

Libros de **Cátedra**

Plantas de probeta

Manual para la propagación de plantas
por cultivo de tejidos in vitro

Sandra Sharry
Marina Adema
Walter Abedini
(coordinadores)

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES

n
naturales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

PLANTAS DE PROBETA

Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro

*Sandra Sharry
Marina Adema
Walter Abedini
(coordinadores)*



2015

Este Manual es el resultado de más de 25 años de brindar capacitaciones a diferentes actores sociales en el manejo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales in vitro.

Tiene por objetivo facilitar la comprensión de conceptos y técnicas en cultivos de tejidos vegetales así como valorar los aportes, aplicaciones y potencialidades de estas herramientas a la hora de formular investigaciones e iniciativas en el área de la biotecnología vegetal.

Nos hemos reunido muchos de los docentes e investigadores que participamos en los cursos, con el objeto de compartir saberes y destrezas adquiridas a lo largo de nuestra actividad profesional.

Esperamos que estos conocimientos sean de utilidad para los lectores.

Los autores.

ÍNDICE

Introducción. <i>Autor: Cedres Gazó Marianelén y Sharry Sandra</i> _____	6
Capítulo 1. Un poco de historia... <i>Autor: Sharry, Sandra y Abedini, Walter</i> _____	13
Capítulo 2. Desde un área estéril a las biofábricas de producción masiva Diseño y organización del laboratorio de cultivo <i>in vitro</i> de plantas. <i>Autor: Iannicelli, Jesica y Escandón, Alejandro Salvio.</i> _____	22
Capítulo 3. ¿Cómo se nutren las plantas de probeta? Medios de Cultivo- Reguladores de crecimiento. <i>Autor: Boeri, Patricia.</i> _____	46
Capítulo 4. La incubadora Condiciones ambientales de cultivo-Asepsia. <i>Autor: Pariani, Sebastian.</i> _____	73
Capítulo 5. ¿Por dónde empezamos? Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> - Plantas madre. Explantes. <i>Autor: Adema, Marina.</i> _____	81
Capítulo 6. ¿Cómo se forman los nuevos órganos <i>in vitro</i>? Morfogénesis <i>in vitro</i> . Organogénesis. Embriogénesis somática. <i>Autor: Villarreal, Blanca.</i> _____	92
Capítulo 7. No siempre sale todo bien... Problemas de Cultivo de Tejidos Vegetales. <i>Autor: Nikoloff, Noelia.</i> _____	102
Capítulo 8. Micropropagación: la técnica de “fotocopiado” de plantas Micropropagación-Etapas. Establecimiento de plantas a condiciones de campo. <i>Autor: Briones, Valentina.</i> _____	112
Capítulo 9. Una opción para cada necesidad Tipos de Cultivos de tejidos <i>in vitro</i> . <i>Autor: Basiglio, Maria de los Angeles.</i> _____	121
Capítulo 10. Las plantas como bio-fábricas. Plantas medicinales. Metabolitos secundarios. <i>Autor: Rivas, Cecilia.</i> _____	145

Capítulo 11. Mejoramiento de plantas por cultivo de tejidos. Transformación genética de plantas.	
<i>Autor: Bisio Clara</i> _____	159
Capítulo 12. Mejor sanitas...	
Mejoramiento genético por cultivo de tejidos. Plantas libres de virus. <i>Autor: Bisio, Clara y Basiglio Cordal M.de los Angeles</i> _____	171
Capítulo 13. ¿Bancos para guardar plantas?	
Conservación de germoplasma. <i>Autor: Gugole, Fernanda</i> _____	178
Capítulo 14. Algunas recetas de “cocina”...	
Protocolos específicos de cultivos de tejidos <i>in vitro</i> (ornamentales, hortícolas, forestales, aromáticas, medicinales, frutales, cereales). <i>Compilación: Pariani Sebastián y Adema Marina</i> _____	194
Los Autores _____	234

INTRODUCCIÓN

Marianelén Cedres Gazó y Sandra Sharry

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) define la biotecnología como «toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos» (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 1992). Esta definición incluye las aplicaciones médicas e industriales, así como muchos de los instrumentos y técnicas habituales en la agricultura y la producción de alimentos.

En general, se entiende por *biotecnología* toda técnica que utiliza organismos vivos o sustancias obtenidas de esos organismos para crear o modificar un producto con fines prácticos. La biotecnología puede aplicarse a todo tipo de organismos, desde los virus y las bacterias, a los animales y las plantas, y se está convirtiendo en un elemento importante de la medicina, la agricultura y la industria modernas.

Algunas aplicaciones de la biotecnología, como la fermentación y el malteado, se han utilizado durante milenios. Otras son más recientes, pero están igualmente consolidadas. Por ejemplo, durante decenios se han utilizado microorganismos como fábricas vivas para la producción de antibióticos destinados a salvar vidas humanas, entre ellos la penicilina, obtenida a partir del hongo *Penicillium*, y la estreptomycinina, obtenida a partir de la bacteria *Streptomyces*. Los detergentes modernos se basan en enzimas producidas por

medios biotecnológicos, la producción de queso de pasta dura se basa en gran medida en cuajo producido mediante levaduras biotecnológicas y la insulina humana para los diabéticos se produce actualmente gracias a la biotecnología.

La biotecnología se utiliza para resolver problemas en todos los aspectos de la producción y elaboración agrícolas, incluido el fitomejoramiento, para elevar y estabilizar el rendimiento, mejorar la resistencia a plagas, animales y condiciones abióticas adversas como la sequía y el frío, y aumentar el contenido nutricional de los alimentos. Se utiliza también, con el fin de crear material de propagación/plantación de bajo costo y libre de enfermedades para cultivos como la mandioca, la frutilla y las papas y está proporcionando nuevos instrumentos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades de las plantas y los animales y para la evaluación y conservación de los recursos genéticos.

Otra aplicación interesante es en la aceleración de los programas de mejoramiento de plantas, ganado y peces y para ampliar la variedad de características que pueden mejorarse. La biotecnología está cambiando los forrajes y las prácticas de alimentación de los animales para mejorar la nutrición de estos y reducir los desechos, así como en diagnosticar enfermedades y producir vacunas contra enfermedades de los animales.

Es evidente que el concepto de biotecnología es más amplio que el de ingeniería genética o transgénesis. De hecho, algunos de los aspectos menos controvertidos de la biotecnología agrícola son en potencia los más importantes y beneficiosos para los sectores socialmente postergados¹.

Una de estas aplicaciones es la producción masiva de plantas de todo tipo: forestales, ornamentales, alimenticias, medicinales, frutales, hortícolas. Esta propagación masiva puede alcanzarse mediante el uso de una biotécnica simple denominada genéricamente CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES O CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS.

¹ Disponible en: <<http://www.greenfacts.org/es>>.

El término *cultivo de tejidos vegetales* (CTV) involucra diferentes técnicas de cultivo de tejidos, órganos o células vegetales. Consiste en regenerar plantas a partir de *explantes* o *explantos* (ápices de raíces o de tallos, primordios de hojas, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo o de hojas, ovarios, óvulos, anteras y polen) cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica.

La expresión cultivo in vitro de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo in vitro de plantas.

En los últimos años, los CTV han adquirido una importancia considerable en la investigación básica, y su uso se ha expandido rápidamente en la biotecnología aplicada (Hartung, T. y otros, 2002). Se ha demostrado su gran utilidad para estudiar, propagar y conservar especies hortícolas, ornamentales y principalmente aquellas que presentan problemas en su conservación como cactáceas y árboles entre muchas más (Malabadi y otros, 2004; Portillo y otros, 2007; Ramírez-Malagon y otros, 2007).

El fundamento del CTV, se basa en la teoría de la *totipotencialidad celular* que constituye el principio rector de estas técnicas. Esta teoría sostiene la posibilidad de obtener una planta entera a partir de cualquier célula viva, bajo condiciones controladas de cultivo. Resulta requisito lograr la desdiferenciación

previa de la célula inicial, induciendo la pérdida de las características de especialización de dicha célula hasta un estado de desdiferenciación meristemática. Posteriormente se busca la rediferenciación de esta célula de partida, para lograr variadas respuestas morfogénicas tales como la obtención de un callo, la regeneración de brotes o primordios de raíz, etc.

Para promover estas posibles respuestas es necesario adicionar a los medios sintéticos de cultivo, reguladores del crecimiento (PGR), fundamentalmente auxinas y citoquininas (Pierik, 1990) que controlan el crecimiento de las plantas (Sinha, 2004). Las auxinas estimulan el crecimiento por elongación celular mientras que las citocininas estimulan el crecimiento por división celular.

Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo, sino con solamente una parte del mismo, se utiliza, como se mencionó anteriormente, el término *explante* o *explanto* para indicar la parte del órgano o tejido vegetal que se cultiva *in vitro*. Las plantas continuamente responden a señales o estímulos (externos e internos) que usan para alterar su fisiología, morfología y desarrollo. Dichos estímulos son: luz, nutrientes minerales, compuestos orgánicos, agua, suelo, calor, frío, reguladores de crecimiento vegetal, pH, gases (CO_2 , O_2 , C_2H_4), etc. (Buchanan y otros, 2000). Por tanto el éxito sobre el establecimiento del CTV se asocia en gran medida a dichos estímulos, por lo que deben considerarse los siguientes factores cuando se desean establecer cultivos *in vitro* (Pierik, 1990):

- a) fuente de explantes
- b) constituyentes nutricionales inorgánicos y orgánicos del medio de cultivo,
- c) PGR y
- d) temperatura, luz y pH

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. A la dificultad de reproducir las

condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se debe añadir en este caso, la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo.

En resumen, el cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante (Tiza Arias, 2010)

La práctica del cultivo *in vitro*, por un lado, posee grandes ventajas (Mejia A., R., 1988) como:

- a) permite sanear plantas con virus, mediante el cultivo de meristemos;
- b) facilita la realización de una propagación clonal masiva de plantas idénticas en un corto tiempo;
- c) permite la ampliación de la base genética de una especie;
- d) los clones pueden ser propagados en cualquier época del año;
- e) el costo de mantenimiento de un banco de germoplasma, en condiciones de laboratorio, es menor en comparación al mantenimiento en condiciones de campo, evitando el riesgo de pérdidas por factores climáticos (presencia de heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas) o sanitarios;
- f) las plántulas se mantienen libres de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia;
- g) permite someter a una población de plántulas a pruebas de resistencia a factores de salinidad, temperaturas bajas (heladas) o altas (en condiciones tropicales).

Los *objetivos* perseguidos con la utilización del CTV son numerosos y diferentes:

- a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines

- b) bioconversión y producción de compuestos útiles
- c) obtención de plantas libres de patógenos
- e) propagación masiva de plantas
- f) conservación e intercambio de germoplasma
- g) obtención de plantas transgènicas

Concluyendo, en la actualidad, con el uso de la diversidad de técnicas del cultivo de tejidos vegetales, a partir de diferentes tipos de explantes se han establecido diversos tipos de cultivos (callos, suspensiones celulares, protoplastos, embriones, yemas axilares, meristemos, inflorescencias, etc.) y en muchos casos se han logrado regenerar plantas completas *in vitro* y escalar dichos procesos para multiplicar en forma masiva (micropropagación) algunas especies. Lo anterior ha permitido propagar millones de plantas sin necesidad de disponer de semillas o de depender del limitado número de brotes de la propagación vegetativa. Por otra parte, estos diferentes tipos de cultivos, permitieron un gran avance en los estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares de diferentes rutas biosintéticas de un gran número de metabolitos primarios y secundarios. El conocimiento adquirido con las diferentes técnicas del cultivo de tejidos vegetales, acopladas a las de la ingeniería genética, en la actualidad permiten obtener plantas transformadas con nuevas características genéticas, las cuales son de gran importancia en la agricultura actual. Por lo anterior, este manual pretende dar un panorama general de los principios básicos a considerar cuando se establecen cultivos vegetales *in vitro*, sus aplicaciones y técnicas.

Bibliografía

- Buchanan BB, Grussem W, Jones RL. (2000) Biochemistry and molecular

- Convenio sobre la Diversidad Biológica. 1992. Disponible en: <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
- Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G, Lewis D. 2002. Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell. Altern Lab Anim. 30(4):407-14.
- Malabadi, R. V., G. S. Mulgund y K. Nataraja. 2004. Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 289-293.
- Mejia, R, y Vitorelli, C. 1988. "Cultivo "in vitro" de plantas de papa". Primera edición. Lima - Perú. 112 p. En: Gonzales Ortiz C.; Vilca Aquino J. 1998. Ed. Red Andina de Semillas Forestales. RASEFOR, COSUDE. Interoperación. Cajamarca.
- Pierik, R. L. M. 1990. "Cultivo in vitro de las plantas superiores". Ed. Mundi-Prensa, Madrid. Pp. 326.
- Portillo, L., F.; Santacruz-Ruvalcaba, A. Gutiérrez Mora y B. Rodríguez-Garay. 2007. Somatic embryogeneses in *Agave tequilana* Weber. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 43:569–575.
- Ramírez-Malagon, R.; Aguilar-Ramírez, I.; Borodanenko, A.; Pérez-Moreno, L.; Barrera-Guerra, J. L.; Núñez- Palenius, H. G. y Ochoa-Alejo, N. 2007. In vitro propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 43:660–665.
- Sinha, R. K. 2004. Modern plant physiology. Alpha Science International. India. 620 p.
- Tiza Arias G. 2010. "Propagación *in vitro* de las orquídeas *Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*" en tesis de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana.

CAPÍTULO 1

Un poco de historia

Sandra Sharry y Walter Abedini

«La creatividad simplemente consiste en conectar las cosas. Cuando le preguntas a personas creativas cómo hicieron algo, se sienten un poco culpables porque en realidad no crearon nada, simplemente vieron algo. Les fue obvio después de un tiempo. Eso es porque fueron capaces de conectar las experiencias que habían tenido otros y las sintetizaron de formas nuevas».

Steve Jobs.

Desde hace más de 130 años, se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales. Esta técnica comienza a finales del siglo XIX debido al interés por determinar la relación funcional de un tejido con otro y por conocer el desarrollo de las células aisladas de la planta. Se inició con la investigación sobre hormonas que controlan el crecimiento y desarrollo vegetal. Este conocimiento se combinó con las técnicas básicas de microbiología por las cuales los microorganismos se hacen crecer en medios estériles para su producción e identificación.

En un principio los investigadores sugerían que las células en las plantas se diferenciaban al retener solo aquella parte del genoma necesario para el tipo celular del órgano al que estaban destinadas. Se pensaba que debía haber factores externos que provocaban que las células cambiaran tomando gran diversidad de formas y funciones. Al inicio no se sabía si los cambios sufridos por la diferenciación eran permanentes e irreversibles o si solo eran características temporales para que las células se adaptasen a necesidades

funcionales del organismo en general y del órgano en particular (Calva Calva y Pérez Vargas, 2005). En 1838-39, Schleiden y Schwann postulan la Teoría celular. Trécul (1853), Vochting (1878) y Recharging (1893) buscan el crecimiento autónomo de la célula. En experimentos realizados por Vochting en 1878 sobre la polaridad celular, se observó que células de tallos eran capaces de re diferenciarse y formar raíces y brotes, lo que demostró que la diferenciación no era permanente sino que estaba dada por la posición relativa de la célula en la planta.

Esto da la posibilidad del cultivo autónomo de la célula, debido a la totipotencia y la posibilidad de regeneración. Para ello hubo que diseñar medios de cultivo. Los primeros intentos de diseño de un medio de cultivo fueron realizados por Sacks (1860) y Knops (1861), quienes observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas, y prepararon una solución nutritiva que las contenía.

Sin embargo, no hubo evidencias experimentales. Se continuó luego con la descripción de cicatrización de heridas y formación de callo en numerosas especies.

En investigaciones desarrolladas sobre el tema de diferenciación celular, Gottlieb Haberlandt en 1898, aisló células y tejidos de plantas superiores y las colocó en soluciones nutritivas para su crecimiento y estudio, dando origen de esta manera a la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales. Haberlandt propuso que era posible cultivar juntas células vegetativas libres y túbulos de polen adicionando soluciones nutritivas suplementadas con extractos de ápices vegetativos o con fluidos de sacos embrionarios.

En 1902 Haberlandt postula su visión de futuro de la Biología celular afirmando: *“Hasta donde yo se, no se ha hecho ningún intento sistemático de cultivar células vegetativas aisladas de plantas superiores en soluciones nutritivas simples. Los resultados de dichos experimentos conducirían a una importante visión de conjunto de las propiedades y potencialidades que*

posee la célula como organismo elemental. Además, proporcionaría información acerca de las interrelaciones e influencias complementarias a las que están expuestas las células de un organismo multicelular completo”.

Es por ello que ahora se considera a Haberlandt como el padre de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales, la cual se ha convertido en el dogma central de la Biotecnología Vegetal. (Calva Calva y Pérez Vargas, 2005)

Haberlandt trabajó con células aisladas del parénquima en empalizada de tejido foliar. Estas son células muy diferenciadas y el medio de cultivo era inadecuado. Si hubiera escogido explantes de zanahoria o sauce, que proliferan sin hormona exógena, hubiera obtenido el primer cultivo de tejidos.

Haberlandt no llegó a demostrar su hipótesis debido a que no pudo lograr la división celular, ya que los medios de cultivo que empleaba no incluían reguladores del crecimiento pues esos compuestos eran desconocidos en ese momento.

En 1922 Kotte cultiva ápices radiculares de arvejas y maíz en un medio enriquecido con sales orgánicas, glucosa, peptona, asparagina y varios aminoácidos, partiendo de la idea de obtener condiciones nutritivas semejantes a las del floema. Con la misma idea, Robbins (1922) enriqueció el medio de cultivo con glucosa, agar y sales inorgánicas para el cultivo de ápices radiculares de varias especies. También en 1922 se logró el primer experimento exitoso: la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Luego de la germinación, las plántulas obtenidas se transfirieron a un medio de cultivo en condiciones asépticas, y así se mantuvieron protegidas del ataque de patógenos (hongos, virus y bacterias).

Sin embargo, no fue sino hasta los años 30's que White en Estados Unidos y Gautheret en Francia, demostraron de forma definitiva la posibilidad de cultivar células vegetales *in vitro*. En ese tiempo hubo dos grandes

descubrimientos que repercutieron de manera fundamental sobre el desarrollo de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales: primero, la identificación de las auxinas como reguladoras naturales del crecimiento vegetal, y segundo, el reconocimiento de la importancia de las vitaminas del complejo B en el crecimiento de las plantas.

En 1934, Gautheret cultivó células de *cambium* de algunas especies en una solución mineral con glucosa y cloruro de cisteína. Encontró que dichas células proliferaban por algunos meses y que adicionando vitaminas y ácido indolacético (AIA) se estimulaba considerablemente su crecimiento. Más tarde, en 1939 White reportó el establecimiento de cultivos similares pero a partir de tejidos tumorales de un híbrido de *Nicotiana glauca* X *N. langsdorffii*. Estos investigadores junto con Nobecourt, quien reportó en ese mismo año el establecimiento de un cultivo similar a partir de zanahoria, son los tres investigadores considerados los pioneros de la técnica del cultivo de células y tejidos vegetales (Bhojwani y Razdan 1983; Street 1977). Los medios de cultivo y métodos utilizados en la actualidad son por lo general modificaciones de los establecidos por ellos en 1939.

White (1934) logra el primer cultivo indefinido de raíces de tomate en medio nutritivo con extracto de levadura. Este se considera el primer cultivo de órganos vegetales *in vitro*.

Nobecourt y Gautheret en Francia, al igual que White en Estados Unidos (1939), reportan un crecimiento indefinido en tejido de raíz, donde se observa la formación de callosidades sembradas en un medio semisólido. Los dos primeros utilizan tejido cambial (células meristemáticas) de zanahoria y el último, tejido tumoral de tabaco.

Caplin y Steward (1948) dieron a conocer el efecto tan pronunciado que ejerce la leche de coco en células aisladas de raíces de zanahoria, donde observaron crecimiento de células diferenciadas. Años más tarde, usando la leche de coco en combinación con 2, 4-D promueven la división celular en especies cuyo desarrollo fue muy difícil.

Década del 30. White en Estados Unidos y Gautheret en Francia. Primer regulador descubierto, la auxina y las vitaminas del complejo B en el crecimiento de las plantas. La adición de auxina AIA (Went, 1927) y de las vitaminas B fue esencial en el éxito de los callos de Gautheret y Nobecourt. Asimismo, el hecho de que hubiera células meristemáticas en el tejido, la utilización de glucosa y cloruro de cisteína, que estimulaba el crecimiento de células

Es a partir de este momento cuando tiene su origen el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Se necesitarían una gran cantidad de páginas para citar todas las etapas importantes que derivan del éxito de Gautheret, Nobecourt y White. En 1949 Limaste y Cornuet publican sus observaciones sobre la ausencia de virus en meristemas de tabaco con virus. A partir de estas observaciones, Morel y Martin se dedicaron a cultivar meristemas de dalia y papa afectados por enfermedades virales, consiguiendo obtener plantas completas y sanas. A partir de aquí son fundamentales los estudios básicos sobre nutrición y morfogénesis. Van Overbeek et al. (1941) analizan la calidad nutritiva del endospermo de coco en cultivos de embriones híbridos de *Datura*. En 1948 Skoog y Tsui, trabajando con cultivos de callo de tabaco, demostraron la existencia de una regulación química en la parte aérea y en la raíz. Por otro lado, el cultivo *in vitro* ha permitido avances considerables en el estudio de tumores, que en parte, han hecho posible la realización de las primeras pruebas de manipulación genética en nuestros días.

El descubrimiento de los reguladores de crecimiento (hormonas vegetales) ofreció grandes oportunidades para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. El primer regulador descubierto fue la auxina IAA (ácido 3-indolacético), pero los grandes avances vinieron con el descubrimiento en 1955 de la sustancia reguladora cinetina (una citoquinina).

Miller (1955) descubre la cinetina en el esperma de arenque. Skoog y Miller (1957) determinan el efecto del balance auxina/citoquinina en la inducción de respuestas morfogénicas en callo de tabaco. Reinert (1958) consigue la embriogénesis somática en callos de zanahoria. Trabajos posteriores en callos de la misma especie, con el agregado de cinetina, la primera citocinina descubierta, permitieron demostrar que la diferenciación de brotes, raíces o de ambos, estaba regulada por el balance de auxinas y citocininas.

El cultivo de células aisladas y la totipotencia celular fueron demostrados por Vasil y Hildebrandt en 1965, ya que consiguen regenerar una planta de tabaco a partir de una célula aislada. Un año después, Kohlenbach (1966) consigue finalizar la tarea de Haberlandt, ya que logró cultivar con éxito células de mesófilo de *Macleaya cordata* y obtener embriones somáticos.

Murashige y Skoog (1962) desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco. En la actualidad, las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con mucho éxito en casi todas las especies.

Desde el año 1970 se han realizado un gran número de investigaciones enfocadas a estudios de embriogénesis, organogénesis, hibridación, diferenciación, fitopatología, citología, mutagénesis, producción de metabolitos secundarios y más recientemente, estudios de transformación genética y mejoramiento asistido por marcadores moleculares.

Para resumir lo expuesto, en la Tabla 1 se indican los principales sucesos ocurridos durante la evolución de las técnicas de cultivo de tejidos y células vegetales

Tabla 1. Evolución del cultivo de células y tejidos vegetales

Hooke (1665):
Primera descripción de una célula.
.- Schleiden (1838) y Schwann (1839):
Las células individuales de un organismo, tienen la capacidad de vida independiente.
.- Haberlandt (1902):
Primer intento de hacer cultivo de tejidos de plantas.
.- 1904-1907:
Varios investigadores logran cultivar embriones.
.- Went (1926-1928):
Descubrimiento de una sustancia que estimula el crecimiento vegetal.
.- White (1934):
Cultivo indefinido de raíces de tomate.
.- Kogl y col.(1935):
Descubrimiento del AIA
Gautheret, White (1939):
Uso de las auxinas para la inducción de callo.
Van Oberbeek (1941):
Cultivo in vitro de embriones de Datura.
.- Steward (1952):
Emplea agua de coco en el cultivo de tejidos.
Morel y Martin. 1952
Primera Aplicación del Microinjerto.
.- Muir y col. (1954):
Lograron obtener la primera planta a partir de una sola célula.
.- Skoog y col. (1955): 1955. Miller et al.
Descubren las citoquininas.

.-Skoog y Miller (1957):
Describen el papel que tiene el balance hormonal auxina/cinetina en la diferenciación del callo
Steward (1958):
Regenera embriones desde callo y suspensiones celulares de zanahoria.
Gautheret (1959):
Se publica el primer manual detallado de cultivo in vitro de tejidos vegetales.
Kanta. (1960)
Propagación vegetativa de orquídeas por cultivo de meristemas
.-Morel y Martin (1960-1964):
Propagación vegetativa de orquídeas por cultivo de meristemas.
.- Murashige y Skoog (1962):
Diseño del medio sales MS
Erickson y Jonasesen. (1969)
Aislamiento de protoplastos.
Alfermann et al. (1980)
Utilizaron células completas para transformación.

Los avances desarrollados en el campo de la biología experimental en los últimos años han permitido el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular y han traído consigo la posibilidad de reproducir todos los factores que pueden incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones de laboratorio

En la actualidad el uso de esta tecnología se ha enfatizado en los países en desarrollo, dados los costos que implica, siendo mayores a los generados por los métodos de propagación convencionales. Por tal motivo su uso ha sido prioritariamente encaminado a la propagación rápida y masiva de variedades

de plantas ornamentales con características sobresalientes, eliminación de patógenos, producción de metabolitos secundarios, manipulación genética y conservación de germoplasma.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Calva Calva, G y Pérez Vargas, J. (2005). Cultivo De Células y Tejidos Vegetales: Fuente De Alimentos Para El Futuro. Revista Digital Universitaria. Volumen 6 Número 11.
- Garcia-Gonzalez, R.; Quiroz, K.; Carrasco, B. y Caligari, P. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Cienc. Inv. Agr.* 2010, vol.37, n.3, pp. 5-30.
- Gautheret, R. (1983). Plant tissue culture: a history. *Bot. Mag. Tokyo* 96: 393-410

CAPÍTULO 2

DISEÑO Y ORGANIZACIÓN DEL LABORATORIO DE CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS. DESDE UN ÁREA ESTÉRIL A LAS BIOFÁBRICAS DE PRODUCCIÓN MASIVA

Jesica Iannicelli y Alejandro Salvio Escandón

Algunos comentarios y definiciones

Una importante parte del público general, asesorado por organizaciones autodenominadas “ecologistas”, está convencida, sin base alguna, que la biotecnología es un invento del hombre y va contra “los principios naturales”. La realidad es que lo único que el hombre hace es copiar y adaptar, para beneficio propio, los procesos naturales que observa y estudia. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, no es una excepción a esta regla. En efecto, el desarrollo del cultivo de tejidos vegetales (CTV), tal como se describe en el Capítulo 1, comenzó al principio del siglo XX con los trabajos de Haberlandt (1902), quien intentó, por primera vez (sin mucho éxito), cultivar callos que él observó se desarrollaban en el tronco de un árbol, con la tecnología y la infraestructura disponible en esa época. Posteriormente el trabajo de investigación llevado a cabo en la primera mitad del siglo pasado por botánicos y fisiólogos vegetales, el descubrimiento de las hormonas vegetales y el aprendizaje sobre el uso de los reguladores del crecimiento vegetal, por un lado y, por el otro, el avance de la tecnología (cámaras de cría; zonas estériles; instrumentos de precisión, entre otros), hicieron posible el desarrollo, a partir de los '50, de esta disciplina biotecnológica que, actualmente, se ha convertido en una muy poderosa herramienta para la propagación, mejoramiento, selección, cruzamiento, control

de enfermedades de diferentes especies vegetales, tanto agrícolas, hortícolas, forestales, ornamentales y frutales.

Básicamente, el CTV es una práctica por medio de la cual se aísla una porción de la planta (explanto) proporcionándole, en esterilidad y de forma artificial, todas las condiciones físicas y químicas para que las células expresen todo su potencial. Definido de esta forma, el CTV, es un conjunto de técnicas que permite la propagación de una planta en forma controlada y libre de patógenos. Se hace evidente que el desarrollo de esta actividad requiere de una infraestructura mínima que permita la manipulación, en forma adecuada, del material vegetal de interés.

Gracias a la profundización de nuestros conocimientos de fisiología vegetal, la propagación *in vitro* de plantas ha evolucionado de manera significativa en estos últimos años: desde los fallidos experimentos de Haberlandt al desarrollo de procesos masivos de propagación a través de biofábricas. Este capítulo tratará sobre el diseño y la organización del laboratorio de CTV, se abarcará desde un laboratorio sencillo y económico que permita iniciarse en la actividad con la inversión más baja posible como una camarita aséptica, hasta la complejidad y los requisitos de una biofábrica.

Flujo de trabajo y laboratorio

Un laboratorio de CTV debe disponer al menos de tres sectores: uno para la preparación del medio de cultivo y lavado y esterilización del material de vidrio, otro microbiológicamente limpio, para el establecimiento y la transferencia del cultivo y el tercero, destinado al cultivo propiamente dicho. Cada uno, como se verá más adelante, adecuado y equipado para la actividad correspondiente.

