque, papa y plátano y para el saneamiento de virosis, como el caso de la papa, la cual una vez saneada se propaga vegetativamente bajo condiciones controladas para la obtención de semilla libre de virus.

Aplicaciones a otros niveles productivos e investigativos podrían ser la utilización como vía para introducir materiales, aminorando o eliminando los riesgos de introducir plagas y enfermedades y en el mejoramiento genético de los cultivos: tratando de aprovechar la variación somaclonal, la obtención de variantes genéticas o mutantes a través de la presión de condiciones adversas sobre cultivo de suspensiones celulares y la posibilidad que brinda la hidridación somática. Y quizás lo más importante es el tener presente que el cultivo de tejidos es la piedra angular de la Biotecnología e ingeniería Genética.

## BIBLIOGRAFIA

- Acosta, A. 1973. Introducción a la Física. ed 18. Colombia, C.C. pp 52:76.
- Abbot, A.J. 1977. Propagating temperate woody species in tissue culture. Sci. Hortic. pp 28:55.
- Alconero R., et al. 1975. Meristem culture and indexing of Sweet potatoes. Puerto Rico, Mayaguez Institute of Tropical Agriculture. 20 p.
- Beauliev. R., et al. 1973. Reguladores de Crecimiento. Castells, R., traductor. España, I. G. G. 235 p.
- Bellini, E. 1979. Techichedical Eure "in vitro" per la propogazione su vasta scala delle specie ortoflora fruticole. Italia, Pistoia. pp 7-49.
- Brown, A.C. 1954. The Physiology plant tumors. Annu. Rev. plant Physiology. 5.133-62.
- Brown, D.C.W and Thorpe, T.A. 1890. Changes in water potencion at its components during shoot formation in tobacco callus. Physiology. 49: 83-87.
- Chaleff, R.S. 1980. Further characterization of picloram tolerants mutans of Nicotiana tabacum. Theor. Appl. Genet. 58:91-95.
- Coek, J. H., Toro, J.C., y Roca, W. Multiplicación acelerada de material genético promisorio de yuca. Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Damasco, d.P; y Barba. 1983. In vitro culture of "Saba" banana (Musa balbisiána c.v.). Biotecnology in International Agriculture Research. University of Phillipines . pp 41-44.
- DE FOSSARD, R. A. 1976. Tissue culture for plant propagators. Univ. of New England, Armidale, N.S.W., Australia.
- Dembergh, P.C; and Maene, L.J. 1981. A Scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Science Horticulture. 14-335-345.

13. Department of tropical crop Science Agricultural University International Agricultural Centre. 1984. Introductory course on in vitro culture. Wageningen, The Netherlands. 84 p.
14. Dods, J.H. and Roberts, L.N. 1984. Plant Tissue Culture. New York, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. 178 p.
15. Espinoza, N., et al. 1985 Cultivo de Tejidos Micropropagación Conservación y Exportación de germoplasma de papa. Perú, Centro Internacional de la papa (CIP). 16 p.
16. Evans, D. A., Sharp, W.R. y Yamada, Y. 1983 Hand Book of plant cell culture, Technique, for propagation and Breedin. New York Maemillan Publishing. P 1-228, 291-322, 782-806. V. 1.
17. Food and Agricultural Organization of the United State. 1984. Micropropagation of selected root crops palms. Citrus and ornamenta species. Roma, Food and Agricultural Organization. pp. 11-25, 25-50.
18. French, E. R. and Herbert, T.T. 1982. Metodos de investigación fitopatológica. Costa Rica, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) pp. 21-46 y 212-235.
19. Gamborg and Shiluk. 1981. Nutritión, media and caracterisacias of plant cell and tissue culture in plants tissue culture methods and aplication in agricultre. T.A. Thorpe, ed. Academic pres, New York. pp 21-44.
20. Hartmann, T. H. y Kester, D. E. 1975. Propagación de plantas, principios y prácticas. Ambrosio, A. M., Traduc. ed. 3. Mexico, C. E. S. A. p. 640-666.
21. Ingram, D.S. 1976. In physiological plantv pathology (R. Heitefuss, and P. H. Williams, eds), p.743 Springer Verlag, Berlin.
22. Kolemback, H.W; and Schmidt, B. 1975. Cytodifferentiation in mode of a direct tranformation of isolated mesophyll to tracheids. Z. Pflazenphy . 30, 583-91.
23. Larkin, P.J; and Scowcroft, W.R. 1981. Theor. App. Genet. 60-167.
24. Leopold, A. C. and Kriedeman N, P. E. 1975. Plant Grow and Development. U.S.A. Mc Graw - Hill Book. p. 109-194.