La Figura 1 muestra el sentido del flujo de la secuencia de la propagación *in vitro* de plantas. Esta secuencia se corresponde con las cinco etapas establecidas para el cultivo de tejidos: preparación de la planta madre, introducción *in vitro*, multiplicación, enraizamiento y aclimatación. Cada una con sus diferentes grados de complejidad y dificultad. Esto será determinante en el

diseño de un laboratorio de CTV, dado que la ubicación de los sectores donde se lleven a cabo las actividades correspondientes a cada etapa, deberían ajustarse a la secuencia en cuestión.

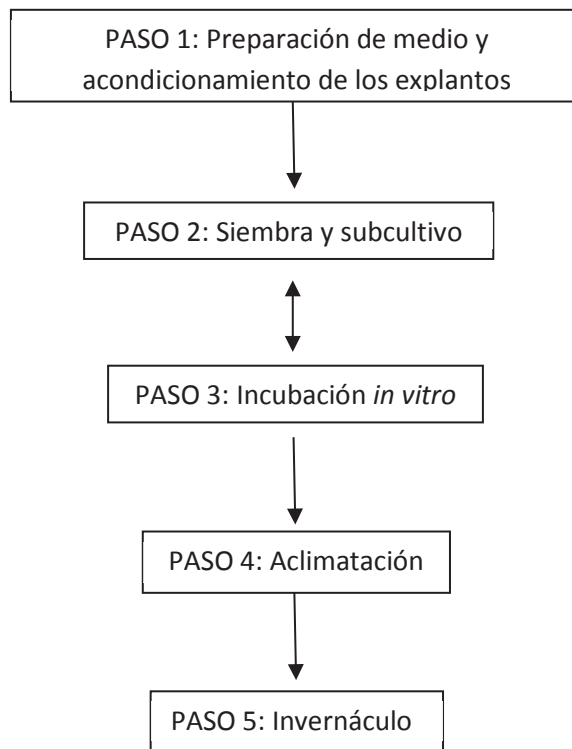
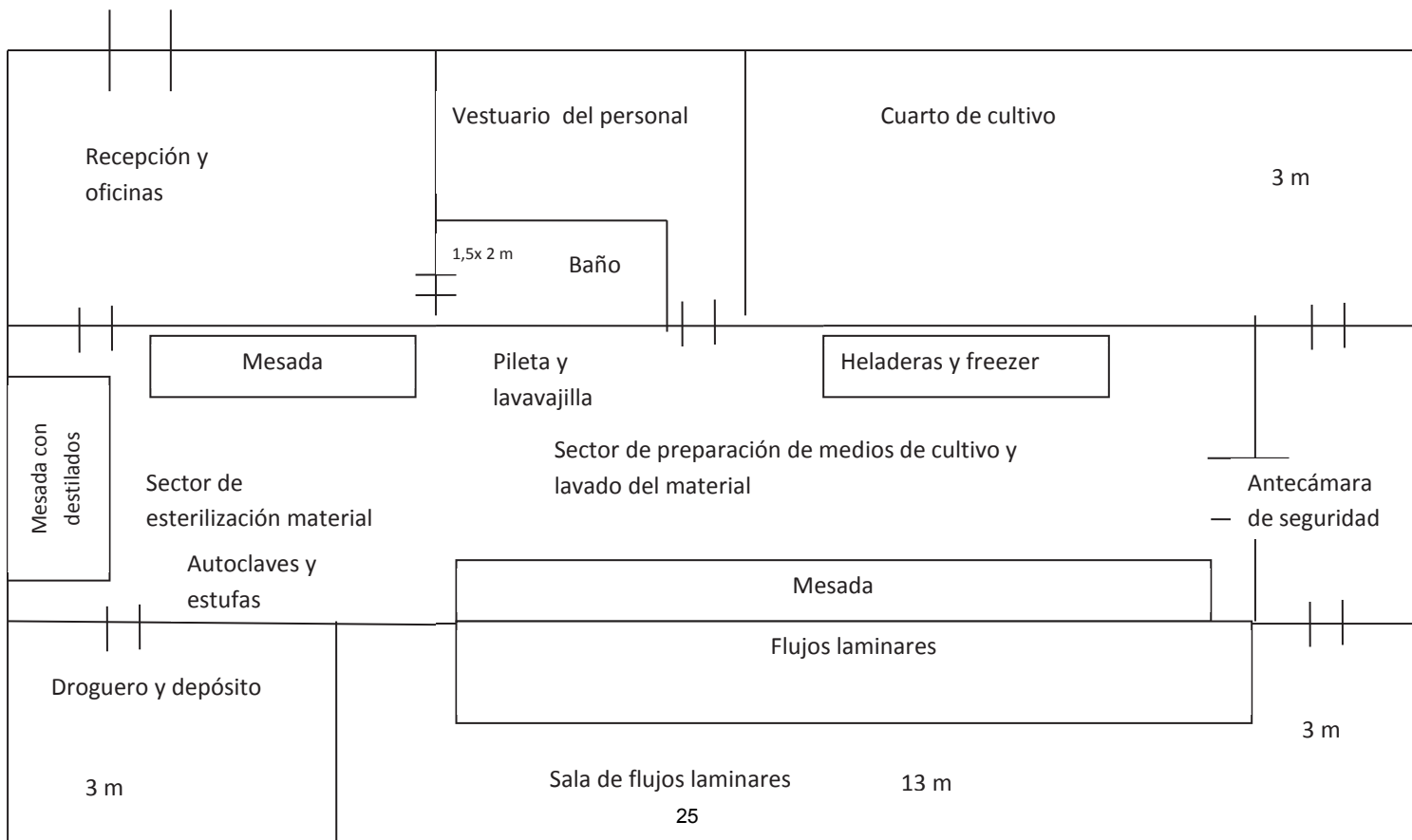


Fig. 1 El esquema indica los pasos y el flujo de trabajo en un proceso de rutina de multiplicación *in vitro* de plantas.

La Figura 2 muestra el plano de un laboratorio tipo que reúne los requisitos propuestos. El sector de laboratorio debe ser el nexo entre el resto de los componentes del edificio; el vestuario del personal, así como el sector de lavado y esterilización tiene un contacto directo y libre con el laboratorio. En cambio en los sectores de los cuartos de cultivo y de flujos, si bien adyacentes al laboratorio, el acceso a estos debe ser restringido y controlado, con un compartimento estanco entre ambos locales a fin de minimizar el intercambio con el exterior, esto es una puerta será bloqueada hasta no cerrar la otra. Este mismo criterio deberá aplicarse con la conexión entre el laboratorio y el sector fitosanitario, todo material que salga de ese sector debe ser rigurosamente

controlado en cuanto a su sanidad y el personal responsable deberá mudar de ropa al entrar y salir de ese sector.

Es importante remarcar algunos detalles a tener en cuenta, tanto la zona estéril y el sector de cuarto o cámaras de cultivo, así como el sector de cuarentena/fitosanitario, tienen que estar ubicados de tal forma que queden como fondo de saco, o sea, no deben ser lugares de tránsito, también esto se debe a una cuestión de mantener los sectores lo más limpios posible. Para los sectores de cámaras y estéril, se recomienda es que ambos locales tengan, cada uno, su puerta independiente y además una conexión entre ellos. El local correspondiente al laboratorio propiamente dicho debería ser un ambiente amplio y bien iluminado a fin de permitir un sector de observación y análisis de los materiales. Debe contar con dos locales anexos, uno para lavado y esterilización del material y otro para depósito de insumos y reactivos, en ambos casos se debe prever una muy buena ventilación de los locales, del lavadero en función del bienestar de los operadores y el depósito para la evacuación adecuada de la posible evaporación de algunos solventes. Por su parte, el área de aclimatación y el invernáculo normal pueden ubicarse adyacentes al edificio principal y levantarse ambos en una misma estructura acondicionando cada sector según corresponda.



Elementos que componen un laboratorio de CTV (insumos e instrumental)

Siendo el laboratorio de CTV un lugar destinado al cultivo de células y de órganos, dos de los elementos básicos para tal fin son contenedores para cultivo (frascos y tubos) y gradillas.

A continuación se hará una revisión sobre el instrumental e insumos con los que se debe equipar el laboratorio de CTV.

-Área de laboratorio y preparación de medio:

- Mesadas.
- Reactivos en uso.
- Heladeras, freezer.
- Destilador.
- Balanzas (granataria y de precisión).
- pHmetro, agitador magnético.
- Vortex.
- Sonicador.
- Dispensador.
- Juego completo de pipetas automáticas esterilizables.
- Horno micro ondas y anafe.
- Material de vidrio (volumétrico, cultivo, etc.).
- Material descartable.

-Área de esterilización y lavado

- Mesadas.
- Autoclave y/o olla de presión.
- Destilador de agua.
- Estufas de esterilización y secado.
- Bandejas y/o gradillas de secado,
- Lavavajilla y Lava pipetas.
- Dispensador de agua destilada.
- Cinta indicadora de esterilización.

- Bandejas para el descarte del material contaminado.
- Agentes desinfectantes (Hipoclorito de Sodio, Alcohol, etc)
- Guantes.

-Área estéril

- Flujo laminar
- Microscopios estereoscópicos
- Herramientas para disección
- Mesadas
- Mechero

-Área de cultivo

- Buen aislamiento térmico
- Estantes
- Luces fluorescentes
- Acondicionadores de aire
- Temporizador
- Indicador de temperatura

Disminuyendo costos y simplificando el proceso

Hasta aquí se han volcado ideas y conceptos generales para el diseño de un laboratorio de investigación/producción. Esto no es más que la opinión del autor y se pueden hacer muchas variantes sobre la aquí propuesta, con la salvedad que la experiencia acumulada remarca fuertemente sobre la importancia de acomodar las estructuras del laboratorio al flujo del proceso rutinario del cultivo de tejidos, independientemente de la escala que se intente alcanzar. Incluso en el montaje de un laboratorio “casero”, con un mínimo de compartimentos, se recomienda seguir estas indicaciones.

La micropropagación ofrece una serie de ventajas sobre la propagación tradicional, entre otras, la posibilidad de producir un elevado número de plantas homogéneas y de una muy alta calidad fitosanitaria, en un menor plazo de tiempo y en espacios reducidos; pero presenta el inconveniente que sus costos

son muy elevados respecto a los de los métodos convencionales tanto para el montaje de un laboratorio como para el proceso de producción en si mismo. En los países en desarrollo, tanto los reactivos, como los insumos, así como la energía eléctrica son ítems relevantes en la composición de ese costo (Góes Junghams y otros, 2009).

Para iniciar un emprendimiento comercial de micropropagación es relevante buscar la manera de incrementar la eficiencia de producción y la disminución de sus costos, por lo que se deberá buscar la manera de optimizar cada etapa del proceso a fin de incrementar su productividad.

Los componentes del costo para una producción de cultivo de tejidos, se reparten según la siguiente proporción: mano de obra: 40%; gastos administrativos: 30%; gastos varios (servicios, mantenimiento, etc.): 20% y 10% para insumos y reactivos (Ahloowalia y Savangikar, 2004), estas proporciones pueden modificarse según de que país se trate, pero la tomaremos como referencia en función de mostrar, en los párrafos siguientes, algunas estrategias para reducir los costos de producción.

Medios y recipientes de cultivos

El proceso de micropropagación de plantas, como se indica en la Figura 1, incluye 5 etapas bien definidas:

1. Etapa “0”, el precultivo, que se refiere al tratamiento de la planta madre.
2. Etapa “1”: introducción *in vitro*, que incluye al proceso de desinfección y establecimiento del cultivo.
3. Etapa “2”: multiplicación: implica el incremento de la masa de material vegetal.
4. Etapa “3” de enraizamiento: se induce el desarrollo de raíces y, por último, la
5. Etapa “4” de aclimatación: en la que se adapta a la planta a vivir fuera de la condición *in vitro*.

La ejecución adecuada de cada una de ellas es la primera herramienta que se dispone para disminuir los costos de producción de un laboratorio de CTV.

En la etapa 2 o fase de multiplicación que justifica todo el proceso, el medio de cultivo juega un papel fundamental. Sus componentes principales son, básicamente, el agua, las sales minerales y la fuente de carbono (sacarosa, en general). Además, se utilizan vitaminas (suplementos orgánicos), reguladores del crecimiento y agentes gelificantes. Si bien la proporción de sus componentes depende de cada especie, la formulación propuesta por Murashige y Skoog (1962) es, por lejos, la más utilizada. En este contexto es importante señalar que los costos del medio de cultivo pueden alcanzar el 15% de los costos de producción y que el agente gelificante contribuye con un 70% de ese porcentaje. Existen alternativas para reducir los costos, reemplazando el agente gelificante y la sacarosa, disminuir el costo del agua empleada (Prakash y otros. 2004), así como también, probar con marcas alternativas de reactivos (i.e.: sales minerales) de producción nacional, cuyo costo es sensiblemente más bajo que las marcas de los distribuidores tradicionales.

La estrategia que se propone es que, para estudios de investigación básica, o bien para el ajuste inicial de un protocolo de multiplicación, se recomienda utilizar los reactivos testados como aptos para cultivo de tejidos; una vez ajustado el protocolo se puede comenzar a introducir, de a una, variantes de menor costo y comparar con el protocolo original la relación costo/beneficio que se obtenga.

Alternativas para el agar

La formación de yemas o raíces bajo condiciones *in vitro* está altamente influenciada por la consistencia física del medio de cultivo. Asimismo, se debería considerar que la disponibilidad de los nutrientes está altamente afectada por el potencial agua del medio y en esto el soporte utilizado es fundamental. Varios autores han probado el reemplazo del agar por diferentes gomas vegetales y almidones, como el de mandioca al 8%, que dio buenos

resultados en cultivo *in vitro* de papa (Góes Junghams y otros, 2009). La fibra de algodón es una buena alternativa para el reemplazo del agar y según Prakash y otros. (2004) ha sido probado con éxito en la multiplicación de varios cultivos, como papa, orquídeas, crisantemo y banana.

De todas formas, dada la posible presencia de inhibidores del crecimiento vegetal en estas sustancias, es aconsejable previamente probar el agente gelificante sustituto con el cultivo de interés.

Fuentes de carbono alternativas

El azúcar más utilizado en el cultivo de tejidos vegetales es la sacarosa. En su estado de máxima pureza, es un producto cuyo precio oscila entre los 10,00 y los 120 US\$ de acuerdo a su calidad. Es posible reemplazarla por el azúcar común, de consumo humano, el producto más refinado que se consiga en el mercado local, cuyo precio es alrededor de 1,00 US\$ el kilogramo.

Otros componentes del medio

Como se indicó antes, es posible disminuir los costos de producción utilizando reactivos de producción local e incluso aquellos de menor pureza (probar previamente); la diferencia de costos puede ser hasta 10 veces menor para alguna de las sales. También es posible encontrar reportes donde se indica el reemplazo de la sacarosa, las vitaminas y los micronutrientes, por la melaza de caña de azúcar (Dhamankar, 1992, citado por Góes Junghams y otros., 2009). Quizás sean las orquídeas el cultivo para el cual se desarrollaron la mayor cantidad de medios de menores costos, como el Phytamax™, el KC (Knudson, 1946) el V&W (Vacin y Went, 1949). Incluso muchas especies de orquídeas tropicales fueron multiplicadas en medio conteniendo, peptona, inositol, agua de coco o pulpa de banana, estas dos últimas, muy ricas en hormonas vegetales (Prakash y otros., 2004).

El agua

Es el componente mayoritario del medio de cultivo, normalmente se utiliza agua bidestilada, destilada o deionizada para la preparación del medio, es posible reemplazarla por agua común de red (libre de metales pesados y contaminantes), de hecho, este tipo de agua, ha sido utilizado para la multiplicación de jengibre y banana (Góes Junghams y otros., 2009).

En zonas rurales puede usarse el agua de lluvia recolectada en recipientes adecuados libres de óxido u otra fuente de contaminación tanto orgánica como inorgánica. No se recomienda el uso de agua de lluvia en zonas urbanas dado que el alto contenido de contaminantes de la atmósfera, pueden afectar el desarrollo de los cultivos.

Recipientes para el cultivo

Cualquier recipiente de vidrio transparente y de tamaño adecuado, es apropiado como frasco de cultivo. Dado que durante el establecimiento del cultivo es donde la contaminación se da con mayor frecuencia, el tubo de cultivo (2,0 a 2,5 cm de diámetro y entre 11,0 y 15, cm de largo) se presenta como el recipiente más adecuado para esta etapa, debido a que los explantos están individualizados (uno por tubo), lo que permite disminuir las pérdidas de material y de medio de cultivo. Durante la etapa de multiplicación el uso de frascos de vidrio de 250-300 ml de capacidad, con boca ancha, que permiten introducir y cultivar varios brotes en cada uno, pueden ser de gran utilidad.

Los frascos de cultivos denominados Magenta™ (policarbonato), son muy utilizados en algunos países desarrollados, pero su costo es muy alto y su vida útil relativamente corta, dado que se van opacando con los continuos lavados y esterilizaciones, lo que afecta la luz que reciben los explantos en cultivo.

Para micropropagación a gran escala es posible el uso de sacos de plástico transparente y estéril o en bolsas tipo Ziploc™, con cierre hermético. Esto abarata considerablemente los costos pero tiene el inconveniente que el plástico no permite el intercambio de gases, por lo que el uso de esta alternativa implica prestarle mucha atención a la evolución del cultivo a fin de evitar el fenómeno de vitrificación. En este contexto es apropiado remarcar la importancia que tiene la tapa del frasco de cultivo. Para la elección de este ítem se debe priorizar la capacidad del elemento para aislar microbiológicamente al explanto tanto como la de permitir el intercambio de gases con el exterior, favoreciendo la disponibilidad de oxígeno y dióxido de carbono, evitando la acumulación de etileno (evita la vitrificación del explanto) y la condensación de la humedad en el interior del envase (gotas de agua cerca de la tapa son buenos vehículos para el ingreso de contaminantes). Existen diversas clases de tapas: de algodón envuelto en gasa, de metal, de polipropileno, de espuma de poliuretano, film de polietileno, entre otras. En la opinión del autor las más apropiadas son las de algodón/gasa, que permiten un muy buen intercambio de gases, son una buena barrera microbiológica y son económicas (salvo el hecho que hay que fabricarlas), pero tienen el inconveniente que no son las más adecuadas para la producción en masa ya que se adaptan mejor en tubos y no en frascos de boca ancha. De todas formas, para los frascos de producción, es posible perforar el centro de las tapas de polipropileno o de metal y colocar algodón en el centro de la misma a fin de permitir el intercambio de gases en este tipo de envases.

Sector de multiplicación

Es el sector más delicado del laboratorio y tiene, como mínimos requerimientos, que ser una habitación sin corrientes de aire, con superficies fáciles de limpiar y desinfectar; además se debe contar con las herramientas de disección, un microscopio estereoscópico y una cámara de flujo laminar, estos dos últimos son los elementos más costosos del equipo. Si bien el microscopio

se puede conseguir a valor relativamente económico en plaza (US\$ 650), es de por sí un artículo caro pero casi imprescindible para ciertos trabajos de micropropagación.

La cámara de flujo laminar puede improvisarse utilizando una pecera de vidrio volteada de lado, de tamaño adecuado. La medida del espesor mínimo estará dada por el tamaño de la lupa binocular que se disponga. La cara de acceso puede cubrirse con una cortina de plástico transparente que pueda plegarse y desplegarse de acuerdo a las necesidades (Figura 3).

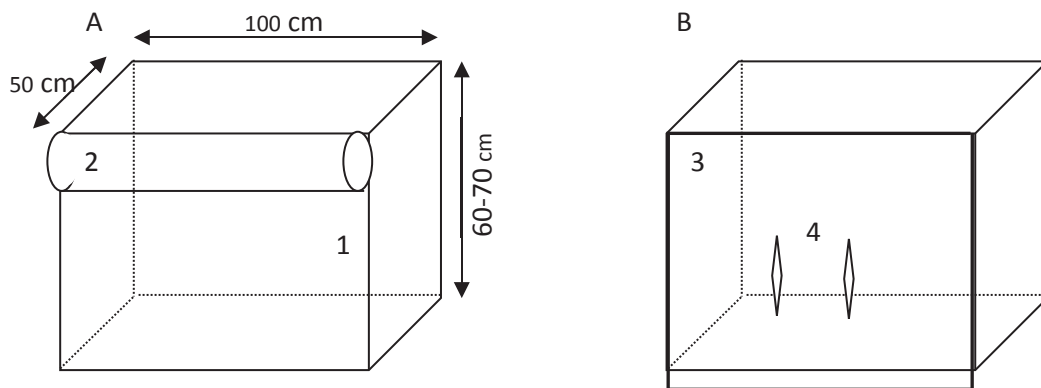


Figura 3. Esquema y medidas de una cámara de cultivo aséptica casera. A) Con la cortina plegada. 1) Acceso. 2) Cortina. B) Con la cortina desplegada. 3) Cortina. 4) Ojales para introducir las manos del operador.

Una vez limpia y desinfectada la superficie externa e interna de la cámara con alcohol 70% o lavandina al 20% a lo que se le puede sumar el uso de una lámpara UV portátil y la utilización de un mechero en el interior para generar una zona de esterilidad. Se considera que la cámara es apta y adecuada para realizar la siembra o multiplicación de material bajo condiciones *in vitro*.

Esta cámara representa una muy interesante alternativa que permitirá, sumada las condiciones enunciadas previamente, poder iniciar la actividad de

la micropropagación sin desembolsar los US\$5.000 promedio, que cuesta una cámara de flujo laminar horizontal.

Cuartos y cámaras de cultivo

En general el cultivo *in vitro* se lleva a cabo en cuartos de cultivos que requieren disponer de una buena iluminación, fotoperiodo controlable y un buen sistema de control de temperatura (Figura 5). Si bien en países en desarrollo la construcción del cuarto de cultivo es relativamente económica, se requiere de una habitación bien aislada y de fácil limpieza, estanterías con un sistema de iluminación adecuado cuyos costos dependerán de la cantidad de estantes y, por supuesto, tendrá variaciones por países. En Argentina, por ejemplo, el precio por una estantería de 2 m de altura y 0,90 de ancho por 0,43 de profundidad con 5 estantes es de US\$ 55,00 + US\$15 por dos lámparas “bajo consumo” + US\$ 25 por un temporizador y US\$ 50 de cables.

El principal problema del cuarto de cultivo radica en los costos de la energía que se consume para la iluminación y la aclimatación, que pueden alcanzar hasta 60% y 25%, respectivamente, de los costos de producción (Dooley, 1991, citado por Góes Junghams y *otros.*, 2009). La Figura 4 muestra una estantería de un cuarto de cultivo típico. Nótese que los tubos de luz fluorescentes han sido reemplazados por lámparas de bajo consumo con las que se logra un importante ahorro de mantenimiento tanto en dinero (se prescinde de los arrancadores y balastos y su correspondiente cableado) como en trabajo. De todas formas, es importante dejar en claro que la iluminación artificial es un método poco eficiente (para la planta) y muy costoso (para el productor). Se han diseñado cuartos de cultivo que permiten el aprovechamiento de la luz natural, lo que implica un importante ahorro de energía y una considerable merma en los costos de producción (Pérez Ponce y *otros.*, 2000). En efecto, debido a que proveen poca energía en el color rojo del espectro, la luz de las lámparas fluorescente son poco eficientes para activar el sistema fotosintético, así como al fitocromo, lo que trae como consecuencia

una pobre fotomorfogénesis; a esto se suma que la luz artificial genera calor que es necesario contrarrestar con una mayor potencia de los acondicionadores de aire, lo que trae como consecuencia un mayor gasto de energía restándole eficiencia al sistema de producción.



Figura 4. Cuarto de cultivo clásico. Construido con carpintería metálica estándar pintada de blanco con pintura antióxido. Cuenta con 2 o 4 lámparas larga vida según estante en particular, este posee una irradiancia de 3500 lux en la zona del explanto.

Los colegas cubanos han diseñado y montado “biofábricas” para la multiplicación de plantas que basan su funcionamiento en los bajos costos de producción, debido a la implementación y utilización de cuartos de cultivo iluminados por luz natural, que de acuerdo a su propuesta presenta la siguientes ventajas:

- 1) No requiere instalaciones complejas y costos de construcción menores,
- 2) No hay costos para iluminar los cultivos,
- 3) Bajo mantenimiento, y
- 4) Debido a su menor grado de estrés, el cultivo supera mejor la fase de aclimatación (Pérez Ponce y otros., 2000).

La iluminación natural se logra a partir de luz cenital, sea por una o varias claraboya/s, de buenas dimensiones, en el techo del cuarto; también, es posible recurrir a sistemas pre armados capaces de direccionar la luz exterior al interior del cuarto, para lo cual existen varias alternativas en el mercado, como ser: <http://www.solatube.com/> o <http://natural-light.com.mx/>, entre otras (Figura 5). Al sistema de luz cenital se puede agregar una amplia superficie vidriada en los laterales que den al exterior, a fin de lograr un mayor aprovechamiento de la luz del día. Como todo, este sistema tiene sus aspectos negativos y es que si bien se gana en calidad lumínica, se hace más difícil el control de temperatura, dado que el vidrio no es un buen aislante, a no ser que se coloque doble cristal con aislamiento, pero eso encarece los costos de instalación. También es posible colocar placas de vidrio en el techo de la cámara, siempre teniendo en cuenta la consideración hecha previamente respecto del control de temperatura.

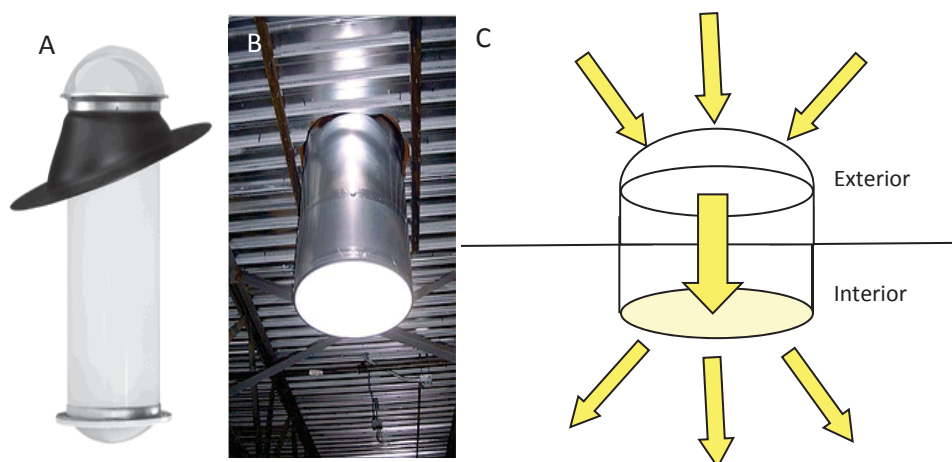


Figura 5. Tubos para luz cenital A) Modelo para techo a dos aguas. B) Para techo plano. C) Esquema del funcionamiento del difusor de luz desde el exterior hacia el interior del ambiente.

Control de temperatura

Es un hecho generalizado la utilización de acondicionadores de aire para el control de temperatura de los explantos cultivados *in vitro*. A pesar de esto, hay opiniones que cuestionan esta costumbre argumentando que esto lo único

que genera es incremento en los costos y no contribuye en nada a la calidad de los cultivos. De hecho, el control de temperatura se efectúa, más que nada, para contrarrestar el calor generado por el sistema de iluminación artificial. Sería importante probar el cultivo de interés bajo condiciones de iluminación con luz natural y sin control de temperatura.

Las alternativas propuestas en este capítulo pretenden mostrar que es posible la incorporación de tecnología accesible, en cuanto a costos, en los procesos de producción de plantines, lo que contribuirá largamente en el incremento de la calidad del producto ofrecido y en la productividad del emprendimiento.

Biofábricas

Se define como una “biofábrica” al laboratorio de cultivo de tejidos con capacidad de producir, en forma masiva y con un protocolo de producción establecido, una especie vegetal dada. Es importante tener en cuenta que el procedimiento completo de producción, no sólo incluye el sector de laboratorio, sino que también involucra el desarrollo en el sector de invernáculos, esto es el proceso completo desde que se siembran los inóculos *in vitro* hasta que se entrega el plantín al interesado.

Una biofábrica no sólo debe producir plantas en forma masiva sino que la calidad de las mismas debe ser óptima y uniforme. Esta condición requiere un estricto control de todas las etapas del proceso productivo desde la preparación de la planta madre, tanto en su estado fisiológico como sanitario.

La adopción de esta estrategia de producción está muy difundida en EEUU, Europa, Taiwán y China, siendo este último país quien más “biofabricadas” dispone en la actualidad. Una tendencia que se observa en los últimos años es la transferencia de las biofábricas desde los países desarrollados a aquellos en desarrollo, principalmente México, Brasil, India, algunos de Europa oriental y de África.

En ese sentido, nuestro país está muy retrasado en el desarrollo y adopción de esta tecnología. Hay en la actualidad sólo dos biofábricas en

funcionamiento, una en Posadas, en la provincia de Misiones (INTA/UNM y Gobierno de la Provincia), y la segunda, en manos privadas, en la ciudad de Chivilcoy, en el marco del proyecto educativo del Instituto San José.

Esta estrategia de producción ya fue largamente probada como eficiente y de hecho, más de 1.000 especies vegetales pueden ser micropropagadas por este sistema, en especial aquellas involucradas en el cultivo intensivo (ornamentales, hortícolas y frutales), siendo la caña de azúcar la única especie de cultivo extensivo multiplicada por este método (Lee Tseng Sheng, 2011).

Desde el punto de vista del diseño una biofábrica no difiere de lo ya visto para el laboratorio estándar del CTV, pueden incrementarse los espacios y la cantidad de equipos que se requerirán para la producción masiva (Figura 6 y 7).



Figura 6. A la izquierda la sala de flujos laminares de un laboratorio de investigación. La foto de la derecha muestra el mismo ambiente pero en una biofábrica.



Figura 7. Cultivos en sistema convencional: zantedeschia, teca, statice, hemerocallis, papa, gerbera, vriesea, anturium, violeta, higo; difaenbachia, limonium, phalenopsis, eucalipto, banana y caña de azúcar (Cortesía de Clayton Debiasi de SBW de Brasil Agrifloricultura Ltda.).

La potencialidad de las biofábricas se incrementó sustancialmente cuando se ajustó el uso de biorreactores para la propagación de plantas, sobre todo con el desarrollo de los sistemas de inmersión temporaria como el RITA® (de las siglas en francés: Recipiente para la Inmersión Temporaria Automatizada) (Fig. 8) o el SIT (Sistema de Inmersión Temporaria), los que marcaron el surgimiento de las biofábricas de segunda generación. Estos dispositivos son sencillos de construir y económicos en cuanto a mantenimiento, ambos fuerzan un contacto directo de toda la superficie del explanto con el medio nutritivo (líquido). Esto tiene como consecuencia la renovación frecuente del medio de cultivo y, además, toda la superficie del explanto absorbe los nutrientes lo que favorece sustancialmente al crecimiento masal.

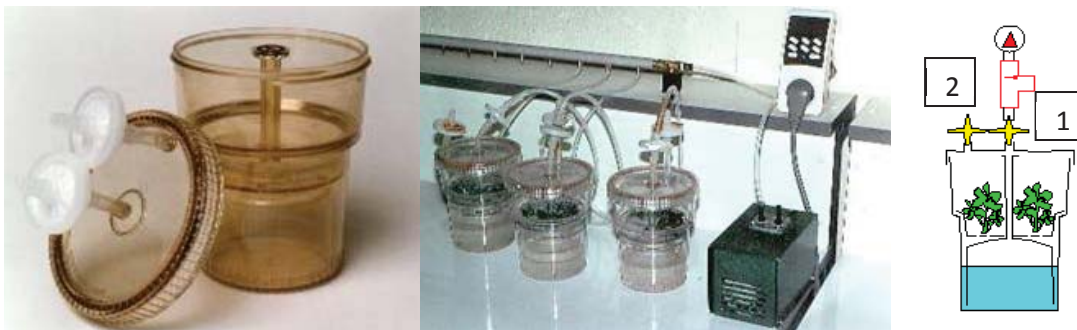


Fig. 8 Sistema de inmersión temporaria RITA (Recipiente de Inmersión Temporaria Automático). Ver explicación en el texto.

El sistema RITA consta de dos recipientes hermanados a través de una rosca. El inferior contiene el medio de cultivo y en el superior se depositan los explantos. Ambos recipientes están interconectados entre sí, y por medio de una válvula solenoide se regula la entrada y la salida de aire que pasa por filtros de $2,2 \mu$ (se esteriliza). El proceso se inicia cuando se abren las válvulas 1 y 2, que conectan los recipientes con el exterior, se fuerza la entrada de aire al recipiente inferior por la válvula 1 que desaloja al medio líquido de este

recipiente y lo desplaza al superior donde se encuentran los explantos, el aire insuflado burbujea en el medio líquido y sale al exterior por la válvula 2.

El sistema SIT, desarrollado inicialmente en Cuba, se basa en el mismo principio, pero su diseño dispone a los envases, contenedores de medio y explantos, de manera horizontal (Figura 9).

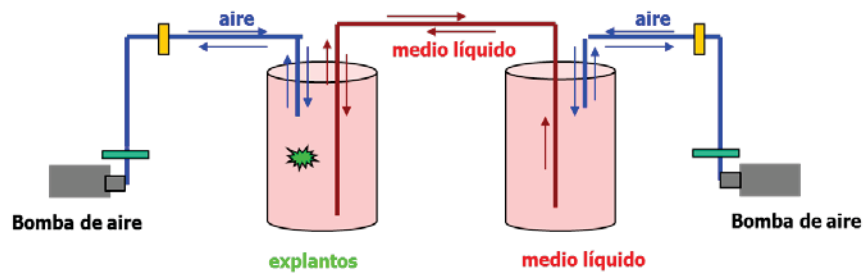


Fig.9 El panel “a” muestra un esquema del diseño y el funcionamiento del SIT diseñado por la Universidad Central Marta Abreu de la Villas. Los paneles “b”, “c” y “d” muestran diferentes modelos de SIT. (Cortesía de Eurico Lemos, Univ de Alagoas).

La figura 9 muestra el esquema del aparato y diferentes tipos de modelo que se pueden construir a partir de este diseño, desde modelos para producción en gran escala (panel “b”) con bidones de 10 litros (que pueden llegar hasta 50 litros), o bien modelos más “caseros” desarrollados para fases experimentales. De la figura 9 se extrae que desarrollar un cultivo en medio líquido no requiere elementos de alta complejidad (excepto por las válvulas y los filtros. Como compresor de aire puede usarse los que se usan para peceras hogareñas.

Finalmente, en la Universidad de Alagoas, Brasil, el grupo de Eurico Lemos, dispone del SIT vertical, que es una combinación de los modelos mostrados previamente. En la Figura 10 se puede observar el esquema de este

modelo (panel “a”) y un aparato en funcionamiento (panel “b”). Tienen la ventaja que se usan bidones descartables que por su tamaño permiten el desarrollo de una gran cantidad de masa vegetal. Además requiere de un solo compresor, una vez que se termina el ciclo de inmersión, el medio de cultivo vuelve al recipiente inferior por gravedad.

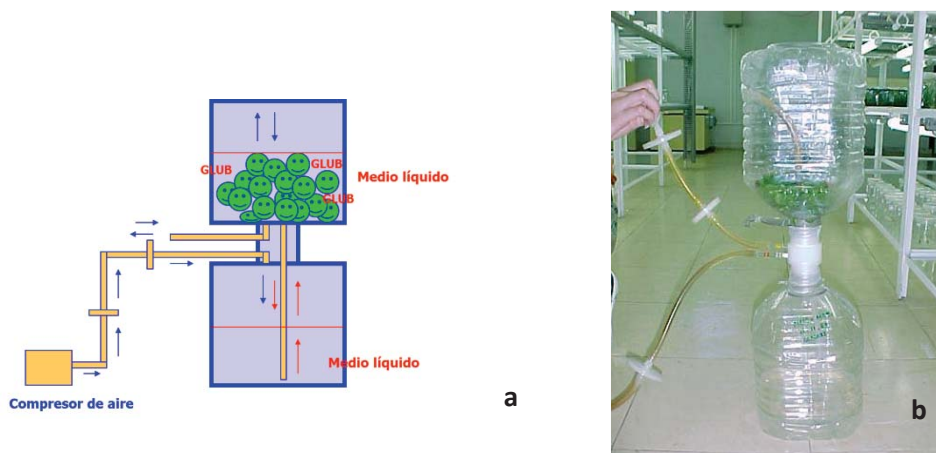


Fig. 10 Panel “a”: Esquema del SIT vertical, su funcionamiento y dinámica del flujo de aire. Panel “b”: unidad en funcionamiento. (Cortesía de Eurico Lemos, Univ de Alagoas).

La duración de este contacto de los explantos con el medio líquido es una de las variables a ajustar (duración y frecuencia). Al invertir el sentido del flujo del aire insuflado el medio vuelve hacia el compartimiento inferior hasta que se repita el ciclo. Para tener una idea, en caña de azúcar se produce, para evitar la vitrificación, una inmersión de 5 minutos cada 6 horas (Baltar Barros, 2011).

La calidad de las plantas biofabricadas por biorreactores es muy superior con relación a aquellas producidas por los sistemas convencionales (*in vivo*), esto es por el hecho de ser homogéneas en cuanto a genotipo y calidad sanitaria (están libres de patógenos), y superan a la micropropagación clásica en productividad, espacio ocupado, menor demanda de mano de obra, menos manipulación de los explantos, reducción en el uso de aparatos e insumos

(flujo laminar, herramientas de trabajo, material de vidrio), reducción de los consumos de energía, eliminación del uso de sustratos semisólido, incremento en la tasa de multiplicación y facilidad de aclimatación de los materiales.

Para la óptima implementación de este sistema se hace indispensable un estricto control de la sanidad del inóculo y de los pasos de manipulación posteriores de los explantos en cultivo. De todas formas, a pesar que frente a un evento de contaminación en un sistema de cultivo por biorreactores, las pérdidas de material serían cuantiosas, hoy en día se han desarrollado estrategias a través de esterilizaciones químicas agregadas al medio de cultivo que permiten controlar en forma adecuada estas situaciones.

La Figura 11 muestra la evolución de un cultivo de caña de azúcar, desde el detalle de los bidones en cuarto el cuarto de cultivo hasta su transferencia a invernáculo. Asimismo se puede apreciar las diferencias en masa y tamaño de vástagos cultivados por el método tradicional (panel “f”) y por el SIT (panel “g”).



Fig.11 Etapas del cultivo de caña de azúcar con el sistema SIT. Paneles “a” y “b”. Vista de la estantería y detalle de los bidones en la etapa final. Panel “c”: vástagos entrando en la etapa de aclimatación. Panel “d”. Separando vástagos para llevar invernáculo. Panel “e” brotes en etapa de aclimatación en invernáculo. Paneles “f” y “g”: diferencias observadas en el cultivo de caña de azúcar por el método de micropropagación clásico (“f”) y en biorreactor (“g”) Tomado de Baltar Barros (2011).

Ventajas y desventajas del cultivo en biorreactores

Ventajas:

- Uso de medio líquido
- Mayor área de absorción de nutrientes.
- Buen intercambio de gases.
- Crecimiento acelerado de los explantos.
- Adecuado para embriogénesis somática.
- Menos mano de obra.
- Economía de espacio.

Desventajas:

- Sanidad difícil de controlar.
- Precisa equipamiento especial.
- No sirve para la inducción del cultivo,
- Apropiado para las fases de multiplicación crecimiento y enraizamiento.

Conclusiones

A lo largo de este capítulo hemos realizado un rápido repaso sobre los diferentes niveles de complejidad con los que se puede desarrollar la propagación *in vitro*. La elección de estas opciones dependerá, básicamente, de la capacidad de inversión, de la demanda del mercado y de la disponibilidad de recursos humanos formados. Pero, sobre lo que los autores no tienen duda, es en que este sistema o alguna posible adaptación del mismo, será una parte importante de la producción agrícola en un futuro no muy lejano, dado que la producción masiva de plantines homogéneos y de alta calidad, tendrá un impacto positivo en la cadena fruti/horti/florícola. Por otra parte facilitará la labor de los programas sociales y el desarrollo de las huertas familiares. Asimismo,

puede ser una herramienta fundamental para el desarrollo de cooperativas de pequeños productores. Brinda una mayor seguridad alimentaria y es una eventual plataforma para nuevos desarrollos, oferta de servicios (vinculación tecnológica) y formación de nuevos RRHH. Es esperable que genere demanda de nueva mano de obra.

Bibliografía consultada

- Ahloowalia, B.S, y Savangikar, V.A. (2004) Incorporation of low cost options. In: International Atomic Energy Agency. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Viena, pags.: 41-45. Proceedings of a Technical Meeting. FAO/IAEA, August 2002.
- Baltar Barros, A.C.; Costa, D.A y Cabral Medeiros, E . (2011) Biorreator de inmersao temporária aplicado na biofabricacao de cana de açúcar. Cap. 3. En Biofábrica de Plantas. Producao industrial de plantas *In vitro*. Ed. Lee Thseng, S. G. Ed. Antigua, San Pablo. Brasil.
- Debiasi, C. (2011) Utilizacao de biorreactores de inmersao temporária em uma biofábrica de cultura de tecidos vegetais. Cap. 6. En Biofábrica de Plantas. Producao industrial de plantas *In vitro*. Ed. Lee Thseng, S. G. Ed. Antigua, San Pablo. Brasil.
- Dooley, J.H. (1991) Influence of lighting spectra on the plant tissue culture. En: Meeting American Soc. of Agr. Eng. Poceedings pags: 473-497.
- Góes Junghams. T.; da Silva Souza, A.; dos Santos-Serejo, J. y Vidigal, F. (2009). Redução de custos na Micropropagação. En: Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. Cap.: 6. Eds.: Góes Junghams. T. y da Silva Souza, A. ISBN: 978-85-7158-017-6. 185 p. Editorial: EMBRAPA Cruz das Almas. Brasil.
- Haberland, G. (1902) Kultuverche mit isolierten Pflanzenzellen, Sitzungsbe Richte der Akadeie der Wissenschaften, 111, 69-92.
- Knudson, L.A. (1946) A new nutrient solution for germination of Orchid seed. American Orchid Soc. Bull. 15 (1): 214-217.

- Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Copenhagen. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Prakash, S.; Hoque, M. y Brinks, T. (2004) Incorporation of low cost options. In: International Atomic Energy Agency. Low cost options for tissue culture technology in developing countries.
- Pérez Ponce J. N.; Suárez Castellá, M. y Orellana Pérez, P. (2000) Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. *Bioteología Vegetal*, 1: 3-12.
- Teixeira, J.B (2011) Biorreator de inmersão temporária o futuro da produção industrial de plantas *in vitro*. Cap. 2. En *Biofábrica de Plantas. Produção industrial de plantas In vitro*. Ed. Lee Thseng, S. G. Ed. Antigua, San Pablo. Brasil.
- Vacin, E.F. & Went, F.W. (1949) Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gaz.* 110 (4): 605-613.

CAPITULO 3

NUTRIENTES PARA LAS PLANTAS DE PROBETA

MEDIOS DE CULTIVO- REGULADORES DE CRECIMIENTO

Patricia Boeri

Introducción:

Los medios de cultivo son soluciones acuosas donde se desarrollan microorganismos o células o tejidos vegetales y/o animales. El desarrollo de éstos solo ocurre en presencia de los nutrientes requeridos (que dependen del microorganismo o tipo de células o tejido en particular).

La composición del medio de cultivo garantiza que se le suministren los nutrientes al tejido vegetal “*in vitro*” y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural.

Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Perea y Tirado, 2011).

No existe un medio universal para todos los propósitos ni para todas las especies que se trabajan *in vitro*, sin embargo se puede utilizar el medio básico o de Murashige y Skoog (M&S). Actualmente se encuentran más de 80 medios comerciales que se venden listos para micropropagación y la literatura menciona alrededor de 2000 formulaciones diferentes (Mroginski y otros., 2004).

Composición de la materia - Elementos esenciales

Tradicionalmente, los elementos presentes en las plantas se han clasificado de acuerdo a la presencia en cantidades relativamente altas (N, P, K, S) o cuando

están presentes en muy pequeñas cantidades o trazas (Cu, Fe, Mg). Sin embargo, esta clasificación no alude a su importancia metabólica.

Son considerados elementos esenciales para las plantas, aquellos que permiten su crecimiento y desarrollo normal. En las plantas las concentraciones de los diferentes elementos varía considerablemente.

Para considerar que un elemento dado es esencial, es preciso demostrar (criterio de Arnon):

- Cuando en ausencia de un determinado elemento la planta no puede completar su ciclo biológico.
- La acción del elemento debe ser específica, es decir, ningún otro elemento puede sustituirlo totalmente.
- El elemento debe estar implicado directamente en la nutrición vegetal, bien como constituyente de un metabolito esencial, o que sea requerido para el funcionamiento de un enzima.

Bollard y Butier (1956) diferencian entre *elemento esencial*, según el criterio de Arnon, y *elemento funcional* que es aquel que actúa de modo preciso en el metabolismo, sea o no esencial.

Composición del medio de cultivo:

La composición del medio de cultivo es uno de los principales factores a tener en cuenta para lograr una respuesta morfológica deseada, estimular la diferenciación y conducir el crecimiento de tejidos vegetales *in vitro*.

Todos los medios contienen como componentes principales: agua, sustancias orgánicas y sustancias inorgánicas. Los medios de cultivo sólidos llevan además un agente solidificante.

Los medios de cultivo poseen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia, combinación y concentración dependerá de los objetivos que se persigan en su utilización. Este debe tener los nutrientes esenciales para la planta, sustancias minerales (macro y micronutrientes), vitaminas, aminoácidos, azúcares agentes reguladores del crecimiento, agua y otros.

Las composiciones químicas de los medios de cultivo resultan esenciales para las plantas porque forman parte de los requerimientos para el crecimiento, de

productos y suministran energía para la síntesis de metabolitos y el mantenimiento celular.

Si bien existen premezclas en el mercado, los laboratorios frecuentemente realizan sus propios medios de cultivo. Esto no solo permite modificar las formulaciones estándares ajustándolo a las necesidades fisiológicas y requerimientos nutricionales de cada cultivo, sino también comprender detalladamente el rol que los diferentes elementos químicos tienen en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular: autotrófico o heterotrófico.

Composición de los medios de cultivo

1) Agua	
2) Compuestos orgánicos:	2.1) Suplementos macroorgánicos: 2.1.a) Carbohidratos
	2.2) Suplementos microorgánicos: 2.2.a) Vitaminas, 2.2.b) Aminoácidos, 2.2.c) Reguladores de crecimiento (hormonas): auxinas, citocininas, giberelinas, brasinoesteroides, etileno, ancymidol 2.2.d) Antibióticos
3) Compuestos inorgánicos	3.1) Macronutrientes 3.2) Micronutrientes
4) Compuestos indefinidos:	4.1) Agua de coco 4.2) Extractos de levadura 4.3) Caseína hidrolizada 4.4) Agentes solidificantes 4.5) Carbón activado

1) Agua: Suele utilizarse agua destilada. En ocasiones específicas puede utilizarse agua corriente, pero debe evitarse porque la presencia de ciertos cationes (como Ca^{2+} o Mg^{2+}) puede formar sales insolubles con otros componentes del medio (como los fosfatos) sobre todo, durante el proceso de esterilización.

2) Compuestos orgánicos:

2.1) Suplementos macroorgánicos:

2.1.a) Carbohidratos: Se pueden utilizar sustancias puras o mezclas de sustancias orgánicas. Como sustancias puras más comunes se encuentran los azúcares, frecuentemente son utilizados como fuente de carbono y energía. Entre ellos, es común el empleo de monosacáridos como la glucosa, disacáridos como la lactosa y polisacáridos como el almidón.

La sacarosa y la glucosa se utilizan en el cultivo de tejidos de muchas especies. La fructuosa, maltosa, celabiosa, rafinosa y otras, se les usa como fuente de carbono para algunas variedades de tejidos. La mejor fuente de carbohidratos (2-5%), y la más utilizada en cultivos es la sacarosa. Varios informes señalan que la sacarosa se hidroliza activamente a fructuosa y glucosa por la invertasa de la pared celular. El uso de la dextrina, pectina y almidón ha sido reportado en la organogénesis indirecta de *Sequoia*. Las carbohidrasas hidrolizan el almidón, maltosa o rafinosa en monosacáridos.

El manitol es un azúcar alcohol que puede ser agregado al medio de cultivo como aporte nutritivo o para regular el control osmótico del sistema.

2.2) Suplementos microorgánicos: Incluye compuestos orgánicos que benefician el crecimiento y morfogénesis del material vegetal. Entre ellos, podemos mencionar: vitaminas, aminoácidos, complejos naturales de composición química indefinida y reguladores de crecimiento.

2.2.a) Vitaminas:

Los complejos vitamínicos contienen elementos esenciales para las plantas. Aunque las vitaminas normalmente son sintetizadas por ellas, son también requeridas para su crecimiento y diferenciación cumpliendo un rol catalítico en el metabolismo celular. Cuando las células de plantas superiores son cultivadas *in vitro*, la ausencia de vitaminas constituye un factor limitante del crecimiento. No obstante, estas necesidades dependen de la especie considerada. Las vitaminas que son adicionadas más usualmente en medios de cultivo son: tiamina-HCl, ácido nicotínico, piridoxina-HCl, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, riboflavina.

Generalmente, los requerimientos biológicos de vitaminas, son cubiertos con la adición externa, aunque algunos tejidos pueden obtenerlas a partir de

complejos orgánicos de composición indefinida como en agua de coco, extracto de levadura, jugos de frutas, etc.

- Tiamina (también llamada vitamina B1): Es un componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Por eso, su presencia es necesaria para que las células puedan realizar sus funciones vitales. Durante el ciclo vital normal de las plantas verdes, la tiamina se sintetiza en las hojas y se almacena en los cotiledones de la semilla. Es fotoestable, pero durante la esterilización por autoclave se descompone en pirimidina y tiazol; sin embargo, la mayoría de los tejidos son capaces de sintetizar tiamina a partir de los productos de su descomposición. En la naturaleza, especialmente en los cereales, aparecen libres y en concentraciones relativamente elevadas. Se utiliza en concentraciones cercanas a 0.4mg/L.
- La Riboflavina (vitamina B2): Forma parte de las vitaminas del complejo B. Ayuda en la metabolización de carbohidratos y en la respiración celular. Es termoestable y fotosensible.
- Ácido nicotínico (niacina o vitamina B3): Estimula el crecimiento de la planta a través de su participación como componente de co-enzimas que actúan en las reacciones de energía. Es foto y termoestable. Por lo general, se agrega al medio entre 0.1 a 10mg/L
- Adenina (vitamina B4): Es parte integral de los ácidos nucleicos. Actúa débilmente como citocinina. Se utiliza como sulfato de adenina para promover la formación de brotes.
- Ácido pantoténico (vitamina B5): Es termoestable, por lo que puede ser autoclavado junto con el medio nutritivo. Se encuentra en la naturaleza como componente de la coenzima A. Actúa en el metabolismo de las grasas. No es una vitamina esencial. Se incorpora al medio en forma de pantotenato de calcio.
- Piridoxina (vitamina B6): Es termo y fotoestable. Aunque no es considerada esencial en el cultivo de tejidos, participa en la síntesis de purinas y pirimidinas y por lo tanto, en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Estimula el crecimiento vegetal interviniendo en las reacciones de energía.

- Niacina (vitamina B12): desempeña un papel importante en la respiración porque es un componente de las coenzimas I y II, grupos portadores de hidrógeno en la fase respiratoria de deshidrogenación.
- Acido Ascórbico (vitamina C): Interviene en los sistemas de oxidación de la célula y establece potenciales favorables de oxidación – reducción. Por ello se lo utiliza como antioxidante para prevenir la oxidación de compuestos fenólicos.
- Tocoferol (vitamina E): Mejora y promueve la dispersión de cultivos en suspensión.
- Biotina (vitamina H): No es esencial. La biotina sirve como factor de crecimiento de las levaduras y algunas bacterias. Es utilizada en el metabolismo de grasas, proteínas y carbohidratos.
- Ácido fólico (vitamina Bc o M): No es esencial y se descompone con el calor en soluciones ácidas. Cumple funciones de vitamina B y tiene actividad de coenzima. En la oscuridad inhibe el crecimiento de los tejidos, mientras que en la luz lo promueve.
- Inositol o myo-inositol: es un azúcar alcohol que está incluido dentro del complejo de la vitamina B. se agrega en casi todos los medios de cultivo a razón de 100 mg/L y como suplemento de la sacarosa. Es parte integral de varios tipos de membranas de algunas organelas como los cloroplastos.

2.2.b) Aminoácidos:

Los aminoácidos representan, para las células, una fuente efectiva e inmediata de nitrógeno, puesto que se pueden incorporar al metabolismo mucho más rápido que el nitrógeno inorgánico, aún cuando ambas fuentes se encuentran en el mismo medio (Thom y otros., 1981), sin embargo, su incorporación al medio de cultivo es bastante discutida. Es conocido que su empleo está en función del balance adecuado de la relación NH_4/NO_3 que es usualmente suministrado como NO_3^- , NH_4 , NO_3 , NH_4Cl , etc. Generalmente la inclusión de estos compuestos nitrogenados orgánicos es necesaria solamente cuando se inicia la formación de callo, ya que se consideran estimulantes de la proliferación celular (Gamborg y Jhyluk, 1981). Tienen efecto notable sobre el desarrollo de tejidos vegetales cuando son usados en combinación. Algunos tienen efecto antagónico entre ellos, así es el caso de la fenilalamina y tirosina

(Anderson, 1969). En tejido de tabaco el efecto antagónico se observa con la isoleucina, valina y treonina.

Los aminoácidos son usados como constituyentes de compuestos de composición química indefinida o bien por adición directa. De esta manera, se encuentran en caseína hidrolizada, peptona, triptona, lactoalbúmina hidrolizada, extracto de malta, agua de coco, casamina, etc. Los aminoácidos que se emplean directa y más comúnmente son L-glicina, L-glutamina, L-asparagina, L-arginina, L-prolina, ácido glutámico. L-hidroxiprolina, L-alanina, L-lisina, L-leucina, L-serina y L-cisteína. Nitsch y Nitsch (1957) señalan que las formas L de los aminoácidos son más adecuadas para el cultivo de tejidos que las formas -D ya que éstas son tóxicas. Además, las formas racémicas son mejores para el desarrollo de tejidos que las formas puras -L de aminoácidos. Se han señalado efectos diferentes al usar isómeros de aminoácidos, por ejemplo: -L alanina es más fácilmente asimilado que la B-alanina. El ácido α aminobutírico no puede ser utilizado como fuente de nitrógeno, pero puede reemplazar completamente a los nitratos.

La arginina permite restablecer el crecimiento de raíces inhibidas en compuestas; además de acelerar la formación de yemas en tejidos de tallo de tabaco. La urea también puede ser usada como una fuente de nitrógeno, en vez de aminoácidos. Aún cuando se ha señalado que siempre que el medio de cultivo tenga la fuente de amonio o nitrato adecuado, los aminoácidos no son esenciales (Gamborg, y *otros.*,1976). También es cierto que la adición posiblemente depende del origen del tejido; además de que su incorporación es requerida para diversos objetivos. De acuerdo con Steward y Caplin (1951), la glicina o mezcla de aminoácidos en forma de caseína hidrolizada se requieren para el mantenimiento de células indiferenciadas (callo). Murashige y Skoog (1962) y Gamborg (1966) señalan que la adición de la caseína hidrolizada incrementa la división celular en tabaco, frijol y maíz, respectivamente. Nitsch y colaboradores (1970) confirmaron que agregar nitrógeno en forma de NH_4^+ estimula el crecimiento de callo en pera o manzana; pero aumenta cuando el medio se complementa con asparagina, glutamina u otro aminoácido.

A pesar de que la presencia de nitrógeno orgánico es muy importante para la organogénesis, se considera esencial para la embriogénesis. Además de la

caseína hidrolizada, la L-glutamina ha demostrado ser promotor del desarrollo embrionario. En embriones inmaduros de vainilla, el aceleramiento de la maduración es estimulado por la adición al medio de sulfato de adenina y L-glutamina (González y Parra, 1989, 1990). Es difícil definir si el papel de los aminoácidos es esencia o no; sin embargo, la adición de la caseína hidrolizada puede prevenir o inclusive asegurar la fuente de nitrógeno, ante la posible deficiencia de la fuente de amonio o nitrógeno inorgánico o como Li *et. al.*, (1989) señala que la ausencia de aminoácidos, principalmente prolina, ocasiona degeneración de plántulas de *Pachystachys lutea* cultivadas *in vitro* (Miller, 1967).

2.2.c) Reguladores de Crecimiento- Hormonas (PGR):

Las hormonas reguladoras del crecimiento son de los compuestos más importantes que se incluyen en un medio de cultivo. Del propósito del medio de cultivo que se está preparando depende el tipo y la dosis de hormona que se utilizará.

Los reguladores de crecimiento se dividen en auxinas, citocininas, giberelinas y retardantes e inhibidores del crecimiento. Son naturales (hormonas) o sintéticas (reguladores de crecimiento).

- Auxinas: Las auxinas estimulan el agrandamiento y alargamiento celular y promueven la división celular en cultivos de tejidos. Se adicionan combinadas con citocininas durante la etapa de multiplicación o sin ellas, en la etapa de enraizamiento.

Se transporta polarmente, a través del floema, desde los ápices (caulinares y radicales). Junto con las citocininas, son esenciales para la viabilidad de las plantas. Su estructura química es muy variable, pueden acumularse en formas inactivas conjugadas a oligosacáridos y aminoácidos.

Para preparar soluciones stock de auxinas, se deben disolver con unas gotas de solución 1M de Hidróxido de Sodio (NaOH) o de Hidróxido de Potasio (KOH).

Auxinas naturales: El *ácido indolacético (AIA)* es la única auxina natural que se localiza en las zonas de crecimiento. Es fotosensible, por lo que no es conveniente utilizarlo en cultivo en suspensión. Por ser hormona natural, su desaparición del tejido es muy rápido ya que en las plantas se encuentran las

enzimas oxidasas de la que hidrolizan a la hormona de manera que su efecto es suave y de poca duración.