25. Lizarraga, R., et al. 1986. Tissue culture for elimination of pathogens. Peru, INTERNATIONAL POTATU CENTER. p 21.
26. Lugo, M. A. and Liu, L. J. 1985. Proceedings of Round Table on storage and conservation of Root and tuber crops. Puerto Rico, Food and Agricultural organization (FAO). p. 75-84.
27. Margara, J. 1984. Bases de la multiplicacion vegetative. Paris Cedex 07. 254 p.
28. Melgenson, J., y Deverall, B. J. 1988. Use of tissue culture and protoplasts in plant pathology. Australia, Academic pres. p. 180.
29. Mellov, F. C. and Smith, R. S. virus Free Potatoes by Tissue culture.
30. Montaldo, a. 1984. Cultivo y Mejoramiento de la papa. Costa Rica, Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura (IICA). p. 348-351.
31. Morel, G. 1960. Producing virus-free Cymbidium. American Orchid society. 29, 495-7.
32. Morel, G. 1975. Meristem techniques for long-term storage of cultivated plants. In crop genetic resources for today and tomorrow, ed. O. H. Frankel and J.G. Hawkes, pp.327-32 Cambridge University Press.
33. Mosella, L. C., y Ascui, L. 1984. Obtención de plantas frutales libres de virus a partir de apices meristemáticos cultivados "in vitro". Chile. Universidad Católica de Valparaiso. 22 p.
34. Morel, G. 1975. Meristem techniques for long term Storage of cultivated plants. In crops genetic resources for today and tomorrow, ed.O.H. Frankel and J.H. Hawkes, Cambridge University pres. pp 32:327.
35. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised medium for rapid growth and Bio Assays with tobacco tissue culture. PHYSIOLOGIA PLANTARUM (Estados Unidos). 15: 473-496.
36. Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue culture. Reinert, J. and Y.P.S. Bajas (eds). Plant cell tissue and organ culture. Spriger Verlag, Berlin. 179-206.

37. Nighoff, M., and Junk, W. 1985. In vitro technique propagation and long term storage. CEC programe of coordination of research on plant productivity, Federal Republic of Germany. p 194.
38. Pérez et al. 1988. Micropropagación de la caña de azúcar. UCLV, Las Villas, Cuba.
39. Raghavan, V. 1976. Experimental. V. 1976. Experimental embryogenesis in vascular plant New York: Academic Press.
40. Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S (eds.) 1977. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlin.
41. Roca, W. M. 1980. El cultivo de meristemas de yuca. Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 40 p.
42. Roca, W.M. 1982. Intercambio Internacional de clones de yuca in vitro. Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
43. Roca, W. M. y Jayasingue, U. 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). pp 45.
44. Romberg, J. A. and Varnell, R. J. Sf. Culture of apical meristems and embryonic shoot of picea abies approach and tech nique. U. S. departament of Agriculture 30 p.
45. Salazar, S. L. SF. Cultivo de meristemo en cormos Raíces y tubérculos tropicales. Costa Rica, Centro de Agricultura Tropical para la investigación y enseñanza (CATIE) 17 p.
46. Salazar, S. Fernández, R. and Jarret, R. L. 1985. Virus Free Plants obtained by termothe raphy and meristem culture of (Xanthosoma sagittifolium (L) Schott) and purple (X. violaceum schott) Cocoyams. Costa Rica, Turrialba, Tropical Agricultural Research and training Center (CATIE). pp 22.
47. Sauvaire, D y R Galazy. 1987. Micropropagación de la cnne a suere par bouturage in vitro. Action d une citokinine. Agronomia tropical 36 (1).