Auxinas sintetizadas químicamente: Son auxinas sintéticas del *ácido naftalenacético* (ANA), *ácido 2,4 diclorofenoxiacético* y *ácido indolbutírico* (AIB). Resultan esenciales para el cultivo de meristemas, en los procesos de morfogénesis directa e indirecta, en la inducción de embriogénesis somática, en el enraizamiento de microesquejes y actúan promoviendo el crecimiento de ápices caulinares.

La cantidad de auxina adicionada dependerá de los niveles endógenos (presentes naturalmente) del material vegetal y se conoce a través de una serie de experimentos dosis-respuesta. Para el cultivo de callos se usan de 0.1 a 5.0 mg/l de AIA mientras que para la diferenciación de órganos se ha señalado a menudo que es necesario reducir la concentración de la auxina. El AIA o el ANA resultan mejores que el 2,4-D para la inducción de la organización celular. Si se usa 2,4-D en muchas especies de plantas tenderán a la formación de callos, por lo que si se desea inducir la organogénesis, se necesita cambiar el 2,4-D por otra auxina como el AIA o bien bajar su concentración.

- Citocininas: Son utilizadas para estimular la división celular, especialmente al combinarlas con auxinas. A altas concentraciones inducen la formación de brotes adventicios e inhiben la formación de raíces, promueven la multiplicación de tallos y proliferación de yemas laterales, a través de la disminución de la dominancia apical. Por otra parte, las citocininas permiten retardar el proceso de envejecimiento celular e influyen en el transporte de auxinas. Sin embargo, aunque algunos tipos de tejidos requieren esencialmente citocininas para el fenómeno de la organogénesis, éstas no son esenciales.

Para preparar soluciones stock, se deben disolver con unas gotas de una solución 1M de ácido clorhídrico (HCl).

Dentro de las citocininas naturales se encuentra la *Zeatina*, que se extrae del endospermo del maíz, y *6 isopentanol adenina (2iP)*, aislada de *Clostridium tumerfaciens*, ésta produce un sobre crecimiento de los tejidos.

Citocininas sintéticas son: *6-benciladenina (6 BA)* o también conocida como bencilanimopurina (*6 BAP*); la *kinetina (KIN)* también conocida como 6-furfurylamino purina (FAP). La kinetina fue la primera citocinina identificada producida de síntesis por la degradación térmica del ADN. La 6-benciladenina

se utiliza en concentraciones de 1.01-1.0 mg/l. También se emplea la zeatina o *isopentil adenina* como sustancias de naturaleza citocinética. La zeatina, es más potente que la kinetina, por lo que su costo es más elevado.

- Giberelinas: Se encuentran naturalmente en las plantas y produce un alargamiento de las células, elongación de los entrenudos y el crecimiento meristemático. También inducen la ruptura de dormancia de embriones aislados o semillas. En general, inhiben la formación de tallos y raíces adventicias. De todas las giberelinas, es el Ácido giberélico (AG₃) el más utilizado en propagación *in vitro*.

- Brasinoesteroides (BR): Los brasinoesteroides más ampliamente distribuidos en las plantas son los que poseen 28 átomos de carbono (C₂₈), grupo en que la brasinólida es el representante más activo.

En los primeros momentos de su descubrimiento, los BR no recibieron gran aceptación como hormonas esenciales del crecimiento y desarrollo de las plantas, porque su actividad es similar a la de otras fitohormonas (Clouse, 1996; 1997). No fue hasta el establecimiento de las rutas de biosíntesis de los BR, así como el aislamiento y la caracterización de mutantes biosintéticos e insensibles, fundamentalmente en *Arabidopsis*, que estas sustancias comenzaron a considerarse como una nueva clase de fitohormonas (Fujioka y otros., 1998). Los estudios realizados con los BR han demostrado sus efectos múltiples en la elongación de los tallos, la actividad en la fotomorfogénesis, la inhibición del crecimiento de la raíz, la senescencia, la división celular, la inducción de la biosíntesis del etileno, el desarrollo vascular y reproductivo, el crecimiento del tubo polínico, la polarización de la membrana y el bombeo de protones, las relaciones fuente/sitio de consumo, la modulación del estrés, entre otros (Clouse y Sasse, 1998; Mazorra y Nuñez, 2008).

Los BR generaron desde muy temprano interés práctico en la agricultura, debido a sus efectos como estimuladores del crecimiento. Inicialmente se realizaron aplicaciones de los compuestos naturales, para promover el rendimiento de los cultivos (Ikekawa y Zhao, 1991). Sin embargo, los problemas de las aplicaciones de los BR naturales en condiciones de campo posibilitaron que se introdujeran algunos análogos de los BR obtenidos por vía

sintética; estos últimos compuestos eran más económicos y sobre todo sus efectos tenían una duración más prolongada en estas condiciones (Suzuki y otros., 1995).

- Etileno: Es un gas producido naturalmente por las plantas que afecta el crecimiento del cultivo.
- Ancymidol: es un retardante del crecimiento, de efectos similares a las citocininas.

Ejemplos de PGR utilizados en cultivo *in vitro* de plantas

Clase de Reguladores	Abreviatura o nombre común	Nombre químico
Auxinas	AIA	Ác. 3-indolacético
	ANA	Ác. Naftalenoacético
	AIB	Ác. Indolbutírico
	ApCFA	Ác. (4-clorofenoxi) acético
	2,4-D	Ác. 2,4-diclorofenoxiacético
	Picloran	Ác. 4-amino-3,5,6-tricloropico-línico
	ANOA	Ác. naftoxiacético
Citoquininas	Kinetina (KIN)	6-furfurilaminopurina
	BAP (BA)	6-benzilaminopurina. 6-benziladenina
	2Ip	Isopentiladenina
	Zeatina (ZEA)	N-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina
	PBA	(6-benzilamino)-9-2-tetrahidropiranyl-9H-purina
Giberelinas	Tidiazurón (TDZ)	1-fenil-3(1,2,3-tidiazol-5il)urea
	Ac. Giberélico (GA ₃)	2,4a,7-trihidroxi-1-metil-8-metilen-gib-3-ene-1,10-ácido carboxílico-1,4-lactona
Inhibidores	ABA	Ácido abscísico
Etileno	Etileno	C ₂ H ₄
	Ethephon, Ethrel	Ácido 2-cloroetilfosfónico

3) Compuestos inorgánicos: (*sales minerales*): Sus funciones en un medio de cultivo pueden ser poco específicas (como el NaCl para ajustar la osmolaridad del medio) o pueden ser requeridas específicamente en el metabolismo (como las sales de K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, etc.).

3.1) Macronutrientes: son elementos esenciales que la planta los requiere en cantidades del orden de gramos/litro (C, H, N, O, S, Mg, Ca, K, P). Quizá los requerimientos minerales mas obvios son los de fósforo (necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos), de azufre (aminoácidos, cisteína y metionina) o nitrógeno (el segundo elemento tras el carbono entre los que forman la célula). Aunque se pueden utilizar fuentes orgánicas, es común usar

como fuente de fósforo un fosfato, la de azufre como un sulfato y la de nitrógeno como nitrato o una sal de amonio.

3.2) Micronutrientes (nutrientes necesarios en pequeñas cantidades) son elementos que la planta requiere en cantidades del orden de mg/litro (Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B): Son esenciales para el funcionamiento de varias enzimas, y deben estar incluidos en el medio de cultivo. Su requerimiento en muy baja cantidad determina que frecuentemente no sea necesario añadirlos expresamente: es suficiente su presencia como contaminantes de otros componentes. No obstante si se utilizan componentes y agua de pureza muy altas los medios de cultivo pueden ser deficientes en micronutrientes

ELEMENTO Y SÍMBOLO	FORMA PRINCIPAL EN EL QUE EL ELEMENTO ES ABSORBIDO	CONCENTRACIÓN USUAL EN PLANTAS SANAS	PRINCIPALES FUNCIONES
Macronutrientes			
Carbono (C)	CO ₂	~ 44%	Componentes de compuestos orgánicos
Oxígeno (O)	H ₂ O u O ₂	~ 44%	Componentes de compuestos orgánicos
Hidrógeno (H)	H ₂ O	~ 6%	Componentes de compuestos orgánicos
Nitrógeno (N)	NO ₃ ⁻ o NH ₄ ⁺	1 - 4%	Aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ADN, ARN, clorofila, coenzimas y polímeros de la pared celular.
Potasio (K)	K ⁺	0.5 - 6%	Enzimas, aminoácidos y síntesis proteica, apertura y cierre estomático, activador de muchas enzimas.
Calcio (Ca)	Ca ²⁺	0,2 -3,5 %	Calcio de las paredes celulares, cofactor enzimático, permeabilidad celular, etc.
Fósforo (P)	H ₂ PO ₂ ⁻ H ₂ PO ₄ ⁻²	0,1 – 0,8 %	Formación de compuestos fosfatados de alta energía (ADP y ATP), ácidos nucleicos, fosforilación de azúcares, fosfolípidos y coenzimas esenciales.
Magnesio (Mg)	Mg ²⁺	0,1 – 0,8 %	Parte de la molécula de clorofila. Activador de muchas enzimas. Presenta antagonismo con otros iones como calcio y potasio.
Azufre (S)	SO ₄ ⁻²	0,05 – 1 %	Elemento estructural en algunos

			aminoácidos y proteínas. Coenzima A.
--	--	--	---

ELEMENTO Y SÍMBOLO	FORMA PRINCIPAL EN EL QUE EL ELEMENTO ES ABSORBIDO	CONCENTRACIÓN USUAL EN PLANTAS SANAS	PRINCIPALES FUNCIONES
Micronutrientes			
Hierro (Fe)	Fe^{2+} o Fe^{3+}	25-300 ppm	Síntesis de clorofila, citocromo y nitrogenasa
Cloro (Cl)	Cl^{-}	100-10.000 ppm	Ósmosis y equilibrio iónico, relacionado con el desprendimiento de oxígeno en el fotosistema II.
Cobre (Cu)	Cu^{2+}	4-30 ppm	Activador de ciertas enzimas
Manganeso (Mg)	Mn^{2+}	15-800 ppm	Activador de ciertas enzimas. Actualmente se lo relaciona con la cadena de transporte de electrones (fotosistema II)
Zinc (Zn)	Zn^{2+}	15-100 ppm	Activador de ciertas enzimas. Íntimamente relacionado con la biosíntesis de auxinas
Molibdeno (Mo)	MoO_4^{2-}	0,1-5,9 ppm	Fijación del nitrógeno atmosférico y asimilación de nitratos, forma parte de ciertas proteínas
Boro (B)	BO_3^{-} $B_4O_7^{2-}$	5-75 ppm	Influencia en la utilización del calcio, facilita el transporte de azúcares, se lo relaciona con la síntesis de ácido giberélico.

Adaptado de: Biología de las plantas Vol 2 (Raven y otros., 1992)

4) Compuestos indefinidos: Cuando los requerimientos nutricionales son complejos o se pretende un crecimiento rápido, se utilizan mezclas de sustancias orgánicas. Las más comunes en la preparación de los medios de cultivo son el agua de coco, caseína hidrolizada y el extracto de levadura, que constituyen una fuente orgánica de nitrógeno. Sin embargo, también se pueden utilizar también fuentes de nitrógeno inorgánicas como amoníaco y sales de amonio.

4.1) Agua de coco: El agua de coco es un medio bastante complejo que contiene un rango amplio de compuestos orgánicos e inorgánicos. Se utiliza en el medio de “Knudson C” para la germinación asimbiótica de embriones de orquídeas *in vitro*; se usa en cantidades de 100 a 150 mg/L de medio de cultivo. Debe ser filtrado antes de su uso y se puede mantener en refrigeración.

4.2) Extractos de levadura: Es una fuente natural de vitaminas.

4.3) Caseína hidrolizada: Es una mezcla indefinida de proteínas que se utiliza en cultivo de tejidos como una fuente indefinida de nitrógeno orgánico. Es un ácido suave producido a través de la hidrólisis de la caseína, una proteína de la leche. Pese a que la caseína hidrolizada ha sido utilizada para aumentar el crecimiento y la proliferación, se han reportado casos donde ha generado un efecto negativo sobre la proliferación de brotes (Rache y Pacheco, 2009).

4.4) Agentes solidificantes (agar): Se añaden para preparar medios de cultivo sólidos y semisólidos. El agar-agar es el agente solidificante más utilizado. El agar-agar es un polisacárido de galactosa y galactomanano que se obtiene de las algas rojas (*Echema, Gelidium, Gracilaria*). Contiene un 70% de agarosa y un 30% de agarpectina. Su composición química es indefinida y solidifica con mayor dificultad a medida que desciende el pH. Es insoluble en agua fría, pero se funde y solubiliza en agua hirviendo y solidifica a 45 °C. Forma geles transparentes muy estables y es degradado por muy pocas bacterias.

Hay diferentes tipos de agares, Romberger y Tabor (1971) consideraron que a menor pureza, se pueden encontrar iones, polisacáridos sulfanados, ácidos grasos de cadena larga.

La concentración de agar en los medios de cultivo sólidos es variable y depende de la calidad, pero usualmente es de 0.7-1.5%. Los medios que tienen altas concentraciones de sales requieren de un porcentaje alto de agar. Dependiendo de la concentración del agar y el pH, será la dureza del medio. Cuando el medio es duro, el crecimiento del inóculo se hace muy lento. Por otro lado, diversos estudios señalan que concentraciones menores de 1 gL⁻¹, de agar son determinantes para inducir vitrificación (formación de hojas suculentas y frágiles) durante la micropropagación. Existen otras opciones de agentes solidificantes, pero algunos por sus características físicas, no endurecen o hierven a las temperaturas que se requieren para su empleo en el cultivo de tejidos, por ejemplo: La gelatina tiene su punto de ebullición a 25°C,

aproximadamente. Para el caso del cultivo de protoplastos, algunos autores han empleado alginatos que aunque tiene las ventajas de formar gel cuando se adiciona o se licua por la presencia de algún agente quelante o citrato de sodio. Presenta desventajas, como ser altamente termoinestable con los cationes bivalentes, ocasionado una eliminación de nutrientes (Button y Botha, 1975). Debido a la posibilidad que el agar influya sobre el crecimiento del tejido *in vitro*, actualmente se encuentra en el mercado diferentes tipos de agentes solidificantes que proporcionan un mayor número de opciones y posibilidades. Existen diferentes tipos de agar, diferentes productos comerciales e incluso suele encontrarse el mismo producto bajo diferentes nombres. La calidad del agar depende de varios factores, entre ellos, la época del año en que el alga ha sido colectada, el nivel de contaminantes, el proceso de manufactura y la manera en que el producto ha sido purificado. Cualquier nivel de impurezas en el agar puede tener efecto en la respuesta del vitrocultivo. Los diferentes de pureza del agar repercuten en su costo, factor a consideración en cualquier investigación u operación de producción.

Características del agar:

- se solidifica a 45°C;
- se torna líquido a la temperatura de ebullición del agua (100°C);
- es estable *in vitro* ya que no es degradado por enzimas vegetales;
- no reacciona con ninguno de los componentes del medio de cultivo;
- la concentración utilizada para hacer un medio semi-sólido es de 0.5 - 1% (peso/vol), o sea de 5-10 g/L (8 g/L es la recomendación general);
- la gelatinización del agar en el medio dependerá de dos factores: la marca del agar ya que a la misma concentración diferentes marcas de productos presentan diferentes niveles de dureza; el pH del medio, ya que a un pH más bajo el agar tiende a no gelatinizar muy bien.
- la dureza del medio puede afectar también la presión osmótica del medio. A medida que el nivel de agar se incrementa, también se incrementa el potencial hídrico del medio, reduciendo el crecimiento del cultivo.

El Agar, Bacto-agar, Difco-agar son agentes gelatinizadores derivados de algas marinas. Hay otros agentes gelatinizadores que no son a base de agar como el Gelrite o Phytigel que es también un polisacárido derivado en forma natural, producido por la fermentación de la bacteria *Pseudomonas Elodia*. El gelrite

(phytagel) aunque menos económico, tiene la ventaja de emplearse en cantidades menores (0.5 - 2.0g) y la característica de que al enfriarse es transparente, aspecto importante para la observación del material vegetal, durante la micropropagación. Por otra parte, es homogéneo y puro ya que no contiene compuestos fenólicos, no es afectado por la acidez del medio de cultivo. La desventaja del Gelrite es que puede contribuir al problema de vitrificación (las plantas se tornan de una apariencia vidriosa e hinchadas). El agargel es una mezcla de agar y phytagel, formulada para controlar este problema.

4.5) Carbón activado

Algunas plantas se caracterizan por liberar pigmentos oscuros después de un corte. Estos pigmentos son compuestos fenólicos y taninos que se oxidan y posteriormente dificultan el crecimiento y desarrollo del cultivo *in vitro*. El carbón activado es un compuesto antioxidante ya que contribuye a absorber esos compuestos fenólicos. Se adiciona en concentraciones cercanas al 0.1 - 3% (peso/vol).

El carbón activado se caracteriza por su gran capacidad de absorción de gases, vapores y sólidos coloidales de polaridad moderada. La adición de C* en los medios de cultivo podrá ser beneficiosa o adversa estando ello supeditado a los objetivos de investigación, mientras que sus efectos sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de tejidos dependerá del tipo de carbón activado utilizado, grado de activación y de la especie vegetal cultivada. (Pan y van Staden, 1998).

A fin de contrarrestar la acción de los compuestos fenólicos, existen otras alternativas como:

- a) el ácido cítrico que se puede utilizar en el medio o durante el proceso de preparación del material vegetal;
- b) el ácido ascórbico, que al igual que el ácido cítrico se puede utilizar en el medio o durante el proceso de preparación del material vegetal. El ácido cítrico y el ácido ascórbico se pueden utilizar solos o combinados. Si se los utiliza juntos como solución antioxidante durante la preparación de los explantes, se prepara una solución que contenga 150 mg/L de ácido cítrico y 100 mg/L de ácidoascórbico;

c) la cisteína adicionada al medio de cultivo

5) El pH

Es necesario ajustar el pH de la solución con el fin de lograr una correcta gelificación del medio y considerando que el pH también incide en la capacidad de absorción de sales minerales. En general el pH no debe ser inferior a 5,8 y es ajustado con ClH o NaOH 1N, luego de agregar todos los ingredientes excluido el agente gelificante. En ocasiones se agrega soluciones tampón (MES), debido a que la capacidad tamponante de los medios de cultivo es baja y los valores de pH decrecen con el autoclavado y, en muchos casos, se altera por la absorción de iones durante el cultivo y con la excreción de metabolitos del explanto.

Diseño, formulación y optimización de medios de cultivo

- *Diseño*: Es la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos.
- *Formulación*: Corresponde a los aspectos cuantitativos de los medios de cultivo. Establecer las combinaciones, proporciones o concentraciones de cada componente a ser utilizadas.
- *Optimización*: Consiste en encontrar la mejor formulación para lograr el objetivo propuesto (maximizar biomasa, producto metabólico, etc). Existen situaciones que requieren la optimización de los medios de cultivo como: limitaciones nutricionales, exceso de alguno de los componentes que pudieran inhibir el crecimiento, aplicación de fuentes nutricionales no convencionales, etc.

La metodología básica consiste en realizar experimentos, en los cuales se varía la concentración del componente a ensayar manteniéndose constante las concentraciones de los demás. Se analiza finalmente, el efecto de la variable escogida sobre la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa obtenida

Un diseño adecuado de los medios de cultivo permite optimizar la expresión celular debido a la síntesis de nuevos productos, el aumento en la producción de biomasa y/o mejora de la velocidad o el rendimiento de algún producto.

Para lograrlo, se debe tener en cuenta tanto los requerimientos nutricionales del material que se utiliza como la disponibilidad real de los componentes.

Modificación de la calidad nutricional del medio de cultivo producto de la esterilización:

Los nutrientes, además de estar presentes en el medio de cultivo, deben estar disueltos para asegurarnos que se encuentren disponibles para ser usados por la célula. Esta disponibilidad puede verse afectada por el proceso de esterilización (se debe considerar la temperatura, el tiempo, el pH del medio de cultivo y la agitación) y por reacciones entre componentes antes, durante y después de la esterilización.

Los cambios que se producen durante el proceso de esterilización pueden ser relevantes. Las modificaciones causadas pueden resultar beneficiosas o perjudiciales, dependiendo de las características del proceso de esterilización. Algunos de los componentes que son lábiles al calor y pueden descomponerse durante este proceso son: los aminoácidos, reguladores de crecimiento (PGR), las sales de amonio, los azúcares, etc. Tanto los aminoácidos como los PGR deben esterilizarse por filtración. Las sales de NH_4^+ se volatilizan, por lo que se deben autoclavar a $\text{pH} \leq 7$.

Los HPO_4 utilizados como fuente de P y buffer deben esterilizarse separados de las sales de Mg, con Na, K y NH_4 . Los PO_4 deben esterilizarse separadamente de las sales de Mg y NH_4^+ .

Los azúcares pueden descomponerse ya que hidroliza por la acción del calor, en presencia de sales inorgánicas y compuestos amínicos.

Los grupos carbonilos de los azúcares con los grupos amino de las proteínas, aminoácidos, etc., dan productos de condensación (reacción de Maillard), los cuales disminuyen significativamente las cantidades de carbohidratos y N amínico disponible.

Los carbohidratos se deben esterilizar por separado de los compuestos nitrogenados orgánicos.

PROCEDIMIENTOS PARA PREPARAR SOLUCIONES:

Procedimiento para preparar una solución madre de MS X 10

Materiales: Balanza analítica, vasos de precipitado y matraces, Erlenmeyer, frascos para almacenar soluciones, varillas de vidrio, refrigerador, agua bidestilada, drogas pro análisis

Procedimiento:

La solución salina de Murashige y Skoog (1962) se prepara de la siguiente manera:

Solución N°1: Macronutrientes y micronutrientes

1. En una probeta colocar 1000 ml de agua bidestilada.
2. Pesar, añadir y agitar hasta disolver (uno a uno), los siguientes compuestos:

Macronutrientes

NO_3NH_4	16,50 gr/l
NO_3K	19,00 gr/l
$\text{Cl}_2\text{Ca } 2\text{H}_2\text{O}$	4,40 gr/l
$\text{SO}_4\text{Mg } 7\text{H}_2\text{O}$	3,70 gr/l
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	1,70 gr/l

Micronutrientes

H_3BO_3	0,062 gr/l
$\text{SO}_4\text{Mn } 4\text{H}_2\text{O}$	0,223 gr/l
$\text{SO}_4\text{Zn } 4\text{H}_2\text{O}$	0,086 gr/l
IK	0,0083 gr/l
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025 gr/l
$\text{SO}_4\text{Cu } 6\text{H}_2\text{O}$	0,00025 gr/l
$\text{Cl}_2\text{Co } 6\text{H}_2\text{O}$	0,00025 gr/l

3. Envasar, rotular y colocar la solución en la heladera.

Solución N°2: Quelato de hierro.

1. Pesar 0,373 gr de Na₂ EDTA y disolver en 350 ml de agua bidestilada, con calor.
2. Pesar 0,278 gr de FeSO₄ 7H₂O y disolver en 350 ml de agua bidestilada, con calor.
3. Mezclar ambas soluciones y completar el litro.
4. Envasar en un frasco acaramelado, rotular y colocar la solución en la heladera.

Solución N°3: Vitaminas.

1. En una probeta colocar 1000 ml de agua bidestilada.
2. Pesar, añadir y agitar hasta disolver (uno a uno), las siguientes vitaminas:

Glicina 0,020 gr/l

Ac. Nicotínico 0,005 gr/l

Tiamina 0,001 gr/l

Piridoxina 0,005 gr/l

(El mio inositol se agrega directamente al preparar el medio de cultivo 1 gr/l)

3. Envasar, rotular y colocar la solución en la heladera.

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR REGULADORES DE CRECIMIENTO

Materiales: Balanza analítica, vasos de precipitado y matraces, Erlenmeyer, frascos para almacenar soluciones, varillas de vidrio, refrigerador, agua bidestilada, PGR (ANA-BAP), Solventes (dimetil sulfóxido, alcohol 96°)

AUXINAS: (ANA) Ácido Naftalén acético 20 ppm.

Procedimiento

1. Pesar 0,02 gr de ANA (se almacena en el freezer).
2. Disolver con algunas gotas de alcohol 96° o OHNa 1N.
3. Colocar 1000 ml de agua bidestilada en un Erlenmeyer y mezclar con el regulador.

4. Envasar, rotular y colocar la solución en la heladera.

CITOCININAS: (BAP) 6-benzilaminopurina 20 ppm.

Procedimiento

1. Pesar 0,02 gr de BAP (se almacena en el freezer).
2. Disolver con algunas gotas de dimetil sulfóxido (es necesario tener cuidado con el fuego, también es tóxico) o OHNa 1N.
3. Colocar 1000 ml de agua bidestilada en un Erlenmeyer y mezclar con el regulador.
4. Envasar, rotular y colocar la solución en la heladera.

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LOS MEDIOS DE CULTIVO

Materiales: Balanza analítica, vasos de precipitado, solución de macronutrientes y micronutrientes de MS, Solución de quelato de hierro, Solución de vitaminas de MS, varillas de vidrio, sacarosa, agar, agua bidestilada, Mio inositol, PGR (ANA-BAP), pH metro, OHNa 1N y HCl 1N, microondas, frascos de vidrio, papel de aluminio, bandas elásticas, autoclave

MEDIO DE AISLAMIENTO

Procedimiento:

1. Pesar en una balanza analítica 30 gr de azúcar y 7,5 gr de agar.
2. En un vaso de precipitados agregar 300 ml de agua bidestilada (PH 7) y la sacarosa (mezclar con una varilla de vidrio hasta disolverla completamente).
3. Agregar 400 ml de agua bidestilada y el agar.
4. Aforar a 1000 ml.
5. Cocinar el medio de cultivo en el microondas, durante 12 minutos aproximadamente en 4 períodos de 3 minutos cada uno (al finalizar cada período se mezcla con varilla de vidrio).
6. Una vez finalizada la cocción dispensar el medio de cultivo en frascos, taparlos con papel de aluminio y ajustar el papel al borde del frasco con una banda elástica.
7. Colocar los frascos dentro del autoclave (verificar que tenga agua suficiente) y autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.

MEDIO PARA INDUCIR LA PROLIFERACION DE BROTES ADVENTICIOS

Procedimiento.

1. Pesar en una balanza analítica 30 gr de sacarosa, 7,5 gr de agar y 0,1 gr de mio inositol.
2. En un Erlenmeyer de 1 litro agregar 300 ml de agua bidestilada (PH 7) y la sacarosa (mezclar con una varilla de vidrio hasta disolverla completamente).
3. Agregar 100 ml de la solución de macronutrientes y micronutrientes de MS, agitar; 100 ml de la solución de quelato de hierro, agitar y 100 ml de la solución de vitaminas de MS, agitar.
4. Incorporar el mio inositol.
5. Añadir los PGR, en este caso particular 1,5 ppm de BAP.
6. Aforar a 950 ml.
7. Ajustar el pH en 5.8 con gotas de OHNa 1N.
8. Agregar el agar, agitar.
9. Aforar a 1000 ml.
10. Cocinar el medio de cultivo en el microondas, durante 12 minutos aproximadamente en 4 períodos de 3 minutos cada uno (al finalizar cada período se mezcla con varilla de vidrio).
11. Una vez finalizada la cocción dispensar el medio de cultivo en frascos, taparlos con papel de aluminio y ajustar el papel al borde del frasco con una banda elástica.
12. Colocar los frascos dentro del autoclave (verificar que tenga agua suficiente) y autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.

MEDIO PARA INDUCIR LA PROLIFERACION DE EMBRIONES SOMATICOS

Procedimiento:

1. Pesar en una balanza analítica 30 gr de sacarosa, 7,5 gr de agar y 0,1 gr de mio inositol.
2. En un Erlenmeyer de 1 litro agregar 300 ml de agua bidestilada (PH 7) y la sacarosa (mezclar con una varilla de vidrio hasta disolverla completamente).
3. Agregar 100 ml de la solución de macronutrientes y micronutrientes de MS, agitar; 100 ml de la solución de quelato de hierro, agitar y 100 ml de la solución de vitaminas de MS, agitar.
4. Incorporar el mio inositol.

5. Añadir los PGR, en este caso particular 1,5 ppm de 2,4-D.
6. Aforar a 950 ml.
7. Ajustar el pH en 5.8 con gotas de OHNa 1N.
8. Agregar el agar, agitar.
9. Aforar a 1000 ml.
10. Cocinar el medio de cultivo en el microondas, durante 12 minutos aproximadamente en 4 períodos de 3 minutos cada uno (al finalizar cada período se mezcla con varilla de vidrio).
11. Una vez finalizada la cocción dispensar el medio de cultivo en frascos, taparlos con papel de aluminio y ajustar el papel al borde del frasco con una banda elástica.
12. Colocar los frascos dentro del autoclave (verificar que tenga agua suficiente) y autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.