48. Scowcrof, W. R. 1984. Genetic Variability in Tissue Culture: Impact on Germoplasma Conservation and utilization. Roma, International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). pp 29.
49. Sharma, A.K; et al. 1980. Chromosome technique theory and practice tercera ed, Butterworths, London Boston.
50. Skoog, F; and Miller, C.D. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues culture in vitro. Symp. soc. Exp. Biol. 11, 118-30.
51. Shabde, M.N; and Murashige, T. 1977. Hormonal requirements excised *Dianthus cariyophyllus* L. Shoot apical meristem in vitro. A. J. Bot. 64, 443-8.
52. Smith, P.H, and Murashige T. 1970. In vitro development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. Am, J. Bot. 57, 562-8.
53. Street, H. E. 1969. Growth in organized and unorganized systems. In plant physiology. Newyork E.n Wilme Academicpress. pp 533-630. V.3.
54. Sunderland, H.E. 1969. Laboratory organization. In plant tissue and cell culture, 2nd ed. H.E. Street. Oxford Blackwell Scientific publications.
55. Sunderland, N. 1977. Nuclear cytology in plant tissue culture and cell culture, 2da ed. ed.H.E. Street. Oxford: Blackwell scientific publication, pp 11-3.
56. Vasquez, E. y Torrez, S. G. 1981. Fisiología Vegetal. Cuba, Pueblo y Educación. pp. 317-380.
57. Villalobos, V.M. 1985. Fundamentos teoricos del cultivo de tejidos vegetales. Roma Organizació para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 380 p.
58. Wetter, T. R. and constabel, F. 1982 Plant tissue culture methods. canada, National Research Council. pp. 1-67 y 133-142.
59. Withers, L. A. 1985. Minimum requeriment Forreceiving and main taining tissue culture propagating material. Food Agricultural organization (FAO). p. 34.

60. Weaver, R.J. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Mexico. Editorial Trillas, S.A. 622 p.
61. Yeoma, M.M.; and Macleod, A.J. 1977. tissue (callus) culture techniques in plant tissue and cell culture, 2 ed; Street H.E. Oxford Blackwell Scientific publication. pp 31-59.

## GLOSARIO

ABERRACION CROMOSOMICA  
Chromosome alteration

Alteraciones en la longitud de cromosomas, secuencia de genes, o composición en consecuencia del quebrantamiento del cromosoma.

ABORTO  
Abortion

Estancamiento en el desarrollo de un órgano después de su diferenciación inicial, resultando incompleto.

ABSCISION  
Abscission

Separación de un órgano o su parte mediante un estrato de tejido especial, normalmente suberoso.

ACIDO ABSCISICO  
Abscisic acid

Acido 5-(hidroxi-2-6-6-trimetil-1-4-oxo-2-ciclohexinil) -3-metil -2,4- pentadienoico. Regulador de crecimiento natural, inhibidor; relacionado con el envejecimiento y abscisión de órganos o sus partes.

ACIDO ASCORBICO  
Ascorbic acid

Sustancia usadas en la preparación de explantes y en medios para reducir o evitar las oxidaciones, especialmente de fenoles; antioxidante.

ACIDO CITRICO  
Citric acid

Acido tricarbóxico, común en plantas, especialmente en frutas; es usado como antioxidante en la preparación de explantes y medios.

ACIDO 2-4 DICLOROFENOXI-  
ACETICO  
2-4 Dichlorophenoxyacetic  
acid

Herbicida sintético, con sensibilidad mayor en dicotiledóneas (plantas de "hojas anchas"). Regulador de crecimiento, tipo auxina, a veces utilizado en la preparación de medios, con mayor actividad que el AIA; estimula división celular y formación de callo. (con cierta tendencia a causar aberraciones genéticas).

ACIDO ETILENDIAMINOTETRA-  
ACETICO  
Ethylenediaminetetraacetic

Agente quelador; es usado ampliamente en la preparación de medios para mantener iones de metales, como el hierro, en estado disponible para la planta, independiente del pH.

ACIDO GIBERELICO  
Gibberellic acid

Véase Giberelina.

ACIDO INDOLACETICO  
Indoleacetic acid

Regulador de crecimiento natural tipo auxina, de amplia distribución en plantas superiores; regula principalmente la división y alargamiento celular.

ACIDO INDOLBUTIRICO  
Indolebutyric acid

Regulador de crecimiento sintético tipo auxina

ACIDO NAFTALENACETICO  
Naphthaleneacetic acid

Regulador de crecimiento sintético, tipo auxina

ACIDO SUCCINICO 2-2 DIMETIL-  
HIDRAZIDA  
Succinic acid 2-2 dimethyl-  
hidrazide

Regulador de crecimiento sintético; retardador de las actividades meristemáticas; anti-giberelina.

ACLIMATACION  
Acclimatation

Exposición a un cambio gradual de las condiciones ambientales; transferencias de las plántulas de un ambiente aséptico cerrado o un invernadero o campo.

ADITIVO COMPLEJO  
Complex additive

Compuesto químicamente no definido que se adicionan a los medios de cultivo (agua de coco, extracto de maíta y levadura, hidrolisado de caseína, etc).

ADITIVO NO PERMEANTE  
Non permeating additive

Substancias adicionadas al medio que no penetran, por lo menos en cantidades apreciables, a través de las membranas citoplasmáticas; usado en la crioconservación y para efectos osmóticos, ejemplo: manitol.

ADITIVO ORGANICO  
Organic additive

Substancias orgánicas, generalmente complejas, que son adicionadas a un medio nutritivo. Véase aditivo complejo.

ADITIVO PERMEANTE  
Permeating additive

Substancias adicionadas al medio, que debido a su estructura química muestran un alto poder de penetración en las células a través de la membrana citoplasmática; usados especialmente en el pretratamiento para criopreservación; ejemplo DMSO.

ADSORBENTE  
Adsorbent

Substancia que retiene en su superficie, mediante ciertas fuerzas (p.e. electroestáticas) diferentes partículas, a veces selectivamente.

ADVENTICIO  
Adventitious

Estructura que se origina en un sitio no usual para ella; especialmente en un tejido adulto.

AGAR  
Agar

Substancia empleada para gelificación de un líquido; muy usado en la preparación de medios de cultivo; se obtiene en base de ciertas algas marinas (rodofíceas). La concentración usualmente empleada varia entre 0.5 y 1%.

AGAR AGAR  
Agar agar

Véase agar.

AGENTE GELIFICADOR  
Gelling agent

Substancia coloidal hidrófila cuya presencia en el medio causa que éste quede semisólido.

AGENTE HUMEDecedor  
Wetting agent

Véase detergente.

AGENTE INDUCTOR DE FUSION  
Fusion inducing agent

Substancia cuya presencia causa mayor número de fusiones somáticas, acelerando el proceso; trabaja normalmente debido al aumento de la viscosidad del medio.

AGITADOR DE PLATAFORMA  
Platform shaker

Véase agitador orbital.

AGITADOR MAGNETICO  
Magnetic stirrer

Aparato que mediante un imán rotatorio debajo de una plataforma mueve otro protegido por una envoltura plástica inerte, que se encuentra en el frasco colocado sobre la plataforma, causado por agitación (hidromecánica) del medio.

AGITADOR ORBITAL  
Orbital shaker

Aparato de movimiento orbital (generalmente de 2 a 5cm. de desplazamiento lateral) y velocidad fija o regulable (normalmente 30-300 rpm). puede tener en la plataforma una superficie alta fricción (hule) o prensas para sostener los frascos de cultivo.

AGITADOR RECIPROCO  
Reciprocal shaker

Agitador que se mueve mediante deslizamiento en un solo plano direccional

AGREGADO  
Agreggate

Conjunto o conglomerado de individuos, células, etc. disociadas, sin relaciones mutuas fuertes entre si pueden separarse facilmente sin afectar la vida de cada individuo.

AGUA BIDEISTILADA  
Double distilled water

Aqua altamente purificada, destilada dos veces

AGUA DE COCO  
Coconut water

Parte liquida central, hialina, del endosperma del fruto del cocotero.

AGUA DEIONIZADA  
Deionized water

Aqua cuyo contenido de sales y iones ha sido eliminado o reducido al paso por una resina de intercambio iónico.