MEDIO PARA INDUCIR EL ENRAIZAMIENTO

Procedimiento:

1. Pesar en una balanza analítica 30 gr de sacarosa, 7,5 gr de agar y 0,1 gr de mio inositol.
2. En un Erlenmeyer de 1 litro agregar 300 ml de agua bidestilada (PH 7) y la sacarosa (mezclar con una varilla de vidrio hasta disolverla completamente).
3. Agregar 50 ml de la solución de macronutrientes y micronutrientes de MS, agitar; 50 ml de la solución de quelato de hierro, agitar y 100 ml de la solución de vitaminas de MS, agitar.
4. Incorporar el mio inositol.
5. Aforar a 950 ml.
6. Ajustar el pH en 5.8 con gotas de OHNa 1N.
7. Agregar el agar, agitar.
8. Aforar a 1000 ml.
9. Cocinar el medio de cultivo en el microondas, durante 12 minutos aproximadamente en 4 períodos de 3 minutos cada uno (al finalizar cada período se mezcla con varilla de vidrio).

10. Una vez finalizada la cocción dispensar el medio de cultivo en frascos, taparlos con papel de aluminio y ajustar el papel al borde del frasco con una banda elástica.

11. Colocar los frascos dentro del autoclave (verificar que tenga agua suficiente) y autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.

MEDIO PARA INDUCIR LA PROLIFERACION DE CALLO

Procedimiento:

1. Pesar en una balanza analítica 30 gr de sacarosa, 6,5 gr de agar y 0,1 gr de mio inositol.

2. En un Erlenmeyer de 1 litro agregar 300 ml de agua bidestilada (PH 7) y la sacarosa (mezclar con una varilla de vidrio hasta disolverla completamente).

3. Agregar 100 ml de la solución de macronutrientes y micronutrientes de MS, agitar; 100 ml de la solución de quelato de hierro, agitar y 100 ml de la solución de vitaminas de MS, agitar.

4. Incorporar el mio inositol.

5. Añadir los PGR, en este caso particular 1,5 ppm de ANA.

6. Aforar a 950 ml.

7. Ajustar el pH en 5.8 con gotas de OHNa 1N.

8. Agregar el agar, agitar.

9. Aforar a 1000 ml.

10. Cocinar el medio de cultivo en el microondas, durante 12 minutos aproximadamente en 4 períodos de 3 minutos cada uno (al finalizar cada período se mezcla con varilla de vidrio).

11. Una vez finalizada la cocción dispensar el medio de cultivo en frascos, taparlos con papel de aluminio y ajustar el papel al borde del frasco con una banda elástica.

12. Colocar los frascos dentro del autoclave (verificar que tenga agua suficiente) y autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.

TABLA: Composición de tres medios básicos usados en el cultivo *in vitro* de tejidos. (Mroginski y otros., 2004)

COMPUESTOS	MS	N6	B5
NH ₄ NO ₃	1.650	-----	-----
KNO ₃	1.900	2.830	2.500
KH ₂ PO ₄	170	-----	400

CaCl ₂ .2H ₂ O	440	166	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	-----	463	134
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	250
NaH ₂ PO ₄ .4H ₂ O	-----	-----	150
KI	0,83	0,80	0,75
MnSO ₄ .H ₂ O	-----	-----	10,00
H ₃ BO ₃	6,20	1,60	3,00
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30	4,40	-----
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	1,50	2,00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	-----	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	-----	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	27,85	27,80
Na ₂ EDTA	37,30	37,25	37,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-----	0,025
Glicina	2,00	2,00	-----
Tiamina -HCl	0,10	1,00	10,00
Piridoxina -HCl	0,50	0,50	1,00
Ácido Nicotínico	0,50	0,50	1,00
Mioinositol	100,00	-----	100,00
Sacarosa	30.000,00	50.000,00	20.000,00
PH	5,7	5,8	5,5
1) Composición en mg·L ⁻¹ - 1. MS = Medio de Murashige y Skoog (<i>Physiol. Plant.</i> 15: 473 - 97.1962) N6 = Medio de Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., y Chu, C. (<i>Sci. Sinica</i> 18: 6 59- 668. 1975) B5 = Medio de Gamborg, O.L., Miller, R.A. y Ojima, K. (<i>Exp. Cell Res.</i> 50: 151 - 158. 1968)			

Bibliografía:

- Anderson, E. F. "The Biogeography, Ecology, and Taxonomy of Lophophora (Cactaceae)." *Brittonia* 21(4): 299-310, 1969.
- Bollard EG and Butler GW. Mineral nutrition of plants. *Annual Review of plant physiology* 7:17, 1956.
- Button, J., and Botha CEJ. Enzymic maceration of *Citrus* callus and the regeneration of plants from single cells. *J. Exp. Botany* 26 (94) 723-729, 1975.
- Clouse, S. D. y Sasse, J. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 49, p. 427-451, 1998.
- Clouse, S. D. Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. *The Plant J.*, vol. 10, p. 1-8, 1996.
- Clouse, S. D. Molecular genetic analysis of brassinosteroid action. *Physiol. Plant.*, vol. 100, p. 702-709 , 1997.

- Fujioka, S.; Noguchi, T.; Takatsuto, S. y Yoshida, S. Activity of brassinosteroid in the dwarf rice lamina inclination bioassay. *Phytochem.* Vol. 49, p. 1841–1848, 1998.
- Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., & Vasil, I. KPlant tissue culture media. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 12(7), 473-478, 1976.
- Gamborg, OL y JP Shyluk. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: Thorpe T.A (ed). *Tissue Culture: methods and applications in Agriculture*. Academic Press, Nueva York p21-44, 1981.
- González, R.H. y R.A.Parra Q. Cultivo in vitro de óvulos de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). IV Semana de Botánica. Esc. Nal. de Est. Profesionales, Iztacala. Los Reyes, Iztacala, Edo. de México. pag 13, 1989.
- Ikekawa, N., Zhao, Y. J. Application of 24-epibrassinolide in agriculture. En: *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications* Washington: American Chemical Society p. 280-291, 1991.
- Li SH; Huguet JG, Schoch OG y P. Orlando. Response of peach tree growth and cropping to soil water deficit at various phonological stages of fruit development. *J Hort Sci* 64: 541-552, 1989.
- Mazorra C. L. M. y C. M. Núñez. Estado actual sobre el conocimiento de la biosíntesis y los mecanismos moleculares de acción de los brasinoesteroides en las plantas revisión bibliográfica *Cultivos Tropicales* v.29 n.1. La Habana, 2008.
- Miller E. V. "Fisiología Vegetal" Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana, 344 páginas, 1967
- Mroginski, L; P. Sansberro y E. Flaschland. "Biotecnología y mejoramiento vegetal II". Parte I, Capítulo I, 2004
- Murashige, T., & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497, 1962.
- Nitsch, J.P. Hormonal factors in growth and development. En: *The Biochemistry of the Fruits and their Products*. Hulme, A.C. (ed). Academic Press. Londres. Pp. 427-472, 1970

- Nitsch, JP y Nitsch C. Auxin-dependent growth of excised *Heliantus tuberosus* tissues; 2: Organic nitrogenous compounds. *Amer J Bot* 44: 550-564, 1957.
- Parra Q y González, R.H. Cultivo in vitro de óvulos fertilizados de vainilla (*Vanilla Planifolia*). XII Congreso de Fitogenética, Soc. Mex. de Fitogenética, Chapingo, Méx. 23 p, 1988
- Pan, MJ and van Staden J. The use of charcoal in Vitro culture- A review. *Plant Growth Regulation* 26:155-163, 1998.
- Perea, M. & Tirado, A. 2011. Cultivo de tejidos in vitro. Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Rache LC y J Pacheco M. Micropropagation of *Espeletiopsis muiska* (Cuatrecasas), 'frailejon' from Rancheria Natural Park-Boyaca, Colombia. *Open Journal Systems*. Universidad Nacional de Colombia, 2009.
- Raven. *Biología de las Plantas*. New York. Ed. Reverte, 1992
- Romberger JA y Tabor CA. The *Picea abies* shoots apical meristem in culture: Agar and autoclaving effects. *Amer. J. Bot* 58:131-140, 1971.
- Steward F. C. and S. M. Caplin. A Tissue Culture from Potato Tuber: The Synergistic Action of 2,4-D and of Coconut Milk. *Science* 4: 518-520, 1951
- Suzuki, H.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Murofushi, N. y Sakurai, A. Biosynthesis of brassinosteroids in seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* and *Oryza sativa*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 51: 168-172, 1995.
- Thom M; Marezky , A; Kornor E y WS Sakai. Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 1: 3-34, 1981.

CAPÍTULO 4

LA INCUBADORA

CONDICIONES AMBIENTALES DE CULTIVO Y ASEPSIA

Sebastián Pariani

Los cultivos introducidos *in vitro* deben ser incubados en ambientes donde se controla la temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperiodo, humedad atmosférica e higiene. Estas condiciones se logran con el empleo de cámaras climatizadas o cuartos especialmente preparados con aire acondicionado (frío-calor), una buena y uniforme circulación de aire en el interior, dotados de un buen sistema para interrumpir la iluminación en caso de no funcionar el aire acondicionado (Mroginski y *otros.*, 2004) (Ver Capítulo 2).

En general, los cultivos son incubados a temperatura constante de 25-28 °C, con ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas. La luz es generalmente provista por lámparas fluorescentes del tipo «luz-día» con una irradiancia de entre 50 y 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación. La humedad atmosférica debe ser elevada (80-90%) (Roca y Mroginski, 1991; Mroginski y *otros.*, 2004).

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se lo puede estimar en alrededor del 10%. En el

mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican. Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias.

Dos son las fuentes de contaminaciones: a) Microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los explantes y b) fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio. La correcta detección de estas fuentes y del tipo de microorganismo son aspectos importantes para el éxito de los cultivos, pues por un lado ayuda a determinar la fuente de contaminación y por otro lado, ayuda a la planificación de los procedimientos para controlarlos. Varios géneros de bacterias (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*) y de hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Neurospora*) están frecuentemente en los cultivos. Es conveniente inspeccionar visualmente con la ayuda de un microscopio estereoscópico los cultivos en forma periódica (por lo menos semanalmente). También se pueden realizar pruebas con medios de cultivo diferenciales y «test» bioquímicos específicos (Mroginski y otros., 2004).

Para evitar y/o minimizar las contaminaciones de los cultivos con microorganismos es necesario:

- 1) Conocer el material vegetal con que se trabaja y los posibles contaminantes específicos.

- 2) Realizar una adecuada preparación de la planta dadora de explantes, cultivándola preferentemente en invernaderos tratadas con productos químicos que eliminen patógenos y eventuales microorganismos endófitos.

- 3) Proceder a la desinfección superficial de los explantes mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos con el menor daño posible para el explantes. Si bien no es posible recomendar un

procedimiento general, se puede señalar que el procedimiento más popularizado consiste en una doble desinfección mediante la inmersión de los explantes en etanol (70%v/v) durante 20-60 segundos seguido de hipoclorito de sodio 1 - 3%, contenido en el agua de lavandina comercial, durante 3 a 30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explantes. Algunos procedimientos se basan en el empleo de únicamente etanol o de hipoclorito de sodio. Finalmente, es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua destilada estéril.

En este último punto hay que aconsejar que se utilice agua destilada estéril de reciente preparación, dado que está demostrado que el almacenaje prolongado del agua estéril puede ser la causa de contaminaciones con bacterias. Es aconsejable realizar estas operaciones de desinfección superficial en una cámara de transferencia con aire estéril. En lugar del hipoclorito de sodio se puede utilizar hipoclorito de calcio (6 -12 %) o el cloruro de mercurio (0,1-1,5%). Es preciso recomendar extrema cautela con el empleo de este último compuesto, dado que es altamente tóxico y además no es removido con facilidad del explante. En los casos en que no se utilice etanol, la adición de agentes tensoactivos junto con el desinfectante es una práctica recomendada. Entre los más usados figuran Tween-20 (0,01– 0,1%) o unas gotas de Tritón. El lavado previo de los explantes con agua corriente y detergentes, ayuda a una mejor desinfección. La inmersión de los explantes en soluciones conteniendo sustancias antibióticas y /o antimicóticas (gentamicina, sulfato de estreptomina, ampicilina, tetraciclina, carbenicilina, sulfato de gentamicina, pentacloronitrobenzeno, rifampicina, anfotericina B, benomil, carbendazim) puede ser de utilidad, pero deben ser utilizados en casos excepcionales. Estos productos tienen el inconveniente de que alteran la composición de los medios de cultivo y además pueden ser metabolizados por los explantes. En los casos en que se utilicen plántulas crecidas *in vitro* como plantas dadoras de explantes, es necesario desinfectar las semillas para su cultivo y germinación y luego es aconsejable desinfectar también las plántulas resultantes. En algunos materiales vegetales se utiliza la preincubación de los explantes mediante lo cual estos son desinfectados suavemente y precultivados durante 24

horas en un medio conteniendo sacarosa, y finalmente son desinfectados nuevamente y cultivados.

4) Emplear medios e instrumentos de cultivo esterilizados, es decir, liberados completamente de cualquier microorganismo vivo o esporas. Para la esterilización, en la mayoría de los casos se hace uso del calor en sus diversas formas: llama directa, calor húmedo (en forma de vapor abierto o bajo presión), calor seco (aire caliente). Se pueden usar hornos a microondas. El agua caliente también puede ser usada. En el caso de sustancias termolábiles, la esterilización se puede hacer mediante filtración a través de filtros bacteriológicos. No es posible recomendar ningún sistema de esterilización dado que la exitosa destrucción de los microorganismos depende de múltiples factores entre los que interesan el tamaño del recipiente, el tiempo de esterilización y la naturaleza de la sustancia a esterilizar. Sin embargo, se pueden dar algunas sugerencias:

- La esterilización en estufas mediante calor seco (aire caliente) es recomendable para esterilizar recipientes de vidrios secos (pipetas, cápsulas de Petri, tubos). En estos casos, 2-4 horas en estufas a 180-200 °C brindan excelentes resultados.

- La esterilización con calor húmedo con vapor bajo presión en autoclave o en una «olla a presión» (Fig. 1), es el procedimiento más empleado para la esterilización de los medios de cultivo (salvo, como se indicó más arriba, para aquellos que posean componentes termolábiles). En este caso, lo más común es usar una presión de $1.46 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 20 minutos, con lo que prácticamente se destruyen todas las formas de vida. Es importante que en todos los puntos del autoclave se alcance dicha temperatura, para lo cual hay disponibles cintas detectoras colorimétricas.

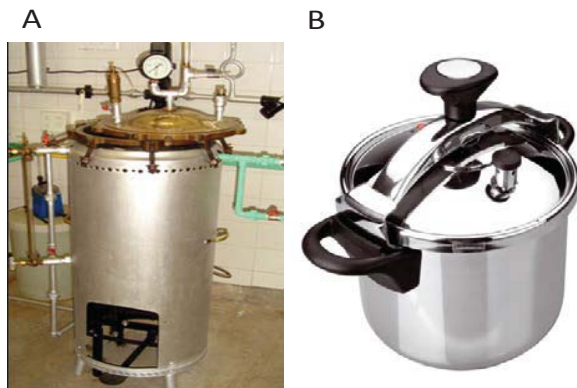


Figura 1. Instrumental utilizado para la eliminación de microorganismos. A: Autoclave. B: Olla a presión.

5) Cultivar los explantos en una cámara de transferencia con aire estéril comúnmente llamado gabinete de flujo laminar (Fig. 2), localizada en un ambiente limpio y no expuesta a corrientes de aire. De no disponer este equipamiento, se pueden sustituir con cuartos esterilizados previamente con luz ultravioleta (nunca exponerse a la luz UV en forma directa). La mesada de trabajo y las paredes del gabinete deben ser desinfectadas previamente con etanol al 70%. De la misma manera deben ser desinfectados exteriormente todos los recipientes (conteniendo medios de cultivo, agua, etc.) que ingresen en el área del aire estéril. Los operarios constituyen frecuentemente una importante fuente primaria de contaminación, por lo que es recomendable que, antes de comenzar a trabajar laven sus manos y antebrazos con abundante agua y jabón y se desinfecten con etanol al 70 %. La utilización de guardapolvos, guantes y máscaras protectoras de la boca y de la nariz, así como los gorros protectores de los cabellos, ayudan a reducir sensiblemente los niveles de contaminación. Los instrumentos de trabajo (pinzas, pipetas, tijeras, agujas, cápsulas de Petri) deben ser esterilizados antes de su uso. Muchos de estos instrumentos pueden ser colocados en etanol al 95% y, antes de ser usados, se deben flamear cuidadosamente en la llama de un mechero. También es necesario flamear la boca de los recipientes que contienen los medios de cultivo antes y después de cultivar el explante.

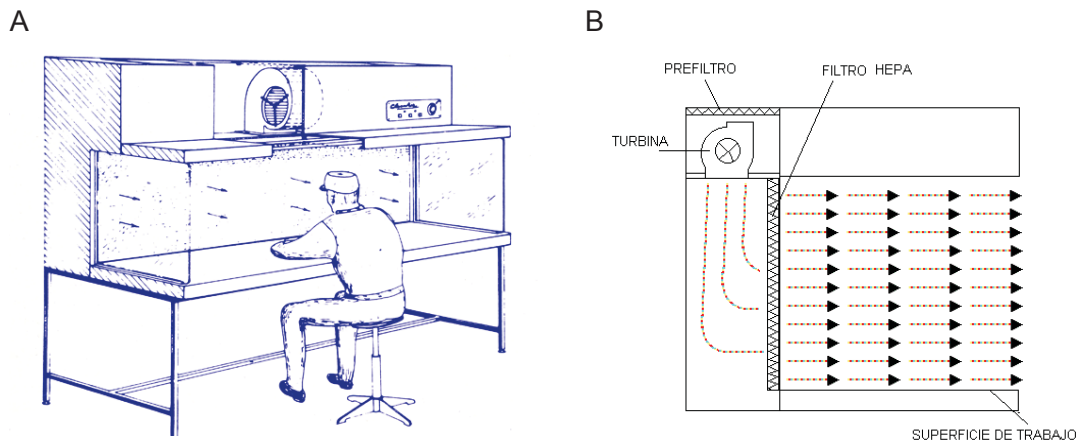


Figura 2. A. Gabinete de flujo laminar. B. Esquema de una cabina de flujo laminar horizontal. Fuente: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/2013/203024/leccin_211_consideraciones_bscas_para_el_establecimiento_o_planeacin_de_un_laboratorio_de_cultivo_de_tejidos_vegetales.html

6) Incubar los cultivos en cámaras o cuartos de cultivo, cerrados, libres de corrientes de aire y bien higienizados. En lo posible se debe restringir la circulación de personas, y los recipientes con cultivos contaminados deben ser rápidamente eliminados de este sector. Es conveniente que antes del lavado, estos cultivos sean esterilizados. (Mroginski y otros., 2004)

En resumen, recomendaciones para evitar la contaminación:

- Lavado del material
- Secado en estufa
- Uso de UV
- Etanol y desinfectantes
- Evitar las corrientes de aire y la circulación de personas
- Los instrumentos de trabajo deben ser esterilizados
- Uso de mechero
- Desinfección de superficie del explanto.
- Cabina de flujo laminar: área de trabajo, mantenida estéril por el flujo continuo, no turbulento de aire estéril.

- La esterilización de medios, de herramientas (bisturí, pinzas, agujas de disección, etc.) como de vidriería y agua, se realiza en autoclave y en términos generales se lleva a cabo con presiones de 1.0 a 1.2 Kg/cm² a temperatura de 120 °C y durante 20 a 40 minutos.
- Algunos medios pueden incluir sustancias inestables a altas temperaturas (antibióticos, giberelinas, algunas vitaminas, zeatina, etc.), que por tal razón no deben ser sometidas al proceso de autoclavado.
- En este caso se aconseja la esterilización del medio en autoclave y los productos termolábiles deben ser esterilizados por medio de filtración (Oviedo de Cristaldo, 2011)
- Uso de guardapolvo, guantes, cofia, barbijo por parte del operador y lavado de manos y brazos, enjuagados con ETOH 70 antes de cada sesión de trabajo (Fig.3)

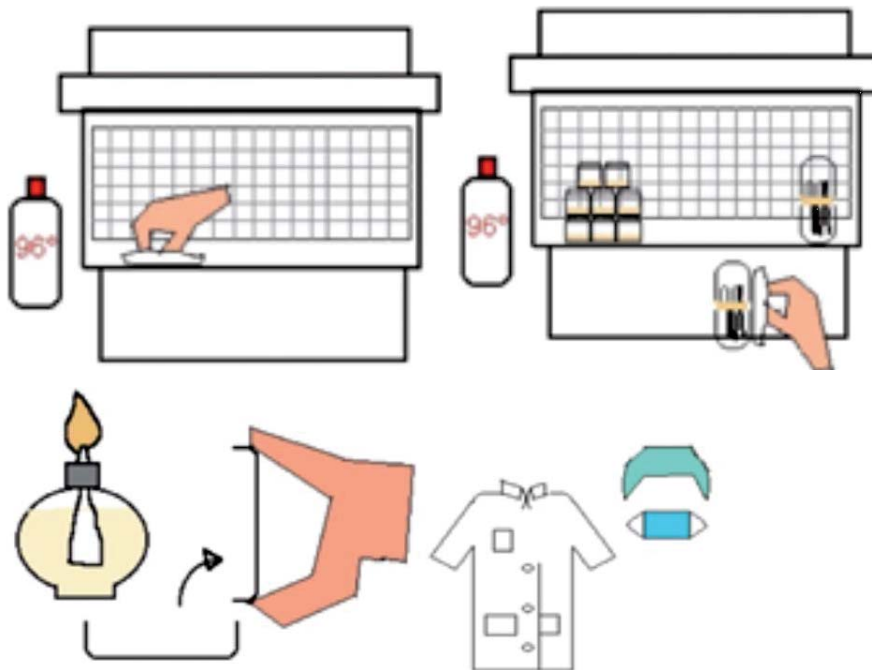


Figura 3. Algunas recomendaciones para evitar la contaminación. Fuente: Oviedo de Cristaldo, 2011. Conjunto de estudios de caso sobre Biotecnologías simples, sostenibles y de bajo costo para la agricultura familiar

Bibliografía

- Mroginski, L; Sansberro, P; Flaschland, E. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L .eds.). Ediciones INTA. pag. 35-42.
- Oviedo de Cristaldo, R, M. 2014. Micropropagación. En: Conjunto de estudios de caso sobre Biotecnologías simples, sostenibles y de bajo costo para la agricultura familiar. Ed. Sharry, S. Fundación REDBIO Internacional-ProDiversitas.
- Roca, W. M y *Mroginski*, L.A. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas. (Roca, W. M.; Mroginski, L. A. eds.). CIAT. Cali. pag. 19- 40.

CAPITULO 5

¿POR DÓNDE EMPEZAMOS?

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS *IN VITRO*- PLANTAS MADRES. EXPLANTES

Marina Adema

Introducción

Actualmente, en todo cultivo de tejidos vegetales pueden identificarse distintas etapas o fases bien definidas, cada una con sus objetivos específicos (Ver también capítulo 9 de Micropropagación).

- Fase 0: Selección y preparación de la planta madre/donante.
- Fase 1: Establecimiento de los cultivos axénicos.
- Fase 2: Multiplicación del material.
- Fase 3: Enraizamiento y obtención de plantas completas.
- Fase 4: Aclimatación y rusticación de las plantas obtenidas (Jiménez E. 1998)

Dos de ellas son comunes a todos los protocolos seguidos, son las Fase 0 o preparativa y la Fase I también llamada de establecimiento o iniciación de los cultivos y son las que desarrollaremos en este capítulo.

Fase 0: preparativa

Pérez (1998) indica que inicialmente, esta fase fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban comúnmente en la fase I (Debergh y Maene, 1981). Sin embargo, en la actualidad existe un consenso que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de trabajo eficiente y repetible, por lo que cada vez se le va prestando mayor atención. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético. En esta fase es necesario tener en cuenta:

- Selección de las plantas donantes

La iniciación de todo proceso de cultivo de tejidos sólo tiene sentido cuando se emplea un material de partida adecuado. La constitución genética de la planta donante es el primer factor a evaluar. Para la mayoría de las plantas propagadas *in vitro*, el material inicial es una planta élite seleccionada por características fenotípicas especiales.

- Estado fisiológico de la planta donante

Es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas con diferente edad fisiológica (Villalobos y Thorpe, 1991). Generalmente, se utilizan plantas en estado de crecimiento activo: vigoroso y sano.

Precisamente para uniformar el estado fisiológico de las plantas donantes, o sea de los explantes, es que se incluyen en esta etapa una serie de pretratamientos:

- La selección y crecimiento de la planta madre bajo condiciones higiénicas reduce notablemente los contaminantes, principalmente fúngicos. La mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* provienen de la planta madre. Si se logra establecer un explante axénico, la contaminación posterior será debida a fallas en la técnica o procedimiento. Es por esta razón que siempre es más

recomendable diagnosticar y tratar las plantas donantes, donde es mucho más fácil detectar los contaminantes.

- Crecimiento de las plantas en ambientes controlados: el impacto de la fase 0 no está limitado solamente al aspecto sanitario de los explantes sino también a la supervivencia de los mismos. Una práctica común para uniformar el estado fisiológico de los explantes es cultivar las plantas donantes en ambientes controlados (luz, temperatura y humedad relativa) con niveles óptimos para cada especie en particular.

- Pueden aplicarse además pretratamientos con reguladores de crecimiento a las plantas donantes, así como también a los explantes mismos. Especies leñosas suele utilizarse como pretratamiento la inmersión de los explantes en soluciones con citocininas a fin de inducir la brotación de yemas (Olmos y *otros.*, 2004).

Fase 1: establecimiento de los cultivos axénicos

Esta etapa consiste básicamente en la elección del explante (parte separada del vegetal ya sea células, protoplastos, tejidos u órgano) y la desinfección del mismo para iniciar un cultivo axénico (Roca y Mroginski, 1991).

Los explantes más utilizados para iniciar la propagación clonal *in vitro* de una planta son las yemas apicales del vástago, estacas uninodales portando yemas axilares, discos de hoja, secciones de raíz y meristemas. La Fig.1 muestra un esquema del procedimiento en la obtención de tejidos de la calidad necesaria para servir como explantes iniciales.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede iniciarse a partir de diferentes órganos o tejidos, siendo de gran importancia en la posterior respuesta del explante: su tamaño, tipo y época de recolección.

Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos y Garcia, 1982).

Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas (Olmos y otros., 2004).

Se recomienda coleccionar explantes a campo durante la estación primaveral y estival cuando existe brotación activa de las yemas. Esto se relaciona con el balance hormonal endógeno que poseen esas yemas al iniciarse su cultivo. Poco antes de la brotación ha desaparecido la mayor parte de los inhibidores, sobre todo ácido abscísico (ABA), que se forma al iniciarse el otoño, existiendo predominancia de los promotores, tales como auxinas y citocininas.

En las regiones donde existe estacionalidad marcada, se ha observado cierta respuesta diferencial de los cultivos *in vitro* a su contaminación, siendo más alta en otoño e invierno.

El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que a mayor tamaño del explante son mayores las probabilidades de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración directa de órganos (Mroginski y otros., 2004).

Desinfección del explante

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana (Alvarado, 1998). Hoy en día la contaminación es uno de los principales y más severos problemas para los micropropagadores de plantas en el mundo, es un fenómeno multicausal que debe tenerse en cuenta desde la concepción misma de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Factores tan disímiles como el diseño arquitectónico de los locales de trabajo, la procedencia y edad del explante inicial, la higiene ambiental o la

habilidad y preparación técnica de los operarios, entre otros, pueden favorecer o controlar la incidencia de contaminantes microbianos.

Como contaminantes frecuentes en el cultivo *in vitro* se mencionan a los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras. Muchos no son conocidos por provocar daños a las plantas en el campo y sin embargo se convierten en patógenos *in vitro* (Cassells, 1991). Su efecto negativo sobre las plantas puede ser considerable si tenemos en cuenta que compiten con ellas por los nutrientes del medio y les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de cultivo de metabolitos tóxicos. De esta forma pueden reducir los coeficientes de multiplicación, inhibir el enraizamiento y ocasionar la muerte de la planta (Leifert y otros., 1994).

Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantes son desinfectados superficialmente. El procedimiento para la desinfección superficial debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes. No es factible recomendar un procedimiento general para este propósito y se deben considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explante.

Los explantes provenientes de vegetales que crecen en invernáculo o en cuartos climatizados son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo. También es más fácil la desinfección de explantes o de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de material adulto.

La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70%, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio con gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad (Olmos y otros., 2004).

Los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl₂). Los tres primeros se emplean en concentraciones de 1 a 3 % en tiempos de 10 a 20 minutos. El bicloruro de mercurio es el de mayor

toxicidad y se emplea en dosis bajas y corto tiempo (0.1% durante 1 a 3 minutos) (Jiménez E. 1998).

Terminado el tiempo de desinfección se realizan varios enjuagues con agua destilada estéril en cámara de transferencia para eliminar los restos de los agentes químicos. Es aconsejable lavar los explantes con un volumen por lo menos 10 a 20 veces mayor de agua estéril, haciendo un mínimo de 3 enjuagues sucesivos (Roca y Mroginski, 1991).