AMORFO  
Amorphous

Que no tiene una forma definida.

APARATO DE DISPENSAR  
Dispensing apparatus

Aparato que permite dispensar automáticamente el medio de cultivo en cantidades iguales y determinadas en los frascos de cultivo.

AXENICO  
Axenic

Desprovisto de comensales, simbioses, o parásitos; no contaminado.

BACTO AGAR  
Bacto agar

Nombre comercial de un agar purificado.

BANCOS DE GENES  
Gene bank

véase Banco de germoplasma.

BANCO DE GERMOPLASMA  
Germplasm bank

Colección de material vivo de diferentes procedencias y variantes, de la misma especie, para fines genéticos; un banco de germoplasma puede abarcar colecciones de muchas especies.

BIOLOGIA MOLECULAR  
Molecular biology

Parte de la biología que se dedica a la ultraestructura, a nivel molecular y de los componentes de la célula.

BIOTECNOLOGIA  
Biotechnology

Medios y procedimientos para la fabricación de productos químicos mediante el empleo de organismos vivos; metodología de la producción de sustancias secundarias.

CARBÓN ACTIVADO  
Activated Charcoal

Carbón vegetal que se utiliza para descolorear soluciones; en medios para la absorción de sustancias potencialmente dañinas, como fenoles y polifenoles oxidadas.

CIBRIDO  
Cybrid

Híbrido celular viable, originado por fusión del citoplasma de una célula con otra célula distinta.

CLONAR  
Clone

Procedimiento de obtención de copias genéticamente idénticas de células u organismos mediante propagación asexual.

CRIOPRESERVACION  
Cryopreservation

Almacenamiento de tejido a muy bajas temperatura para su preservación por largo tiempo; la temperatura normalmente debe ser inferior a  $-130^{\circ}\text{C}$  para evitar la formación de cristales de hielo.

CRIOPROTECTOR  
Cryoprotectant

Sustancia que aminora o elimina los efectos negativos de muy bajas temperaturas sobre un organismo o sus partes, aumentando los chances de sobrevivencia; existen dos tipos: permeantes, que penetran al interior de la célula y extracelulares.

CULTIVO CON AGITACION  
Stirred culture

Cultivo que es agitado mediante un dispositivo mecánico, p.e. agitación magnética, para facilitar el intercambio gaseoso.

CULTIVO CONTINUO  
Continuous culture

Cultivo el cual es suplido continuamente con los factores nutritivos necesarios mediante la entrada de medio fresco y salida de medio gastado; normalmente el volumen del cultivo se mantiene constante.

CULTIVO INICIAL  
Starter culture

Conjunto de células utilizadas para iniciar un cultivo aséptico.

CULTIVO NODRIZO  
Nurse culture

Cultivo de una, varias células o tejidos, que se desarrollan sobre otro tejido mayor que le proporcionan ciertas sustancias necesarias para su crecimiento; normalmente separados por un material poroso, p.e. papel filtro.

DETERGENTE  
Detergent

Substancia que reduce considerablemente la tensión superficial del agua al ser agregada en cantidades pequeñas; ayuda en mojar mejor superficies ásperas y grasosas.

DOMO  
Dome

Parte apical del tallo; consiste de la parte superior del meristemo, encima del primer primordio foliar; generalmente tiene forma semirredonda.

ECTOGENESIS  
Ectogenesis

Desarrollo embrional fuera del organismo maternal, desarrollo en ambiente artificial.

ELECTROFORESIS  
Electrophoresis

Separación de sustancias (principalmente orgánicas) basada en la migración diferencial, sobre una matriz apropiada (p.e. del almidón o poliacrilamida), en un campo eléctrico de corriente directa.

EMBRIOGENICO  
Embriogenic

Capacidad de una célula, tejido, etc. de producir embriones.

EROSION GENETICA  
Genetic erosion

Pérdida de germoplasma de una especie.

ESTABILIDAD GENETICA  
Genetic stability

Inalteración del genoma durante la propagación de una planta, siendo todos los descendientes genéticamente homogéneos e iguales.