Como se mencionó anteriormente el éxito de los sistemas de propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana, por lo tanto es necesario establecer cultivos asépticos, esto implica:

- 1- trabajar en ambientes adecuados
- 2- esterilizar los medios de cultivo (autoclave)
- 3- desinfectar superficialmente los explantes, para eliminar bacterias y hongos exógenos (como se explicó anteriormente)
- 4- realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia.

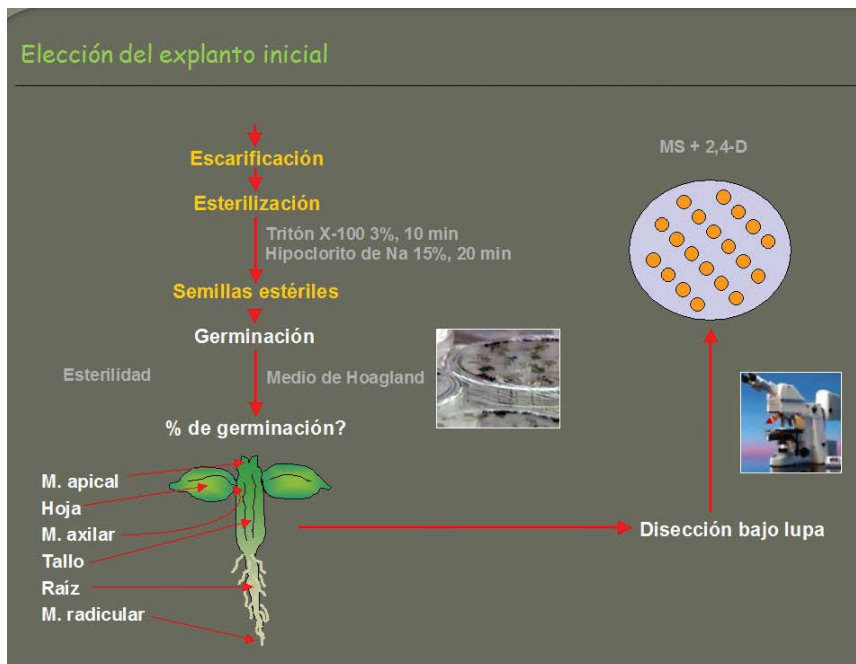


Fig.1 Elección del explante. Cualquier tejido u órgano vegetal puede ser usado como explante iniciador del cultivo *in vitro*. Fuente: Modificado de PPoint Agrobiotecnología, FBMC.FCEN.UBA.http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/2011_2%20Cultivo%20de%20Tejidos%20I.pdf/view

Parte Práctica

Microproagación de malva rosa (*Pelargonium graveolens*) Basado en el protocolo de Sharry y Abedini (2000)

Objetivos

- Aprender las diferentes técnicas de acondicionamiento y desinfección de explantes utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales
- Realizar un cultivo de explantes bajo condiciones de asepsia.

Materiales

- etanol 70 %
- hipoclorito de sodio (lavandina)
- Tween 20 (agente humectante)
- agitadores magnéticos, matraces, mecheros
- agua bidestilada, previamente autoclavada*
- tubos de ensayo, frascos, cajas de Petri, previamente autoclavados*
- pinzas, escalpelos
- campana de flujo laminar
- medio de cultivo, previamente autoclavados*
- explantes

* El material de vidrio a usar durante la siembra y los medios de cultivo deben ser esterilizados en autoclave a 1,05 kg/cm² y 120 °C durante 20 minutos, para eliminar los microorganismos (bacterias y hongos).

Metodología

1. Tipo de explante:

Se utilizarán como explantes segmentos de tallo (secciones nodales e internodales) y hojas obtenidos de plantas madre de *Pelargonium graveolens*, que crecen en condiciones de invernáculo en la ciudad de La Plata.

2. Elección, acondicionamiento y desinfección de los explantes

Para su acondicionamiento los explantes serán tratados en superficie con fungicida (Benlate 1500 ppm) y ácido ascórbico durante 2 horas. La desinfección de las secciones nodales e internodales se realizará con etanol (70%) durante 1 minuto, peróxido de hidrógeno (5 vol.) 3 minutos, hipoclorito de sodio comercial (40%) durante 50 minutos y luego, se lavarán tres veces con agua destilada estéril. Las hojas serán desinfectadas con etanol (70%) durante 1 minuto, hipoclorito de sodio comercial (30%) durante 30 minutos y luego, se lavarán tres veces con agua destilada estéril. Los explantes desinfectados se cortarán con bisturí en segmentos de aproximadamente 1 cm de largo, en el caso de las secciones de tallo y las hojas en superficies de 1 a 1.5 cm² incluyendo la zona de la nervadura central y parte del pecíolo. A continuación los explantes están en condiciones de ser sembrados en medio de cultivo de aislamiento (ver capítulo 3 de Medios de Cultivo).

3. Trabajo en condiciones de asepsia

A - Uso de la campana de flujo laminar

- encender la luz y el flujo de aire. Dejar que circule alrededor de 15 minutos antes de comenzar el trabajo
- atomizar la superficie de trabajo y los materiales con etanol 70 % (excepto los filtros)
- encender los mecheros
- rociarse las manos con alcohol al 70 % y dejarlas secar

- manipular los explantes lo menos posible

B - Siembra de explantes

- enjuagar los explantes 2 a 3 veces con agua bidestilada estéril
- colocar los explantes desinfectados y enjuagados en una caja de Petri estéril
- sumergir las pinzas y escalpelos en etanol y luego flamearlos en el mechero
- con la ayuda de estos instrumentos, sembrar los explantes en los tubos de ensayo o recipientes que contengan el medio nutritivo estéril (medio de aislamiento). Tapar.

C - Condiciones de cultivo

- incubar los diferentes cultivos bajo temperatura constante (25° C +/- 2° C), con una intensidad lumínica de 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Se puede también incubar en oscuridad, dependiendo los requerimientos del explante y de la respuesta buscada.

4. Observaciones

- revisar periódicamente para detectar contaminación
- controlar las respuestas de los explantes.

Bibliografía:

- Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas. En: J. N. Pérez, (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba.pag. 81–104.
- Cassells, A. 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. Micropropagation: Technology and application. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. Ed. By P. Debergh, R. Zimmerman.pag. 31-44.

- Debergh, P. C y Maene, L. 1981. A scheme for comercial propagation of ornamental plants by tissue culture, *Scientia Hort.* 14. Pag.335-345.
- Jiménez E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. Propagación y mejoramiento genética de plantas por Biotecnología. Volumen I. Cuba. pag. 13 – 55.
- Leifert, C.; Morris E. C. y Waites Will M. 1994. “Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue and field grown plant: Reasons for contaminations problems *in vitro*”. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13(2): pag. 139-183.
- Mroginski, L; Sansberro, P; Flaschland, E. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L .eds.). Ediciones INTA. pag. 35-42.
- Olmos, S; Luciani, G y Galdeano, E. 2004. Micropropagación. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L .eds.). Ediciones INTA. pag. 163-172.
- Pérez N. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Ediciones GEO. Cuba. 400 pag.
- Roca, W. M y Mroginski, L.A. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas*. (Roca, W. M.; Mrogrinski, L. A. eds.). CIAT. Cali. pag. 19- 40.
- Sharry S. y Abedini W. 1998. Micropropagación de *Pelargonium graveolens* L’Herit “malva rosa”. *Revista Horticultura Argentina*17 : 51-59 Publicada en el año 2000
- Villalobos, V.M y Garcia, V.A.1982. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos. *Agrociencia* 48 pag 107-118
- Villalobos, V. M. y Thorpe, T. A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura*.

Fundamentos y aplicaciones prácticas. (Roca, W. M.; Mrogrinski, L. A. eds.). CIAT. pag. 127-141.

CAPÍTULO 6

¿CÓMO SE FORMAN LAS NUEVAS PLANTAS *IN VITRO*?

MORFOGÉNESIS *IN VITRO*. ORGANOGÉNESIS. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Blanca Villarreal

Se denomina *morfogénesis* a los cambios morfológicos que ocurren, como resultado de cambios estructurales y/o de organización durante el desarrollo de un organismo. En este sentido la totipotencia de las células vegetales permite inducir la formación de estructuras y órganos *de novo*. Por lo tanto, la *morfogénesis in vitro* consiste en la obtención de órganos o embriones a partir de un explante.

La *organogénesis* consiste en la formación de *novo* de órganos (raíces y/o brotes adventicios) a partir de explantes cultivados *in vitro* (Torrey, 1966). La *embriogénesis somática*, en tanto, consiste en la formación de embriones a partir de células somáticas, las que al germinar dan origen a individuos completos (Tokin, 1964). Una yema y un embrión somático se distinguen por sus diferencias morfológicas. La yema es una estructura monopolar, que desarrolla una conexión con el tejido vascular preexistente disperso en el callo o el explante cultivado. Un embrión es una estructura bipolar que no posee conexión vascular con el tejido del callo o explante. Estas estructuras se generan, en ambos casos, a partir de células somáticas y se pueden producir directa o indirectamente. Se le denomina entonces, *morfogénesis directa* o *indirecta*, descrita por primera vez por Hicks en 1980. El *modo directo* consiste en la multiplicación de plantas mediante proliferación de brotes axilares o la formación de embriones somáticos directamente desde los tejidos del explante. Según George (1983) es el método de micropropagación que asegura estabilidad genética del material obtenido. El

modo indirecto de regeneración consiste en el establecimiento de un explante en un medio de cultivo, la subsecuente proliferación celular a través de la formación de un callo o del cultivo en suspensión y la posterior formación de brotes adventicios o pro-embriones somáticos (Woodward, 1997).

Por lo tanto, cuando se establece un explante *in vitro*, el crecimiento puede ser *indiferenciado* o *diferenciado*. El primero genera una masa de células no diferenciadas en activa división cuyo conjunto forma un **callo**, mediante un mecanismo análogo a la cicatrización de heridas o cuando se forman tumores inducidos por organismos fitopatógenos como *Agrobacterium tumefaciens*. El segundo deviene en la formación de tejidos que dan lugar a brotes, raíces o embriones (Barba Alvarez, 1987).

La morfogénesis se produce en tres fases análogas (De Klerk, 1997):

- 1) Desdiferenciación, fase durante la cual el tejido se transforma de manera de responder al estímulo que dispara el inicio del proceso de organogénesis/embriogénesis,
- 2) Inducción, fase en la que las células reciben el estímulo morfogénico en condiciones específicas de concentración y combinación de reguladores del crecimiento (Radice, 2004)
- 3) Morfogénesis propiamente dicha, fase en la que las células sufren las sucesivas divisiones que conducen a la formación de un órgano o un embrión.

No todas las células de un explante tienen capacidad organogénica o embriogénica, denominándose a aquellas que tienen esta capacidad "*células competentes*".

Skoog y Miller 1957, propusieron que todo proceso de diferenciación está regulado por el balance entre auxinas y citocininas. En forma muy sintética, la hipótesis sugiere que para que se formen raíces, en el balance hormonal deben prevalecer las auxinas, mientras que las citocininas, conducirán a la formación del vástago de la planta (Caso, 1988). Además, la manipulación del medio de cultivo y de las condiciones ambientales conduce a que las células competentes muestren su capacidad intrínseca para el desarrollo organizado, que es el reflejo

de una activación selectiva de genes. Esta activación se manifiesta a través de cambios bioquímicos, biofísicos, fisiológicos y estructurales del tejido cultivado *in vitro* (Brown y Thorpe, 1986). La regulación molecular de este complejo proceso está siendo conocida recién ahora, pero resulta evidente que se encuentran involucrados diferentes factores como:

A- Características de la planta madre y el explanto

- Genotipo
- Edad
- Sanidad
- Condición fisiológica

B- Medio de cultivo

- Elección del medio de cultivo
- pH
- Fuentes de N
- Reguladores de crecimiento

Vías de regeneración de plantas *in vitro*

La regeneración de plantas por CTV se puede realizar por propagación de brotes preformados (yemas axilares o terminales) o induciendo estructuras adventicias. Esta última vía tiene dos rutas morfogénicas implicadas en la diferenciación *de novo* de brotes y/o plantas completas, tal como se explicó anteriormente: la organogénesis o la embriogénesis.

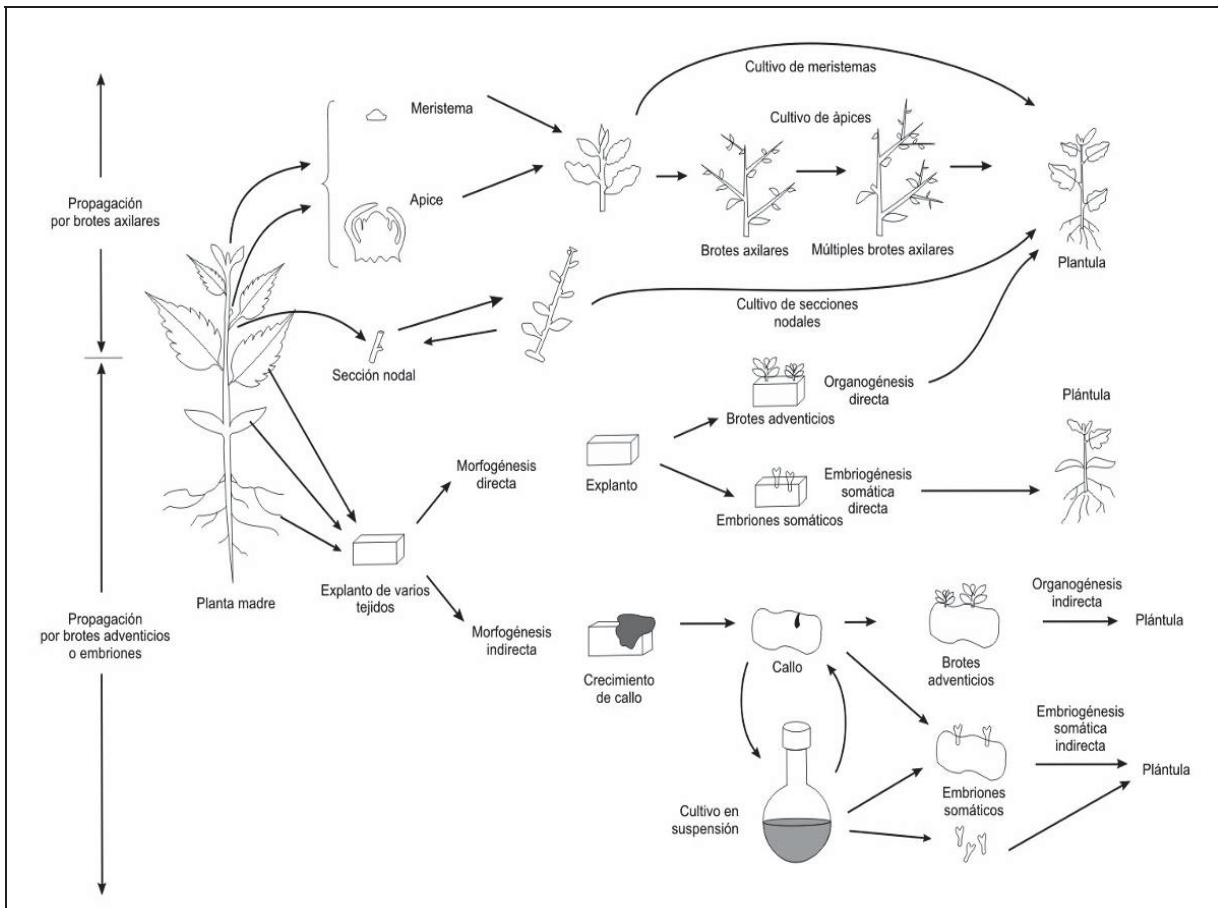


Figura 1. Vías de regeneración de plantas por CTV. Fuente: (Modificado de <http://omega.ilce.edu.mx:3000/>)

Organogénesis

La organogénesis *in vitro* puede ser a través de meristemas preexistentes (directa) (a) o mediante la formación de órganos *de novo* (directa o indirecta) (b o c).

a) La propagación de brotes preformados consiste en la multiplicación de plantas a partir de yemas axilares preexistentes y no es más que la aceleración *in vitro* del crecimiento de los meristemas. En este caso, las condiciones *in vitro* estimulan el desarrollo de las yemas axilares, permitiendo la formación de una planta por cada yema. La eficiencia de este sistema estriba en que el número de plantas obtenidas está determinado por el número de yemas axilares preexistentes en el inóculo; por otro lado, el sistema presenta la ventaja de que los individuos regenerados muestran una gran estabilidad genética.

b) También es posible obtener la formación de yemas *de novo* a partir de tejido no meristemático, mediante organogénesis directa; éstas se originan de una célula o un pequeño grupo de ellas, cuando se cultivan explantes en medios con elevadas concentraciones de citocininas.

c) Por último, la propagación por organogénesis indirecta ocurre cuando primeramente se origina un callo y a partir de él se diferencian órganos. En la organogénesis indirecta los callos pueden formar brotes y raíces. La capacidad morfogénica o competencia de estos callos está en función del balance de reguladores de crecimiento adicionado al medio de cultivo (Woodward, 1997).

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática, como se dijo anteriormente, es la capacidad que poseen ciertas células vegetales de formar embriones por un proceso semejante a la embriogénesis cigótica. Esto no sucede únicamente en cultivos *in vitro*, ya que es relativamente frecuente en algunas familias de plantas, fenómeno conocido como apomixis (Radice, 2004).

Los embriones somáticos tienen, al igual que los cigóticos, la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia que la embriogénesis somática es un proceso asexual por lo que la nueva planta supuestamente tendrá un genotipo idéntico al de la célula que le dio origen.

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*, la directa y la indirecta. En la embriogénesis somática directa, los embriones aparecen directamente sobre el explante original. En la embriogénesis somática indirecta, los embriones se originan a partir de un callo o a partir de una suspensión de células embriogénicas (Perez Molphe y otros., 1999).

Durante la embriogénesis los embriones somáticos pasan por una serie de estadios intermedios denominados globular, de corazón y de torpedo que son similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica (Radice, 2004). En las dicotiledóneas al embrión somático maduro se le da el nombre de estadio cotiledonar. La última etapa es la de la *germinación*, que consiste en la elongación y reactivación metabólica del embrión somático que madura para convertirse en una plántula. Estos embriones somáticos carecen de tejidos de reserva, por ello su germinación sólo ocurre *in vitro* en donde el medio de

cultivo es el que aporta los nutrientes, o bien cuando se les proporciona depósitos artificiales de nutrientes como sucede en las semillas artificiales (Vits y otros., 1994).

Parte Práctica

1. Tipo de explanto

Se utilizarán como explantos segmentos de tallo (secciones nodales e internodales) y hojas obtenidos de plantas madre de *Pelargonium graveolens*, que han superado la Fase 1 de establecimiento de cultivos axénicos (ver capítulo 5), que fueron sembrados en medio de cultivo de aislamiento (ver capítulo 3-Medios de Cultivo).

2. Trabajo en condiciones de asepsia

Uso de la campana de flujo laminar (ver capítulo 4 y 5).

3. Líneas de trabajo

- A- Organogénesis directa:** utilizar el medio de cultivo para inducir la proliferación de brotes adventicios (ver capítulo 3. Medios de cultivo) (Medio: MS completo + PGR: 1,5ppm de BAP)

Condiciones de cultivo: la temperatura se mantendrá constante ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), la intensidad lumínica será de $60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y el fotoperíodo de 16hs de luz/8hs de oscuridad.

Transcurridas tres semanas, los explantes se subcultivarán a un medio de cultivo con los macro y micronutrientes de MS a la mitad de su concentración y sin reguladores de crecimiento.

- B- Organogénesis indirecta:** utilizar el medio de cultivo para inducir la proliferación de callo (ver capítulo 3. Medios de cultivo) (Medio: MS completo + PGR: 1,5ppm de ANA.)

Condiciones de cultivo: la temperatura se mantendrá constante (25° C +/- 2° C) y los explantos se incubarán en oscuridad.

Transcurridas tres semanas, se subcultivarán al medio de proliferación de brotes adventicios. Una vez obtenidos los brotes se utilizará un medio MS a la mitad de su concentración libre de reguladores de crecimiento.

- C- Embriogénesis somática:** utilizar el medio de cultivo para inducir la proliferación de embriones somáticos (ver capítulo 3. Medios de cultivo). (Medio: MS completo + PGR: 1,5 ppm de 2,4-D)

Condiciones de cultivo: la temperatura se mantendrá constante (25° C +/- 2° C) y los explantos se incubarán en oscuridad.

Transcurridas tres semanas, se subcultivarán a un medio de cultivo con los macro y micronutrientes de MS a la mitad de su concentración y sin reguladores de crecimiento.

Observación y cuantificación de los procedimientos del CTV

General

1. Grado de contaminación. Tipo de contaminación: porcentaje de explantos con contaminación visible.
2. Oxidación. Necrosis: porcentaje de explantos afectados.
3. Desdiferenciación/callos: número de explantos que tienen desdiferenciación.
4. Neoformación de órganos (brotes/raíces): número de explantos con brotes/raíces.
5. Tiempos/períodos: cuando? Subcultivos.
6. Observación con lupa/Análisis microscópico.

Organogénesis directa (Proliferación de brotes)

- Tipo de explanto. Reguladores de crecimiento. Condiciones de cultivo. Lugar del explanto y/o tejido de origen.

- ☛ Porcentaje de explantos que respondieron en cada medio de cultivo.
- ☛ Promedio de brotes axilares por explanto.
- ☛ Presencia de callo organogénico en la base de cada explanto.
- ☛ Número de nudos por brote adventicio.
- ☛ Determinación de la eficiencia del sistema:
 - ☛ número promedio de brotes por explanto.
 - ☛ porcentaje de explantos que presentan brotes.
 - ☛ CBF (Capacidad de Formación de brotes).

$$\text{CFB} = \frac{\text{promedio de brotes por explanto} \times \% \text{ de explantos con brotes}}{100}$$

- ☛ Largo de brotes.
- ☛ Grado de diferenciación de los brotes.
- ☛ Fenotipo.
- ☛ Vitrificación.
- ☛ Número de brotes que forman plantas completas (conversión). Porcentaje de supervivencia. Fenotipo.
- ☛ Análisis microscópico: organización tisular.
- ☛ TIEMPOS

Organogénesis indirecta (Proliferación de callo)

- ☛ Lugar del explanto donde comienza la formación de callo.
- ☛ Apariencia: acuosa, compacto, seco, nodular, friable.
- ☛ Color: blanco, amarillento, pardo, verde.
- ☛ Tipos: morfogénico (embriogénico, organogénico), no morfogénico.
- ☛ Tipos celulares (microscopio).
- ☛ Grado de diferenciación celular: elementos traqueales.
- ☛ Tasa de crecimiento: Incremento de peso fresco, peso seco.

- ☛ Habitación.

Friabilidad: tendencia de las células a separarse unas de otras, por lo que el callo se disgrega fácilmente (aparición seca, compacto, coloración amarillo-blanquecina)

Embriogénesis somática (Proliferación de embriones somáticos)

- ☛ Estadio de desarrollo de los embriones (*dicotiledóneas*: globular, corazón, torpedo, cotiledonar; *monocotiledóneas*: globular, coleoptilar, escutelar)
- ☛ Cantidad de embriones por peso /explanto/superficie
- ☛ Microscopio: organización tisular, no conexión vacular con tejido madre, estructuras polares.
- ☛ Marcadores moleculares del proceso de embriogénesis.
- ☛ Porcentaje de germinación.
- ☛ Porcentaje de conversión a planta completa.
- ☛ Poliembrionía.
- ☛ Embriogénesis cíclica.
- ☛ Aberraciones.
- ☛ TIEMPOS

Bibliografía

- Barba Alvarez, A. 1978 .Cultivo de callos. En: Cultivo de Tejidos vegetales, Hurtado D. Y Merino M. Ed. Trillas, Méjico: 93-100.
- Brown, D. C. W. & T. A. Thorpe. 1986. Plant regeneration by organogenesis. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants Vol. 3. Academic Press, The Netherlands
- Caso O. 1988. Curso: Micropropagación de especies vegetales. UBA.
- Caso, O. H. 1992. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. Agriscientia 9 (1): 5-16.

- De Klerk, G.J., Arnholdt-Schmitt, B., Lieberei, R. & Neumann, K.H. 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* 39:53-66.
- George, E. 1983. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics. Part 1. 574 pp.
- Hicks G.S. 1980. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *The Botanical Review* 46(1): 1-23
- Hicks G. 1994. Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. *in vitro Cell Dev. Biol.* 30: 10-15.
- Vuylsteke, D. and E. De Langhe, 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. *Trop Agric (Trinidad)*. 62:323-328.
- Perez Molphe, E.; Ramírez, M. R.; Gordon, N. H Y Ochoa, A. N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Univ. Autónoma de Aguascalientes. México: 180 pp
- Radice S. 2004. Morfogénesis *in vitro*. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Editores: Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubinstein, Ing. Agr. Luis Mroginski. Parte II, Capitulo I.pp 26-33
- Skoog, F., and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.
- Tokin, B.P. 1964. Regeneration and somatic embryogenesis. In *Regeneration and wound-healing-Symp. biol.hung.III,(1963)*, p.11-45.
- Torrey, J.G. 1966. The initiation of organized development in plants. *Adv. Morphog* 5:39-91.
- Vits L, De Boulle K, Reyniers E, Handig I, Darby JK, Oostra B, Willems PJ (1994) Apparent regression of the CGG repeat in FMR1 to an allele of normal size. *Hum Genet* 94:523–526
- Woodward, B.1997. Micropropagation. En: *Advanced tissue culture course*. UNESCO/BAC BETCEN, Biotechnology Division ACR- Roodeplaat. Pretoria. p. 186.
- Woodward A. And Bartel B.2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735, 2005
- <http://omega.ilce.edu.mx:3000/>

CAPÍTULO 7

NO SIEMPRE SALE TODO BIEN...

PROBLEMAS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Noelia Nikoloff

En el cultivo de tejidos *in vitro* pueden presentarse algunos problemas dependiendo del cultivo o de la variedad con la que se trabaje. Uno de los principales problemas cuando se trata de establecer los cultivos es la **contaminación** de los mismos con diversos tipos de microorganismos (Mroginski, y *otros.*, 2010) (Ver capítulo 4). Por definición, un contaminante es cualquier microorganismo introducido en un cultivo o medio de cultivo. Las principales causas de contaminación son: microorganismos presentes en el interior o en el exterior de los explantes y las fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio (Mroginski, y *otros.*, 2010). Se denominan “vitropatogenos” a los contaminantes más frecuentes que aparecen en condiciones *in vitro*. El término “vitropatogeno” es empleado para aquellos organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas a campo, pero sí lo son para las células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*. Estos contaminantes son los responsables de ocasionar la muerte del tejido debido a que pueden modificar el pH, competir por los nutrientes y modificar el medio de cultivo (Cassells, 2012).

En el capítulo 4 hemos explicado los distintos tipos de contaminantes y las diferentes alternativas para evitarlos y/o minimizarlos en los cultivos *in vitro*. Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, otra opción posible para evitar la contaminación se basa en el hecho conocido de que los meristemas vegetales están libres de contaminantes endógenos, por lo tanto, el cultivo de meristemas *in vitro* permite, en gran cantidad de casos, el establecimiento de cultivos libres de patógenos.

Otro problema común en los cultivos *in vitro* es la llamada **Oxidación o Ennegrecimiento** que se manifiesta como un oscurecimiento del tejido vegetal y se puede definir como la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, generando daño, inhibición del crecimiento y en los casos graves incluso la necrosis y muerte del tejido (Amiot y *otros.*, 1996, Bray y *otros.*, 2000). Este problema es común en varias especies, especialmente en las leñosas. La oxidación está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células cultivadas *in vitro* provocando la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos (Azofeifa, 2009). Los estresores en los cultivos *in vitro* se relacionan principalmente con el efecto abrasivo causado por los agentes desinfectantes en la asepsia del explante, los cortes del explante, los cambios en el pH, la composición del medio de cultivo, como así también el volumen y la calidad del frasco de cultivo (Van Staden y *otros.* 2006). En la práctica existen varias estrategias para eludir los procesos de oxidación, cabe aclarar que un único método no siempre es suficiente, todo depende de la complejidad del problema. Entre las mismas podemos enumerar las siguientes: 1) usar explantes en estado juvenil o en crecimiento activo; 2) disminuir la intensidad de la luz de cultivo; 3)

disminuir la temperatura de cultivo; 4) realizar subcultivos con frecuencia; 5) cultivar el explante en medio líquido; 6) agregar antioxidantes al medio de cultivo; 7) disminuir el pH del medio de cultivo; 8) agregar adsorbentes como carbón activado al medio de cultivo; 9) disminuir la duración de la esterilización del explante o cambiar el agente desinfectante; 10) incrementar las sales de calcio; 11) reducir los niveles de nitrato (D'Silva y D'Souza, 1993; George, 1996; Harikrishnan, y otros., 1997; Aliyu, 2005).

La **Vitrificación o Hiperhidricidad** es otro de los inconvenientes con el que nos podemos encontrar cuando realizamos la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*, es el fenómeno por el cual los brotes toman aspecto vítreo y transparente, observándose turgencia y fragilidad en hojas y tallos (George y otros., 1984; Ziv, 1993). Se caracteriza por ser un proceso de morfogénesis anormal con desordenes fisiológicos (mayor absorción de agua, menor contenido de clorofila, menor capacidad fotosintética, hipolignificación), anatómicos (epidermis y cutículas delgadas, grandes espacios intercelulares, menor desarrollo del sistema vascular, estomas anormales y escasos, ausencia de parénquima en empalizada) y morfológicos (entrenudos cortos, color anormal, arrosetamiento, hojas más gruesas elongadas y arrugadas, tallos de mayor diámetro) en condiciones de cultivo *in vitro*. Este fenómeno está regulado principalmente por dos factores que son la humedad relativa y el potencial de agua afectando a la fotosíntesis y a la transpiración (Olmos y otros., 2010). Las causas por las que se produce la vitrificación se deben a las condiciones adversas bajo las cuales se desarrollan los cultivos, ya sea excesiva humedad, factores nutricionales, baja intensidad

lumínica, uso de recipientes herméticos que afectan el intercambio gaseoso, altas concentraciones de citocininas, carbohidratos y minerales. Por otra parte, la consecuencia principal de este fenómeno es la baja supervivencia de las plántulas obtenida durante la aclimatación *ex vitro*. Para superar este problema se han propuesto una serie de posibles soluciones como son: el empleo de frascos con filtro para incrementar el intercambio gaseoso y la aireación evitando contaminaciones secundarias (Maene y Deberg, 1987), la remoción de la fuente de carbohidratos del medio de cultivo, la defoliación de las plántulas para estimular la formación de hojas nuevas y por consiguiente la fotosíntesis y otras actividades metabólicas (Ziv y otros., 1990), el uso de retardantes de crecimiento para estimular la formación de hojas nuevas después del trasplante (Ziv, 1989), el empleo de altos niveles de CO₂ (antagonista del etileno) para estabilizar la vía de lignificación y prevenir la vitrificación por medio de la inhibición de la formación de aerénquima y de la hiperhidratación (Kozai y otros., 1987). Todas estas soluciones aportan mejoras y ventajas que permiten a las plantas propagadas *in vitro* atravesar las distintas etapas del cultivo en las mejores condiciones morfológicas, fisiológicas y funcionales posibles.

Otro de los problemas comunes es la **Falta de Respuesta** del cultivo. Existen diversos factores que influyen en este tipo de inconveniente como son: a) el genotipo de la célula, el cual es conservado fielmente, pero hay mecanismos reguladores de la información genética que causan que la morfogénesis sea inactiva y se pierda por completo durante el subcultivo, esto genera diferencias en la regeneración de plantas. A su vez, esta diversidad de respuesta entre los

distintos taxa pueden reflejarse en los requerimientos nutricionales y hormonales necesarios para la diferenciación; b) los efectos en la posición y la competencia, ya que existen fuertes diferencias entre célula y célula y entre diferentes tipos de órganos en cuanto a capacidad de regeneración en cultivo de tejidos *in vitro*; c) la polaridad del explante relacionado a la proliferación celular y/o morfogénesis; d) las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad y fase gaseosa). Una alternativa para prevenir y/o solucionar este problema es considerar las condiciones bajo las cuales se desarrolla el cultivo, como la temperatura, humedad, intensidad y calidad de luz, el tipo y forma del frasco de cultivo y la densidad de explantes. Por otra parte, otro tipo de falta de respuesta está relacionada con el fenómeno de habituación, se denomina así a la habilidad adquirida después de varios subcultivos por una población de células para crecer y dividirse, independientemente del agregado exógeno de reguladores de crecimiento que en un principio eran de uso obligatorio, por consiguiente, estas células son denominadas autónomas.

La **Variabilidad**, es la presencia de plantas anormales provenientes de cultivo de tejido *in vitro*. Algunos autores opinan que este fenómeno puede ser consecuencia de la alta frecuencia de división celular que tiene lugar en los cultivos *in vitro*, mientras que otros la asocian a causas de estrés (Calva Calva y Pérez Vargas, 2005). La identificación de los factores de estrés asociados a la aparición de plantas fuera de tipo es entonces fundamental para identificar en forma temprana estos tejidos en el laboratorio y eliminarlos, de manera que se

reduzca la presencia de plantas indeseables en las fases de aclimatación y rusticación.

Teniendo en cuenta los aspectos planteados de los diferentes problemas que podemos encontrar al practicar técnicas de cultivo de tejido *in vitro* debemos destacar que lamentablemente no son los únicos. Existen **Otro tipo de problemas** que no están específicamente caracterizados y no por ello son de índole menor. Las técnicas de cultivo de tejido *in vitro* implican una gran cantidad de variables, algunas de las cuales son aún desconocidas y es por eso que a veces los resultados que fueron alcanzados fácilmente en un laboratorio, no son reproducibles en otro. La falta de reproducibilidad de los protocolos descritos en la literatura es uno de los problemas más comunes encontrados en la práctica, ya que dependen de las condiciones locales de cada laboratorio. Más aún, las rutinas establecidas a pequeña escala en general son modificadas para conseguir resultados exitosos a gran escala, pero estos cambios, por ejemplo en métodos de preparación de medios de cultivo, uso de diferentes tipos de envases y de diferentes cámaras de cultivo, entre otros, quizá afecten significativamente la técnica dando resultados negativos.

La siguiente tabla resume problemas comúnmente encontrados en la práctica, sus posibles causas y soluciones:

SÍNTOMA	POSIBLES CAUSAS	POSIBLES RESPUESTAS
Muerte del explante	Desinfección fuerte Medio de cultivo muy fuerte Equivocado estado de desarrollo	Ajustar los tiempos y concentraciones Utilizar a ½ o ¼ Obtener explantos a diferentes estados de desarrollo
Necrosis	Contaminación Exudado "Bleeding" Problemas con el agar Problemas con el	Descartar con cuidado. Revisar la técnica de esterilización Transferir inmediatamente. Subcultivar más

	agua Formula equivocada	frecuentemente Probar diferentes fuentes de agar, o gelificantes. Controlar la pureza del agua. Probar diferentes fórmulas
Brotes muy largos y baja tasa de multiplicación	Poca concentración de citocininas	Aumentar concentración de citocininas Utilizar la grilla citocinas/auxinas
Brotes demasiado cortos	¹ PGR muy fuertes	Disminuir u omitir los ¹ PGR
No multiplicación	Baja concentración de citocininas Necesita vernalización Mucho frío Requiere período de dormancia	Aumentar la concentración de citocininas Almacenar a baja temperatura por 4-8 semanas Utilizar la grilla cit/aux Aumentar la temperatura Tratamiento con frío 3-4 semanas
Tallos gruesos, hojas pequeñas, pálidas	Demasiada citocinina	Disminuir las citocininas
Formación de callo no buscada	¹ PGR equivocados Exceso de auxinas	Disminuir u omitir los ¹ PGR Utilizar la grilla cit/aux
Hojas cloróticas	Contaminantes endógenos Alta temperatura Fórmula equivocada	Index para contaminación Disminuir temperatura Probar diferentes medios
Vitrificación, hojas succulentas	Potencial osmótico desordenado Alta concentración de citocininas Agar equivocado Cultivos muy	Disminuir la temperatura Aumentar la concentración de agar Disminuir los ¹ PGR Probar otro agente gelificante Subcultivar más

	viejos	seguido
Enraizamiento prematuro	Balance de ¹ PGR equivocado	Utilizar la grilla cit/aux Subcultivar Aumentar las citocininas y disminuir las auxinas
Tallos rojos	Estrés Demasiada azúcar No demasiado NO ₃ Cultivo muy viejo	Cambiar la intensidad de luz o modificar la temperatura Disminuir el contenido de azúcar Aumentar el nitrato Subcultivar más frecuentemente

¹PGR: Hormonas vegetales y reguladores de crecimiento: son compuestos orgánicos, no nutrientes, sintetizados por la planta, que actúan en muy baja concentración y que desencadenan diversas respuestas fisiológicas. Existen sustancias sintéticas, con similares características, a las que se denominan reguladores de crecimiento. Los reguladores vegetales de crecimiento son utilizados en concentraciones del orden de partes por millón

Bibliografía

- Aliyu, O. 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. African Journal of Biotechnology 4: 1485-1489.
- Amiot, M; Forget, F; Goupy, P. 1996. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. Herba-Polonica 42: 237-247.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía mesoamericana 20(1): 153-175.
- Bray, E; Bailey-Serres, J; Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. *In*: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and

- molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. pp. 1158-1203.
- Calva Calva, G; Pérez Vargas, J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria, 6: 1067-6079.
 - Cassells, A C. 2012. Pathogen and Biological Contamination Management in Plant Tissue Culture: Phytopathogens, Vitro Pathogens, and Vitro Pests. Plant Cell Culture Protocols Methods in Molecular Biology 877: 57-80.
 - D'Silva, I; D'Souza, L. 1993. Controlling contamination and browning of *in vitro* cultures of cashew. Journal of Plantation Crops 21: 22-29.
 - De Bartolini, B C; Lallana, V H. 1995. Términos comúnmente usados en cultivo de tejidos. Oro Verde, Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos, pp. 23.
 - George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England, pp. 1361.
 - George, E. y Sherrington, P D. 1984. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics, Basingstoke, pp. 709.
 - Harikrishnan, K; Martin, K; Anand, P; Hariharan, M. 1997. Micropropagation of sweet flag (*Acorus calamus*) a medicinal plant. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 19: 427-429.
 - Kozai, T; Iwanami, Y y Fujiwara, K. 1987. Effect of CO₂ enrichment on the plantlet growth during the multiplication stage. Plant Tissue Culture Letters 4:22-26.
 - Maene, L y Debergh, P. 1987. Optimalisation of the transfer of tissue cultured shoots to *in vivo* conditions. Acta Horticulturae 212:335-348.
 - Mroginski, L; Sansberro, P y Flaschland, E. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Parte I: Herramientas Básicas. Capítulo 1 Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Buenos Aires, Argentina, pp. 17-25.

- Olmos, S; Luciani G y Galdeano, E. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Capítulo 1 Micropropagación. Buenos Aires, Argentina, pp. 353-362.
- Van Staden, J; Fennell, C; Taylor, N. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-62.
- Ziv M. 1989. Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17: 101-110.
- Ziv, M, Lilien-Kipnis, H. 1990. Gladiolus. In: Ammirato, P.V., Evan, D.A., Sharp, W.R., Bajaj, Y.P.S. (Eds.), *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 5. McGraw-Hill, New York, pp. 461–478.
- Ziv M, 1993. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En *Micropropagation*. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 45-92.

CAPÍTULO 8

MICROPROPAGACION: LA TÉCNICA DE “FOTOCOPIADO” DE PLANTAS

ETAPAS. ESTABLECIMIENTO DE PLANTAS A CONDICIONES DE CAMPO

María Valentina Briones

Introducción:

La micropropagación constituye la principal aplicación comercial del Cultivo de Tejidos Vegetales. Consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de Cultivo de Tejidos. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación limitada (Olmos y otros, 2004). Se realiza bajo estrictas condiciones de esterilidad, en un medio sintético nutritivo y con el control de temperatura, luz y fotoperíodo (http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/2011_2%20Cultivo%20de%20Tejidos%20I.pdf/view)

La Micropropagación presenta numerosas ventajas, entre las que podemos mencionar:

- Propagación vegetativa rápida y a gran escala
- Uniformidad seleccionada del material clonado
- Multiplicación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales
- Reducción en el tiempo de multiplicación y el espacio requerido para tal fin
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado
- Introducción rápida de nuevos cultivares
- Conservación de germoplasma
- Facilidades para el intercambio internacional del material vegetal.

(Villalobos y Thorpe, 1991)

La micropropagación consta de etapas o fases

La regeneración de plantas *in vitro* presenta cinco etapas principales:

- Etapa 0: **Preparación del material vegetal.**

Involucra la selección y preparación de la planta madre dadora de explantos (planta madre/donante) (Ver capítulo 5).

- Etapa 1: **Establecimiento del cultivo.**

Se inicia el cultivo *in vitro* con la introducción de los explantos en el medio de cultivo en condiciones de esterilidad (Ver capítulo 5).

- Etapa 2: **Multiplicación.**

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Es importante señalar que en esta etapa, cualquiera sea la vía de regeneración, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantos (Olmos y otros, 2004).

- Etapa 3: **Enraizamiento y obtención de plantas completas**

En esta etapa se produce la formación de raíces. En las especies herbáceas es relativamente fácil, mientras que en las especies leñosas es complicado por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (auxinas) para promover la rizogénesis. Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que sólo contenga auxinas. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. Medios con baja concentración salina, como el WPM (Lloyd y Mccown, 1980) y GD

(Gresshoff y Doy, 1972), incrementan el porcentaje de enraizamiento de vástagos auxiliares en plantas latifoliadas. Los vástagos de buen tamaño provenientes de la etapa de multiplicación y provistos de al menos 4-5 yemas, se colocan durante determinado período en soluciones con concentraciones de auxinas. La auxina más utilizada es el IBA (ácido 3-indolbutírico), que puede utilizarse a concentraciones de 1-10 μM durante pocas horas. Alternativamente se puede emplear niveles más bajos de auxinas, pero manteniendo la inducción por un período más prolongado (3 a 7 días). Luego los vástagos se transfieren a un medio de cultivo basal desprovisto de reguladores de crecimiento para permitir el desarrollo de las raíces.

El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Bajo condiciones *ex vitro* se usan diferentes sustratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales deben estar debidamente esterilizados. Con este método es necesario que los brotes tengan las hojas bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse.

- Etapa 4: **Aclimatación y rusticación de las plantas micropropagadas**

La micropropagación ha sido utilizada para la multiplicación rápida y masiva de muchas especies vegetales. Sin embargo, en muchos casos, su uso se ve restringido por el alto porcentaje de pérdidas o daños en el momento en que las plantas son transferidas a condiciones *ex vitro* (invernadero o campo).

Durante el cultivo *in vitro*, las plantas crecen bajo condiciones muy especiales: envases casi totalmente cerrados, donde la humedad relativa es alta, y la irradiancia es más baja que en cultivos tradicionales. El uso de envases sellados, con el objeto de prevenir contaminaciones, evita la turbulencia de aire, condicionando el flujo de CO_2 y el intercambio gaseoso con el medio ambiente. Las plántulas tienen generalmente estomas «perezosos» para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación. Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada.

La incorporación de glúcidos al medio de cultivo como fuente de carbono y energía, aumenta el riesgo de contaminación con hongos y bacterias. Los medios son suplementados usualmente con reguladores de crecimiento. Estas condiciones resultan en la formación de plantas con morfología, anatomía y fisiología anormal.

Después de la transferencia de las condiciones de *in vitro* a *ex vitro*, las plántulas tienen que corregir estas anomalías (Fig. 1). En invernadero, y especialmente en el campo, la irradiancia es mucho mayor y la humedad del aire mucho más baja que dentro de los envases de vidrio.

Muchas plantas mueren durante este período, por lo tanto, después del pasaje a condiciones *ex vitro*, las plantas usualmente necesitan un período de aclimatización, donde se tiene en cuenta la humedad, irradiancia, temperatura, concentración de CO₂ y flujo de aire (Altman y Loberant, 1998).

Durante la aclimatización pueden diferenciarse dos períodos: un período de adaptación con poco crecimiento de los brotes y baja formación de raíces, seguido de un período de rápido crecimiento de raíces y parte aérea (Pospíšilová y otros. 1999).



Fig. 1: Condiciones fisiológicas de las plantas al salir de *in vitro*. Fuente: <http://gasurossy.blogspot.com.ar/>

Las características más importantes de cualquier sustrato para cultivos en envase son:

- Estructura fina favorable

- Estar libre de elementos tóxicos
- Ser liviano, poroso.
- Ser económico
- Sin contaminantes
- Inerte

La tendencia actual es hacia el empleo de componentes sin suelo. El empleo de suelos minerales, compost y estiércol puede dar buenos resultados, pero las probabilidades de encontrar problemas inesperados es mucho más alta, y no son detectados hasta que la planta responde con síntomas desfavorables. Para las plantas micropropagadas se utilizan muchos sustratos, solos o en mezclas, que abarcan la vermiculita, perlita, coco-soil, suelo estéril, hojarasca, pinocha, etc. En países desarrollados la tendencia es utilizar casi exclusivamente componentes sin suelo, como agrolita, lana de roca, floratena, compost de corteza.

PARTE PRÁCTICA

ACLIMATACIÓN DE PLANTAS MICROPROPAGADAS

Debido a que el pasaje a condiciones *ex vitro* es un problema en muchos sistemas de micropropagación, el objetivo de este trabajo práctico es aclimatar las vitroplantas de *Pelargonium graveolens* “malva rosa” y de *Nicotiana tabacum* “tabaco”, para luego rusticarlas y llevarlas a condiciones de invernadero.

Se aclimatarán las plantas enraizadas *in vitro*, siguiendo los pasos a continuación:

Utilizar envases de plástico de 7 cm de diámetro por 15 cm de alto, con 100 cm³ de sustrato estéril cada uno (mezcla de tierra y perlita 1:1).

Con cuidado y con ayuda de una pinza, extraer las plantas del frasco. Lavar las raíces delicadamente con agua corriente, eliminando cualquier resto de medio de cultivo.

Tomar los datos para completar la planilla que se encuentra a continuación.

Colocar las plantas en los envases, regar con fungicida /bactericida /alguicida y cubrir con bolsas de polietileno de 15 x 25 cm, abiertas unos 3 cm. Colocar en cámara climatizada.

Luego de 15 días, abrir la bolsa cobertora unos 10 cm y realizar un nuevo riego.

A los 30 días, retirarla completamente. Dejar las plantas 7 días más bajo condiciones controladas.

Condiciones ambientales:

Temperatura: 25°C +/- 2°C; Fotoperíodo 16h luz- 8h oscuridad; Irradiancia: 60

□mol. m².s⁻¹; calidad: luz blanca fría.

Toma de datos:

Peso fresco de planta completa: _____

Parte aérea:

Nro. de hojas _____

Altura _____

Presencia de eje principal _____

Presencia/ausencia de hojas muertas _____

Color _____

Aspecto _____

Pubescencia _____

Olor _____

Fenotipo _____

Raíz

Largo _____

Nro. de ramificaciones _____

Color _____

Presencia de pelos radiculares _____

Formación de callo _____

RUSTICACIÓN de PLANTAS MICROPROPAGADAS

La rusticación de las vitroplantas se realizará de la siguiente manera:

Retirar cuidadosamente las plantas de los envases que se utilizaron en el período de aclimatación.

Tomar los datos para completar la planilla que se encuentra a continuación.

Colocar las plantas en envases plásticos, conteniendo como sustrato una mezcla de 50% perlita-50% tierra.

Realizar pulverizaciones semanales con fungicida/bactericida/alguicida.

Toma de datos:

Peso fresco de planta completa _____

Parte aérea:

Nro. de hojas _____

Altura _____

Presencia de eje principal _____

Presencia/ausencia de hojas muertas _____

Color _____

Aspecto _____

Pubescencia _____

Olor _____

Fenotipo _____

Raíz

Largo _____

Nro. de ramificaciones _____

Color _____

Presencia de pelos radiculares _____

Formación de callo _____

ENRAIZAMIENTO EN PUENTE DE PAPEL

La inducción del enraizamiento y alargamiento de las raíces es fundamental para lograr, luego, la transferencia de las vitroplantas a condiciones de invernadero. Aunque es muy común realizar el enraizamiento en medios semisólidos, muchas veces se presentan problemas que afectan luego la etapa de aclimatación (raíces anormales, ausencia de pelos radicales, defectuosa conexión vascular). El enraizamiento en puente de papel resulta muy eficiente en muchas especies para evitar estos problemas.

Procedimiento:

Explante: Brotes de 4 a 5 cm de largo, obtenidos *in vitro*, de *Pelargonium graveolens* (malva rosa).

Metodología:

1- Siembra de los brotes en el medio de cultivo: este trabajo debe realizarse en forma aséptica (bajo campana de flujo laminar).

-Esterilizar los instrumentos a utilizar (bisturí, agujas, pinzas).

-Limpiar el área de disección con una solución de etanol 70%.

-Subcultivar los brotes de malva rosa en tubos de ensayo, con medio de cultivo líquido con puente de papel.

-Asegurarse que los brotes permanezcan erguidos sobre el puente de papel y éste pesque el medio de cultivo.

-Incubar en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

Utilidad:

* Obtención de plantas con buen sistema radicular.

** Acortar la etapa de enraizamiento.

*** Garantizar el éxito en la etapa de aclimatización.

Bibliografía:

- Altman, A. and Loberant, B.1998. Micropropagation: clonal plant propagation in vitro. En: Agricultural Biotechnology. Arie Altman Ed. Chapter 2: 19 – 40.
- Gresshoff P.M. and Doy C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 17: 161–170.
- Lloyd, G., and McCown, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc. Int.plant prop. Soc. 30:421-427.
- Olmos, S, Luciani, G. y Galdeano, E. 2004. Micropropagación. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L .eds.). Ediciones INTA. pag. 163-172.
- Pospíšilová, J, Tichá, T; Kadleček, P, Haisel, D and Plzáková, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. Biologia plantarum 42 (4): 481-497.
- Villalobos, V., M. y Thorpe, T., A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas. (Roca, W. M.; Mrogrinski, L. A. eds.). CIAT. Cali. pag. 127-142.

CAPÍTULO 9

UNA OPCIÓN PARA CADA DESAFÍO

TIPOS DE CULTIVOS *IN VITRO*

María de los Angeles Basiglio

Aplicaciones del cultivo de tejidos

El uso más frecuente del cultivo de tejidos vegetales (CTV) es la multiplicación rápida de individuos vegetales (micropropagación), que posibilita obtener en elevado número de plantas con una carga genética común, a una intensa tasa de multiplicación, controlando la composición del medio y las condiciones ambientales. Otro uso frecuente es la obtención de plantas libres de virus, a partir del cultivo de meristemas.

En el mejoramiento vegetal, el cultivo de tejidos juega un rol importante en la obtención de individuos haploides, con los que se puede generar posteriormente diploides, triploides, etc. homocigóticos o generar individuos de cruzamientos interespecíficos estériles. Por otro lado, la ingeniería genética hace uso del CTV para la regeneración de plantas transgénicas.

El cultivo de tejidos también es una herramienta para generar variabilidad genética. Las células desdiferenciadas obtenidas por el cultivo de callos, de células o de protoplastos sometidas a una presión de selección, pueden generar variantes somaclonales.

El cultivo de células en suspensión es utilizada para la obtención de metabolitos de interés y el cultivo y fusión de protoplastos permite obtener híbridos interespecíficos e intergenéticos. El CTV se utiliza también para la multiplicación, intercambio y almacenamiento de germoplasma. Por último, es una

técnica que conduce a la obtención de materiales destinados a estudios básicos en el campo de la Fisiología, Bioquímica, Genética, Histología y otras áreas.

A continuación se detallan algunas técnicas de CTV aplicadas en plantas.

CULTIVO DE SEMILLAS, COTILEDONES Y EMBRIONES (Rescate de embriones)

Existen situaciones de cruzamientos inter-específicos que aunque se produce la fertilización, poco después ocurre el aborto del embrión híbrido. Esto puede deberse a distintas causas, siendo la más común la incompatibilidad del embrión con el endosperma. También puede ser debido a la carencia de formación del endosperma, por falla de la provisión de nutrientes. En estos casos es posible rescatar al embrión inmaduro y cultivarlo *in vitro* hasta obtener una planta completa. El cultivo de cotiledones y embriones permite, también obtener respuestas que con otro tipo de explante no se obtendrían o se demoraría mucho más tiempo.

El cultivo de embriones inmaduros consiste en la disección de los mismos bajo condiciones de esterilidad y en su transferencia a un medio adecuado de cultivo bajo condiciones controladas. En general, resulta fácil obtener embriones libres de patógenos, ya que se encuentran protegidos dentro del medio estéril del ovario. Antes de la disección y establecimiento *in vitro*, se debe proceder a desinfectar superficialmente los ovarios, semillas y/o frutos que los contienen (Young y Thorpe, 1989)

Durante el cultivo de embriones inmaduros se intenta reproducir las condiciones que estos encuentran en el interior de la cubierta seminal.

Parte Práctica

Rescate de embriones

Tipo de Explante: Semillas, cotiledones y embriones de *Phaseolus vulgaris* (poroto) u otra especie de interés.

Metodología:

1- Desinfección del tejido:

- Tratar las semillas con etanol (70%) 2 minutos.
- Colocar en solución de hipoclorito de sodio 30% durante 20 minutos.
- Enjuagar tres veces con agua estéril, bajo campana de flujo laminar.

2- Disección de cotiledones y embriones: este trabajo debe realizarse en forma aséptica (bajo campana de flujo laminar).

- Esterilizar los instrumentos a utilizar (bisturí, agujas, pinzas).
- Limpiar el área de disección con una solución de etanol 70%.
- Sostener la semilla desinfectada con una pinza estéril y retirar tegumento.
- Separar los cotiledones y el embrión y depositarlos suavemente en el medio de cultivo.
- Incubar en la cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

Aplicaciones de la técnica

- * Acortar el ciclo de reproducción.
- * Prevenir el aborto embrionario
- * Material de partida para la obtención de callos y embriones somáticos
- * Superar la latencia de algunas semillas
- * Rescate de embriones híbridos derivados de cruzamientos interespecíficos e intergenéricos.
- * Producción de monoploides.
- * Estudios de requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo.

CULTIVO DE ANTERAS, GRANOS DE POLEN Y ÓVULOS (Cultivo de haploides)

El sueño de todo fitomejorador es la obtención de un nuevo cultivar mejorado en el menor número posible de generaciones. Con esta técnica, es posible la obtención de plantas haploides, cuyo número n de cromosomas puede ser duplicado mediante tratamientos con colchicina, mediante el cultivo de células sexuales, ya sean las microsporas o los óvulos (aunque es más común el cultivo de anteras y granos de polen), y la subsiguiente regeneración de plantas. El número de especies en la que se produjeron plantas haploides es importante e incluye a plantas hortícolas (ají, tomate, berenjena, papa, nabo), frutícolas (manzano, vid, cerezo), cereales (trigo, centeno, cebada, maíz), forrajeras (ray grass, festuca), forestales (álamo).

Los granos de polen de las angiospermas son el producto del proceso llamado microesporogénesis, que abarca toda la secuencia del desarrollo, desde la célula madre hasta la maduración del grano de polen. Para la obtención de plantas haploides pueden utilizarse como explantes las anteras completas o bien las microsporas aisladas.

Las células haploides contienen un único juego de la dotación cromosómica, por lo que constituyen una valiosa herramienta para la selección de caracteres deseables en los programas de mejoramiento. El fenotipo de las plantas derivadas de estas células resulta de la expresión de la única copia del material genético, por lo que no existe enmascaramiento de caracteres debido a efectos de dominancia.

Cultivo de anteras

El cultivo de anteras (CA) (Fig. 2) es una técnica por medio de la cual es posible producir líneas homocigotas a partir de poblaciones segregantes, mediante el doblamiento cromosómico del polen haploide y la regeneración de plantas en un ciclo de cultivo *in vitro*.

En una primera fase del C.A. se induce la formación de microcallos colocando las anteras en un medio cuya composición estimule selectivamente la división mitótica de las microspóras, a expensas de las células somáticas en el filamento, el tejido conectivo y la pared de la antera. El medio para inducir esa

formación debe tener altas concentraciones de auxinas. Posteriormente se produce la regeneración de plantas. Al contener la mitad del número cromosómico, las plantas haploides pueden emplearse en programas de fitomejoramiento para seleccionar características deseables, o bien, para desarrollar líneas homocigóticas para la producción de híbridos en especies incompatibles entre sí.

Existen diferentes factores que determinan la respuesta de estos tejidos así como la eventual regeneración de plantas a partir de ellos. En cuanto al estado fisiológico y edad de la planta donadora de las anteras o microsporas, las plantas madre deben ser vigorosas y estar libres de cualquier tipo de estrés ambiental o problema fitopatológico. Salvo en muy raras ocasiones, el polen maduro no responde al cultivo, por lo que debe ser colectado en cierto estadio de desarrollo antes de su maduración. Por lo general el polen colectado durante la primera división mitótica de las microsporas uninucleadas es el que tiene una mayor capacidad de desarrollo *in vitro*. Se recomienda así mismo realizar un pretratamiento, el más recomendable es con frío, es decir, colocar los botones a 5-8°C por 7-10 días. Este tratamiento con frío tiene un efecto sincronizador en el desarrollo del polen lo cual resulta benéfico al momento de obtener el cultivo.

Para la inducción de la embriogénesis pueden cultivarse directamente las anteras aisladas en un medio con agar o en un medio líquido, provocándose la embriogénesis dentro de la antera, o puede aislarse el polen de la antera, mecánica o naturalmente, y se cultiva en un medio líquido. Las plántulas haploides emergen de las anteras cultivadas entre tres y ocho semanas después (Roca y Mroginski, 1991).