ESTAGNACION  
Staling

Fase final de un cultivo de células, tejido, callo, etc; cuando por agotación de nutrientes, acumulación de metabolitos no hay más multiplicación.

ETIOLOGIA Etiology	Estudio de las causas predisponentes y determinantes de las enfermedades en las plantas.
EXCISION Excision	Proceso de cortar un explante de una planta o de sus órganos.
EXPLANTE explant	Fragmento o tejido excisado de material parental (tejido u órgano) para iniciar un cultivo "in vitro".
FASE ESTACIONARIA Stationary phase	Fase terminal de un ciclo de crecimiento cuando ya no es aparente la síntesis de biomasa o aumento del número de células.
FENOL Phenol	Grupo de sustancias aromáticas, derivadas del benceno, muy frecuentes en el reino vegetal en forma de éteres, glicósidos; algunos son de olor agradable (esencias); al oxidarse forman frecuentemente compuestos oscuros con propiedades antisépticas que pueden impedir el desarrollo del propio explante.
FLUORESCENTE Fluorescent	Que fluoresce al ser excitado por una radiación electromagnética de onda más corta que la de la luz emitida; dicese de los tubos de vidrio en los cuales se excita una camada de una sustancia fluorescente (compuesto fosforado) que luego sirve de emisor de luz.
FOTOMORFOGENICO Photomorphogenic	Proceso morfodénico, cuyo inicio se debe a un estímulo por irradiación luminica.

FRIABLE  
Friable

Que se desintegra o desmenuza fácilmente; usado para clasificar un tipo de callo con tendencia a la separación de sus células.

GAMETOCLONAL  
Gametoclonal

Reproducción asexual, clonal, de plántulas a partir de granos de polen, que muestran cierta variación entre sí.

GENOMA  
Genome

Conjunto de los factores responsables para la herencia; en eucariontes el número básico haploide de cromosomas de un organismo (juego completo), específico para la especie etc.

GERMOPLASMA  
Germplasm

Plasma de células germinales plantas de una especie, de diferentes procedencias, con ciertas diferencias genéticas.

GIBERELINA  
Gibberellin

Grupo de sustancias con anillo de gibano (conocidas más de 50; se identifican por el sufijo numérico, GA, GA, GA, etc.) representan reguladores de crecimiento, actuando sobre la elongación celular, dormancia, floración de las plantas bienales, expresión del sexo de las flores en ciertas especies.

GROLUX  
Grolux

Nombre comercial de un tubo fluorescente, cuyo espectro de emisión tiene el máximo en rojo, seguido por el azul, o sea que coincide, grandemente con el espectro de absorción de la fotosíntesis.

HABITUACION  
Habituation

Capacidad de un cultivo de adaptarse a cambios o modificaciones.

HIBRIDO POR INJERTO  
Graft hybrid

Quimera producida por fusión de dos tejidos genéticamente diferentes, debido al injerto.

HIDROLIZADO DE CASEINA  
Casein hydrolysaate

Substancia químicamente no definida y compleja, obtenida por hidrólisis enzimática o ácida de la caseína.

INCANDESCENTE  
Incandescent

Refiérese a la luz emitida por un alambre fino de tungsteno, calentado por una corriente eléctrica: el espectro de emisión tiene su valor máximo en la parte roja e infrarroja.

INDEXAR  
Indexing

Proceso de inocular una planta indicadora (que fácilmente muestra los síntomas de la infección) con material en el cual se sospecha la presencia de determinados virus, si el resultado es negativo se supone que el virus ha sido eliminado.

INGENIRIA GENETICA  
enetic engineering

Manipulación del genoma sin el ciclo sexual, mediante transferencia (y expresión) de partes de DNA de un organismo a otro; a nivel celular hibridación de células somáticas diferentes; considerando todos los aspectos de la biología celular y molecular, como también procedimientos de transferencias de genes, alteraciones genéticas efectuadas mediante procedimiento no usuales, como recorte de genes en plasmidios, introducción de cromosomas o genes mediante uso de procedimientos bioquímicos para la finalidad de alterar el genotipo en dirección deseada.

INTERVALO DE SUBCULTIVO  
Subculture interval

Intervalo de tiempo entre subcultivos sucesivos: sinónimo con tiempo de pasaje.

IN VITRO  
In vitro

En un ambiente artificial estéril: típicamente un recipiente de vidrio con medio de cultivo.

JIFFI POT  
Jiffi pot

Pequeña maceta de material orgánico, aplanada, que en contacto con agua forma un recipiente para la siembra de una plántula, se degrada fácilmente en el suelo.

KAP-UT  
Kap-ut

Nombre comercial de una tapadera en forma de cápsula, hecha de plástico de diferentes colores (para codificación).

MANIPULACION DE MEDIOS  
Media manipulation

Cambios en la composición de medios, debido a la adición de otras sustancias.

MASA PROEMBRIONAL  
Proembryonic mass

Callo en el cual se ha iniciado por diferenciación un número grande de estructuras anatómicas, que podran trasformarse en embrioides.

MECHERO TOUCH-O-MATIC  
Touch-o-matic burner

Mechero de gas que tiene una válvula actuada a mano que enciende de la llama piloto una llama más grande.

MEDIO BASAL  
Medium basal

Medio que contiene apenas los ingredientes básicos como elementos esenciales, fuente de energía y carbono y algunas vitaminas, pero carente de reguladores de crecimiento.

MEDIO DE CRECIMIENTO  
Growth medium

medio que tiene todo los ingredientes para asegurar el crecimiento y desarrollo rápido de los explantes.

MERICLON  
Mericlone

Expresión empleada para plantas de propagación clonal a partir de un meristema.

NEOFORMACION  
Neofomation

Formación de una plántula o parte a partir de un tejido menos diferenciado.

NUMERO DE PASAJES  
Passage number

Número de sub-cultivos.

ORGANOIDE  
Organoid

Neofomación que todavía no se ha diferenciado lo suficiente para presentar un órgano completo.

PLANTA MADRE  
Mother plant

Planta de la cual se toma el explante

POLIPROPILENO  
Polypropylene

Material plástico resistente a temperaturas hasta 135 C.

PROPAGULO  
Peopagule

Todo tipo de estructura o cuerpo, que sirve para la propagación vegetativa.

QUIESCENTE  
Quiescent

En estado de reposo temporal, específicamente debido a factores ambientales.

RAZICAL  
Root

Rudimento de la raíz en el embrión; representa la continuación del hipocotilo.

RADICULA Radicle	Perteneiente a la radícula: no debe emplearse referente a la raíz.
RECURSO GENETICO Genetic resources	Todo material vivo originado en los reinos vegetal o animal, que tenga uso actual o potencial en la agricultura independientemente del nivel tecnológico que incluya.
REGENERACION Regeneration	Proceso que consiste en la formación de un órgano o planta entera a partir de un tejido, callo, célula, etc.
RENOVACION DE CULTIVO Reculture	Transferencia de un cultivo entero intacto, de un medio a otro, sin subdividirlo.
SINCARIONTE Synkarion	Célula que se originó por fusión de dos protoplastos genéticamente idénticos después de la fusión de los núcleos.
SOMACLON Somaclone	Planta regenerada entre una población derivada de un tejido o cultivo de células, con ciertas características distintas a la forma primitiva.
SUBCULTIVO Subculture	División con transferencia de una parte del cultivo (inóculo a un medio nuevo, generalmente en otro recipiente.
TEFLON Teflon	Etilenpropileno fluorinado. Material plástico resistente a temperaturas hasta 205 C.
TERMOPERIODO Termoperiod	Duración de un periodo de tiempo de una temperatura en relación a otro, durante un periodo de 24 horas.

VARIACION GENETICA  
Genetic variability

Ocurrencia de diversidad entre individuos de un progenitor; cambios genéticos durante el proceso de cultivo de tejidos.

VARIACION SOMACLONAL  
Somaclonal variation

Variaciones entre plantas regeneradas de células (o tejidos) en condiciones asépticas.

VIDRIO COMUN  
Soda glass

Vidrio hecho a base de arena silicatada, cal y carbonato de sodio (o potasio); no resistente a cambios abruptos de temperatura; cede iones (principalmente Na y K) al agua contenida en él.