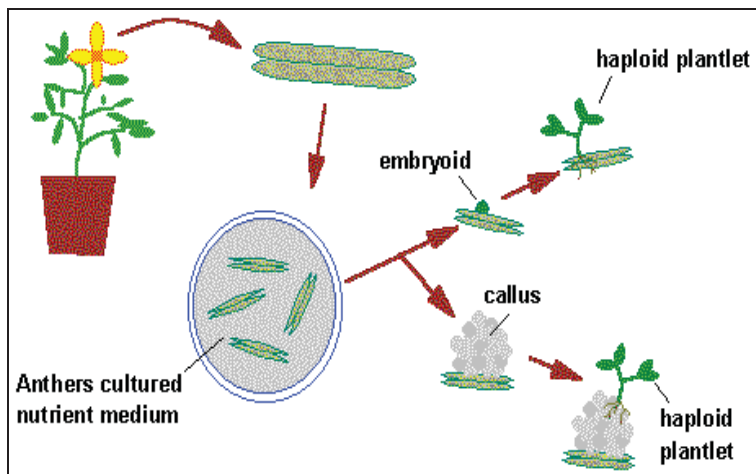


Fig. 2: Cultivo de anteras. Fuente: <http://www.unavarra.es/genmic/genetica%20y%20mejora/cambios%20cromosomicos/Cambios%20cromosomicos%20numericos%20II.htm>

Cultivo de óvulos

El cultivo de óvulos es una técnica que se ha empleado tradicionalmente para evitar barreras de incompatibilidad que dificultan algunos cruces inter e intraespecíficos, para eludir problemas de abscisión prematura del fruto, para la obtención de híbridos que presentan aborto del embrión en estadios tempranos del desarrollo, como vía alternativa a la androgénesis en la obtención de plantas haploides o como sistema experimental para el estudio de la respuesta *in vitro* de cigotos y proembriones. El cultivo de óvulos es un procedimiento complejo aconsejable sólo en los casos en los que sea estrictamente necesario, ya que el porcentaje de éxito es muy bajo y la manipulación del material es difícil. Esto se debe a que el óvulo es una estructura muy pequeña y delicada que requiere microcirugía para su aislamiento, resultando relativamente fácil dañarla. Además, al tratarse de un tejido altamente hidratado, no debe sufrir desecación durante su manipulación, que debe ser rápida y llevarse a cabo bajo una lupa estereoscópica provista de una fuente de luz fría. Es importante recordar que el aislamiento de los óvulos y del polen (en el caso de llevarse a cabo una polinización *in vitro*) debe hacerse en el estado fisiológico y morfológico correcto ya que de otra forma el proceso no tendría lugar. Por ello, debe hacerse un estudio de la duración de los

distintos estadios del desarrollo de los órganos a aislar para saber cuándo se encuentran en el estadio adecuado para su cultivo. El óvulo presenta una gran cantidad de requerimientos nutricionales, que varían con el estadio del desarrollo del mismo y que es necesario poner a punto para cada especie a tratar.

En el caso de plantas que sufren aborto de embriones en estadios tempranos del desarrollo y en aquellos cruces en los que la barrera de incompatibilidad se encuentra a nivel del ovario, es necesario rescatar los óvulos recién fecundados o incluso fecundarlos *in vitro*. Actualmente, el cultivo de óvulos aislados o con tejido placentario se está empleando cada vez más en la mejora genética de plantas (Herrero y Hormaza , 1996), no sólo porque permite cruces casi imposibles de obtener en la naturaleza, sino porque además permite seleccionar para la fecundación aquellos granos de polen que hayan sido capaces de germinar bajo condiciones de estrés (térmico, salino, etc.), acelerando así la obtención de plantas resistentes (Zamir y Gadish, 1987; Sacher y *otros.*, 1983).

Cultivo de granos de polen/polinización *in vitro*

A la hora de llevar a cabo la polinización *in vitro*, el polen se deposita sobre los óvulos en una gota de medio que permita su germinación o, en los casos en los que el polen sea incapaz de germinar bien sobre el óvulo, se hace germinar primero y luego se añade. Son varios los medios que se emplean para la germinación de los granos de polen, pero todos ellos tienen como componentes fundamentales una elevada concentración de sacarosa y la presencia de ácido bórico. En condiciones normales, el polen germina en pocas horas, y 1-2 días después de la polinización tiene lugar la fecundación de los óvulos.

Algunas alternativas al cultivo de óvulos, en algunos casos válidos, son las siguientes:

* Polinización estigmática *in vitro*: Esta técnica consiste en el cultivo del pistilo y polinización *in vitro* del estigma. Este tipo de fertilización no requiere ninguna manipulación especial, salvo si es necesario la emasculación del botón floral, por

lo que es una de las más sencillas de llevar a cabo. Se realiza satisfactoriamente en los casos de caída prematura del fruto.

- Polinización placentaria *in vitro*: En este método se aíslan los óvulos con un trozo de placenta, para lo que se divide el ovario en dos o más mitades de forma que los óvulos queden expuestos. De esta forma, se simplifican tanto el medio nutritivo como la manipulación necesaria para el aislamiento de los óvulos, sufriendo éstos muchos menos daños físicos así como un menor choque hídrico, por lo que el porcentaje de supervivencia se ve incrementado. Esta técnica se puede emplear para evitar barreras de incompatibilidad localizadas en el estigma y/o estilo, así como para la obtención de plantas haploides.

Parte práctica

Cultivo de anteras

Tipo de Explante: Pimpollos de cualquier especie disponible, según la época del año.

Metodología:

1- Desinfección del tejido:

- Tratar los pimpollos con etanol (70%) 1 minuto.

- Colocar en solución de hipoclorito de sodio 20% durante 5 minutos.

- Enjuagar tres veces con agua estéril, bajo campana de flujo laminar.

2- Disección de las anteras: este trabajo debe realizarse en forma aséptica (bajo campana de flujo laminar).

- Esterilizar los instrumentos a utilizar (bisturí, agujas, pinzas).

- Limpiar el área de disección con una solución de etanol 70%.

- Sostener el pimpollo desinfectado con una pinza estéril y remover el cáliz y la corola.

- Con un bisturí fino separar las anteras de los filamentos y depositarlas suavemente en el medio de cultivo.

-Incubar en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

Aplicaciones

* Producción de haploides.

** Obtención de plantas homocigotas en todos sus caracteres.

*** Acortar los ciclos de mejoramiento

CULTIVO DE CALLOS

Se puede definir al callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido. Esta masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular. (Butcher e Ingram, 1974). Algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas, mientras otras forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares. La coloración de este tejido también varía, aun derivando de la misma especie. El tipo y grado de pigmentación esta marcadamente influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etcétera. Por si mismos, los vegetales tienen un potencial endógeno para la formación del callo, pues en su medio natural, al sufrir una lesión en un órgano, esta es reparada por este tejido. De especie a especie se presenta una variación en esta capacidad, misma que se refleja en la respuesta *in vitro* a la inducción del callo, encontrándose así tejidos para los que, el inducirlos al callo es requisito el suplemento de una auxina o un regulador del crecimiento relacionado; otros requieren solo una citocinina o un suplemento, tanto de auxina como de citocinina, o bien, solo responden en presencia de extractos de complejos naturales en el

medio.

En general, las auxinas y los reguladores del crecimiento más usados en la iniciación y mantenimiento del cultivo de callo son el ácido indol – 3- acético (AIA), ácido naftalén acético (ANA) y el ácido 2, 4- diclorofenoxiacético (2,4 D), en concentraciones que generalmente oscilan de 0,1 a 10,0 mg/L (Yeoman y Macleod, 1977), encontrándose, para cada especie, una auxina o un regulador del crecimiento y una concentración óptima para la inducción y mantenimiento del callo.

En todas las fases del cultivo de callo el genotipo juega un importante papel para llegar a obtener éxito, por lo cual se debe siempre trabajar durante la investigación con 2 a 3 genotipos a la vez. Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células ya que en general con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos dependiendo fundamentalmente del balance auxina- citocinina en el medio de cultivo.

Se han formado callos utilizando diferentes tipos de explantes, prácticamente de todas las partes de una planta. Independientemente del explante usado, la edad de éste tiene un rol importante en la determinación de la respuesta *in vitro*. Solo un pequeño porcentaje de las células en un explante dado contribuyen a la formación del callo. El lugar o sitio para el comienzo de la proliferación de los callos generalmente está situado en la superficie del explante o en la superficie extirpada. La tendencia es a emplear tejidos más indiferenciados y los más jóvenes posibles, lo cual ha permitido obtener éxito en el cultivo *in vitro* de diferentes especies anteriormente consideradas “recalcitrantes”. También el uso de diferentes partes de plantas *in vitro*, así como el uso de órganos o fragmentos de órganos encerrados en frutos o inflorescencias ha permitido reducir a niveles muy bajos los porcentajes de contaminación, siendo también otra tendencia actual.

La fase de formación de los callos es de forma general la menos importante, pues consiste en solamente establecer los explantes *in vitro* y obtener

el callo, sin embargo lograr multiplicarlo con buen crecimiento y al final obtener plantas, son las fases o etapas más difíciles.

Los callos después de formados pueden multiplicarse con subcultivos cada 30 o 45 días en dependencia de la especie de planta, separando estos en pequeñas fracciones con tamaño entre 2 a 5 mm. Generalmente se emplea el mismo medio de cultivo de formación para la multiplicación. Es importante transferir fragmentos de tejido visiblemente sano (sin contaminación por hongos ni bacterias, sin necrosis, etc.), y cuando esté establecido, es necesario cambiarlo a medio nuevo con una frecuencia que varíe de 2 a 6 semanas, ya que la falta de transferencia lleva irremediablemente al debilitamiento, intoxicación y muerte del tejido. Esto es debido a que el crecimiento y la multiplicación celular son tan intensos que provocan el gasto de los nutrientes del medio, además, debido a la evaporación el medio sólido se deshidrata, en el caso del medio líquido, aumenta la concentración de sus constituyentes por el mismo efecto; también la acumulación de metabolitos de desecho celular puede llegar a ser tan alta que se vuelven tóxicos para el tejido (Yeoman y Macleod, 1977).

Como consecuencia de la diferenciación celular que tiene lugar en los tejidos del callo, las células meristemáticas en continua división, se transforman en células grandes, de citoplasma ralo y laterizado, producto del crecimiento de una vacuola que ocupa todo el espacio citoplasmático.

Aplicación

- Obtención de Protoplastos.
- Obtención de material de partida para crioconservación.
- Producción de metabolitos secundarios.
- Biotransformación.
- Estudios Fisiológicos.
- Embriogénesis somática
- Organogénesis

Cultivo de callo en medio líquido

Se inicia por transferencia de callos friables a medio líquido, que se disgregan para formar agregados celulares y células libres. Las células en suspensión tienen mayor disponibilidad de nutrientes, se dividen y crecen rápidamente, tienen mayor inestabilidad genética y bioquímica y requieren de una reselección continua de líneas celulares.

Parte práctica

Tipo de Explanto: Callos

Metodología

- 1- Mantenimiento de callo organogénico por largo tiempo:
 - Transferir a medio de cultivo fresco periódicamente
- 2- Disección de las porciones de callo: este trabajo debe realizarse en forma aséptica (bajo campana de flujo laminar).
 - Esterilizar los instrumentos a utilizar (bisturí, agujas, pinzas)
 - Limpiar el área de disección con una solución de etanol 70%.
 - Separar y descartar con una pinza y bisturí estériles los sectores del callo necrosados
 - Identificar y separar con un bisturí fino las porciones organogénicas, subdividir las en pequeños grupos y sembrarlas en el medio de cultivo líquido.
 - Colocar los medios de cultivo en un agitador orbital o shaker, incubar en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

Cultivo de embriones somáticos

Los embriones somáticos tiene, al igual que los cigóticos, la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un proceso asexual por lo que la nueva planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial. Este no es un proceso que sucede únicamente en cultivos *in Vitro*, de hecho es relativamente común en algunas familias de plantas y se conoce como *apomixis*.

Como embriones somáticos, asexuales o adventicios se han definido los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas normales.

Utilidad:

- Altísima tasa de multiplicación
- Selección de súper genotipos
- Obtención de semillas de especies que no las forman
- Desarrollo de semillas artificiales

DESARROLLO DE SEMILLAS ARTIFICIALES:

Los embriones o embrioides de origen somático pueden mantenerse bajo condiciones de cultivo *in vitro*, subcultivandolos en un medio que propicie su germinación, o bien pueden encapsularse para la obtención de semillas sintéticas. En ambos casos su germinación dará lugar a una planta idéntica a la planta madre seleccionada.

Las semillas artificiales reproducen la estructura de una semilla de origen sexual. Las semillas artificiales poseen una cubierta de protección, contienen sustancias de reserva y portan un embrión en su interior.

Para la obtención de semillas sintéticas (Fig.3), los embriones somáticos son encapsulados en gotas de alginato de sodio al 2%. Dicha encapsulación puede producirse por diferentes procedimientos, incluso mecanizados, para disponer los embriones en el interior de cada gota.

La producción de semillas artificiales se ha convertido en una alternativa para el manejo extensivo de especies cultivables. Numerosas especies de interés agronómico pueden hoy en día ser multiplicadas clonalmente y ser sembradas a campo utilizando esta tecnología. Estas semillas pueden ser manejadas como si se tratara de semillas tradicionales, incluso con el auxilio de maquinaria agrícola. Una semilla artificial no es más que la preparación de una capsula, el revestimiento de un material de cultivo, órgano o porción de tejido, que puede crecer y convertirse en una planta completa, nutriéndose de una lámina artificial. Esta lámina artificial está formada a su vez por una lámina externa que fortalece y protege la semilla (tegumento) y una lámina interna que se forma por encapsulación y que contiene los nutrientes requeridos por el embrión para su desarrollo y fitohormonas para el control de la germinación (endospermo). La semilla artificial tendrá su mayor aplicación en la propagación de plantas de multiplicación vegetativa (caña de azúcar, bananos y plátanos, ajo, boniato), plantas perennes (forestales y frutales), híbridos, plantas obtenidas por ingeniería genética y cultivos en los cuales un solo sexo es el útil (esparrago, kiwi, papaya). El empleo de este sistema en tales cultivos se justifica debido al alto valor agregado del material vegetal que se está trabajando.

Sin embargo, esta no es la única consideración a tener en cuenta con respecto a la elección de un cultivo candidato para este tipo de tecnología, pues existe una consideración biológica a tener en cuenta que es la disponibilidad de protocolos de regeneración que permitan obtener embriones somáticos de calidad, entendiéndose por calidad la obtención de embriones somáticos uniformes y sincrónicos, capaces de permanecer en estado de dormancia y presentar una alta

frecuencia de germinación y conversión en plantas bajo condiciones de asepsia y baja nutrición. A la vez estos protocolos de regeneración deben permitir la obtención de embriones con tasas de variabilidad somaclonal controlada dentro de límites agronómicamente permisibles.

Han sido ensayados varios sistemas para la encapsulación de embriones, pero de todos ellos, sólo los métodos basados en la gelación han tenido algún resultado. Los geles con mejores resultados son: Alginato de sodio, Alginato de potasio, Agar, Gelrite, Carragenam, etc. El hidrogel de alginato es el más frecuentemente seleccionado como matriz para la semilla artificial, pues tiene como rasgo una viscosidad moderada y baja toxicidad, así como una rápida gelificación. Las ventajas del alginato están dadas por la no fitotoxicidad, insignificante disminución del poder germinativo de los embriones y la simplicidad del proceso de gelificación que consiste en depositar gota a gota una mezcla de alginato + medio de cultivo + el embrión en una solución de CaCl_2 , lo cual facilita la mecanización del proceso de encapsulado. Estas ventajas están asociadas también a varios aspectos negativos como la insuficiente elasticidad del gel, endurecimiento del gel, problemas con el intercambio de gases y pérdida de agua con facilidad (Redenbaugh, 1990).

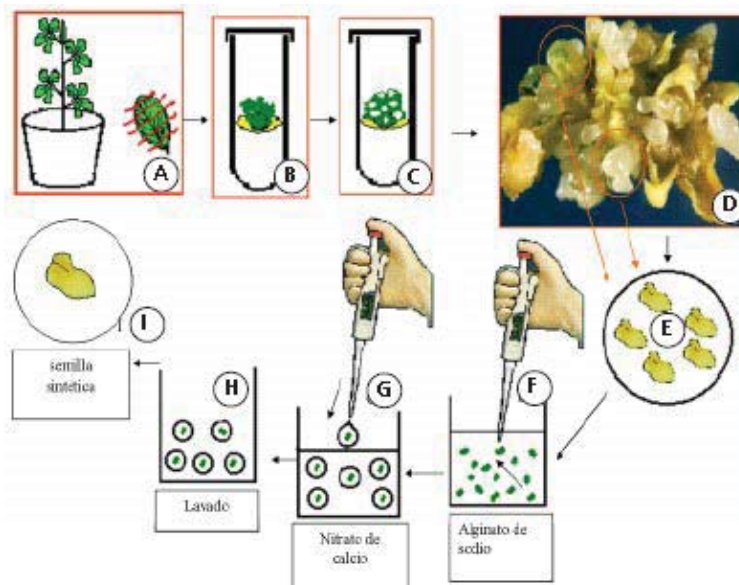


Fig. 3. Obtención de semillas sintéticas. A-D. Inducción de la embriogénesis somática. E. Selección de embriones somáticos. F. Inmersión de embriones en Alginato de sodio. G. Acomplejamiento con Nitrato de calcio. H. Lavado. I. Semilla sintética. Fuente:<http://cmapspublic2.ihmc.us/rid=1HZ6CF27G-1G52G54-QFD/1HXMSDHH4I123MPTI638Iimage>

CULTIVO DE PROTOPLASTOS Y FUSIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Los protoplastos son células vegetales desprovistas de pared celular. La introducción en la década del 60 de métodos de aislamiento de protoplastos viables por tratamientos enzimáticos posibilitó su obtención a gran escala y su utilización para estudios experimentales. En medios nutritivos adecuados y bajo condiciones controladas de cultivo, los protoplastos pueden regenerar su pared celular, dividirse y diferenciarse dando lugar a plantas completas (Fig. 4). Los protoplastos son adecuados para manipulaciones genéticas que no son posibles con células intactas ni plantas. Además, constituyen herramientas experimentales únicas para investigaciones fisiológicas, biofísicas y bioquímicas. Los protoplastos también son utilizados en el aislamiento de mutantes, que son utilizados para estudios del metabolismo celular, programas genéticos y fitomejoramiento. Con la difusión de la mutagénesis y cultivo *in vitro*, los investigadores han podido encarar el desarrollo de numerosas aplicaciones de interés económico. Ejemplos de ello son la selección de líneas resistentes a estrés para obtener plantas adaptadas a suelos salinos, la obtención de plantas resistentes a herbicidas y pesticidas, la selección de líneas celulares y plantas tolerantes al anegamiento o a temperaturas elevadas.

Una de las características que han hecho importante el cultivo de protoplastos es que, por estar aislado del conjunto de células, cada protoplasto puede ser usado como un sistema celular individual, lo que permite manejarlo igual que a un microorganismo, hecho que nos permite efectuar estudios sobre mecanismos de infestación viral, así como lograr la obtención, manejo y aislamiento de líneas celulares híbridas o mutantes, entre otras cosas. (Cocking, 1977).

La operación fundamental en el aislamiento de los protoplastos es la remoción de la pared celular sin causar daño. (Larkin, 1976) Este aislamiento puede ocurrir por:

* Método mecánico: Se sumerge el tejido en una solución hipertónica, provocando con ello plasmólisis; ya plasmolizadas las células se secciona el tejido y se liberan los protoplastos.

* Método enzimático: Es el procedimiento más usado (Fig. 4), y consiste en tratar al tejido con una mezcla de enzimas degradantes de la pared, que en general son celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Constabel, 1975), en soluciones apropiadas y con estabilizadores osmóticos. Este método tiene varias ventajas, como son la de obtener un mayor número de protoplastos por unidad de tejido y el impedimento de que las células se rompan, como sucedería con el método mecánico, con lo cual se evita la intoxicación causada por los desechos de la degradación celular.

Los protoplastos mantienen su capacidad para la morfogénesis y por medio de una manipulación y un control de las condiciones fisiológicas y nutricionales pueden ser inducidos a formar plantas completas.

En síntesis, el uso de protoplastos vegetales tiene las siguientes ventajas:

- 1) Los protoplastos, naturalmente o por inducción, pueden fusionarse y, por tanto, es posible obtener híbridos somáticos.
- 2) Presentan totipotencialidad, por la cual es posible obtener de ellos plantas completas.
- 3) Debido a sus características intrínsecas, los protoplastos son un excelente material de investigación en muchas áreas de la biología vegetal.

Parte práctica

Aislamiento y cultivo de protoplastos (método enzimático)

Tipo de Explante: Hojas jóvenes de tabaco completamente expandidas.

Métodología:

Todos los pasos se llevan a cabo bajo condiciones estériles. Se esterilizan en etanol (70%) hojas de plantas jóvenes de tabaco completamente expandidas, durante un minuto. Posteriormente se colocan por 15 a 25 min en hipoclorito de sodio al 2.0% (v/v). Se lavan tres veces las hojas en agua destilada estéril. Se separa con sumo cuidado la epidermis inferior y las hojas se cortan en pedazos alargados de 2.0 mm de ancho.

Antes de agregar las enzimas el tejido se plasmoliza en una solución osmoactiva de sorbitol 0,35 M más 4.0 Mm de $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2$ en agua destilada durante 10 minutos. A continuación, las pequeñas piezas de tejido se colocan con el envés en contacto con una Caja de Petri de plástico, estéril, que contenga una mezcla de enzimas 0,5% de macerozima más de 2.0% de onozuca, disueltas en sorbitol al 13% y con PH de 5,4, previamente esterilizado por filtración, y se dejan en incubación sobre esta de 10 a 18 hs a 25°C.

Después del período de incubación, los segmentos de hoja se agitan muy suavemente para liberar los protoplastos; se filtra el medio a través de una malla de nylon (con poros de 40 a 70 μm) para separar los fragmentos o remanentes de hoja.

Se transfiere el filtrado a tubos de centrifugación y se centrifugan a 85g por cinco minutos. El sobrenadante se remueve cuidadosamente y se elimina. Los protoplastos se resuspenden en medio de cultivo Murashige & Skoog con manitol al 13%; se repite por tres veces el proceso de centrifugación. Se elimina el sobrenadante y los protoplastos quedan al fondo del tubo. Se determina la viabilidad y se ajusta la densidad a 10^5 protoplastos por mm. Se siembran los protoplastos (Doods y Roberts, 1982). En general, todos los medios de cultivo protoplásticos son variaciones de los medios minerales de Murashige y Skoog y White, ya que los requerimientos nutricionales de los protoplastos precisan altas concentraciones de iones Calcio y azúcares, o azúcares alcohólicos como estabilizadores para evitar la lisis osmótica. Por ello es necesario añadir sorbitol o manitol en solución al 13% al medio nutritivo final.

El porcentaje de viabilidad se determina tiñendo los protoplastos con diacetato de fluoresceína y observando en un microscopio de fluorescencia; solo los protoplastos vivos se teñirán.

La densidad se determina con un hematocitómetro de profundidad de campo de 0,2 mm. La densidad óptima para la siembra de protoplastos de tabaco es de 10^5 protoplastos por ml, pudiéndose ajustar esta densidad añadiendo medio osmoactivo, adicionando 0,6% de agar hasta alcanzar la densidad requerida.

Los protoplastos se siembran en un matraz Erlenmeyer con medio osmoactivo líquido y sin agitación, o se toman dos alícuotas de protoplastos (10^5 ml) suspendidos en medio líquido y se colocan en una Caja de Petri chica; se mezclan cuidadosamente con un volumen igual del mismo medio, pero agarizado (2.0%) y cuando el medio está aún tibio (40°C) y sin haberse gelificado. A continuación, se sella la Caja de Petri con papel parafilm y se coloca en posición invertida (boca abajo) en la cámara de cultivo (2000 lux y 28°C).

De tres a seis semanas después del cultivo inicial pueden seleccionarse las colonias celulares y ser cultivadas como se cultiva el callo (ya sin los agentes osmoactivos, sorbitol o manitol).

Los protoplastos pueden ser dañados fácilmente por factores físicos y por el manejo, por lo cual siempre deben ser tratados con extremo cuidado; además son muy sensibles a la presencia de sustancias extrañas, por lo que es necesario usar utensilios y cristalería perfectamente limpios (sin remanentes de desinfectantes, sales, detergentes, etc.).

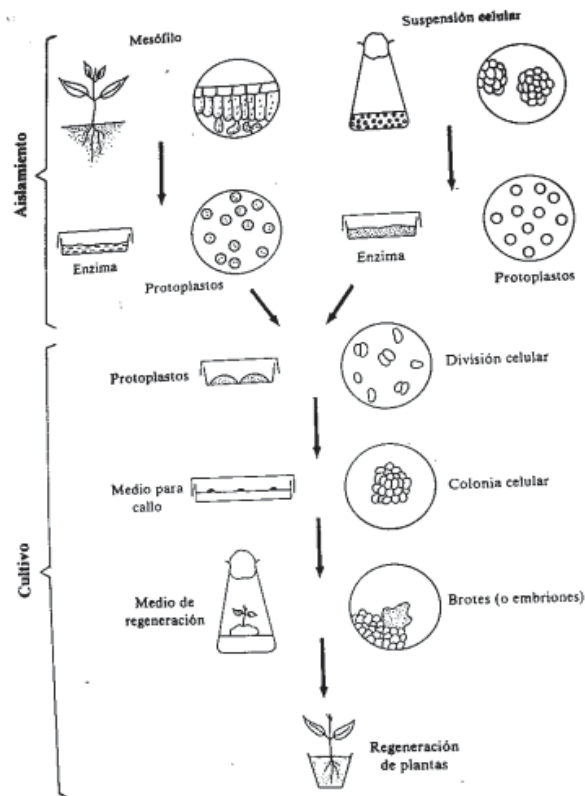


Fig.4. Aislamiento y Cultivo de protoplastos. Fuente: Szabados, L. 1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura*.

INDUCCIÓN DE VARIACIÓN SOMACLONAL

Durante el cultivo *in vitro* de células y/o tejidos vegetales puede ocurrir la obtención de regenerantes que presenten una alteración espontánea de su fenotipo. En los programas de propagación clonal masiva, esta variabilidad resulta desventajosa o negativa, principalmente cuando se origina a partir de mutaciones cromosómicas o genómicas. Debido a que estos nuevos genotipos difieren del tipo varietal de la planta madre de origen, deben ser descartados y separados del cultivo. Sin embargo, en los últimos años la variación somaclonal ha comenzado a considerarse una fuente valiosa para el mejoramiento intracultivar. Este tipo de variabilidad puede verse favorecida bajo condiciones restrictivas o bajo presión de selección (Handro, 1989).

Larkin y Scowcroft (1981) llamaron variación somaclonal a los cambios ocurridos en las plantas regeneradas y que son transmitidos a la progenie. Asimismo cabe citar la ocurrencia *in vitro* de cambios reversibles que pueden modificar la expresión de ciertos genes. Estos cambios que no implican alteración en la secuencia nucleotídica se denominan “epigenéticos” (Madlung y Comai, 2004). Algunos autores los consideran variantes somaclonales mientras que otros sólo incluyen en la misma aquellos cambios que no revierten en ciclos sucesivos de reproducción sexual. Los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal no han sido completamente dilucidados. Sin embargo, se han propuesto varias causas de posible incidencia en la ocurrencia de la misma. Entre esas causas se citan: el genotipo, la fuente de explanto, el tiempo en cultivo, las condiciones y composición del medio de cultivo y la vía de regeneración. La comprensión de estas causas ayudaría a mejorar la interpretación de los procesos celulares de respuesta al estrés y permitiría definir como actúan en los procesos de evolución (Cardone y otros., 2010).

CULTIVO DE RAÍCES:

Los estudios realizados con el cultivo de raíces han contribuido con nuevos descubrimientos a la fisiología vegetal y han aumentado el conocimiento acerca del metabolismo de los carbohidratos, el papel de los iones minerales, vitaminas y hormonas en el crecimiento vegetal, así como la diferenciación y el desarrollo de raíces.

El cultivo de este órgano ha aportado un sistema experimental idóneo para el estudio de las rutas de los metabolitos en la raíz.

El principal problema en este tipo de cultivo es obtener el inoculo adecuado, pues siempre se encuentra gran contaminación en las raíces. En la práctica, el explante se obtiene de semillas germinadas asépticamente. El cultivo en medio líquido ha tenido más éxito para raíces que el uso de agar.

Parte Práctica

Tipo de Explante: raíces, obtenidas de plántulas cultivadas *in vitro*, de *Pelargonium graveolens* (malva rosa) u otra especie disponible.

Metodología

- Siembra de las raíces en el medio de cultivo: este trabajo debe realizarse en forma aséptica (bajo campana de flujo laminar).
- Esterilizar los instrumentos a utilizar.
- Limpiar el área de disección con una solución de etanol al 70%.
- Disectar las raíces de las plántulas cultivadas *in vitro*.
- Subcultivar las raíces de malva rosa en frascos, con medio de cultivo líquido.
- Incubar en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

Utilidad:

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Formación de suspensiones celulares.• Producción de metabolitos secundarios importantes para el hombre (alcaloides, glucósidos, esteroides, enzimas, compuestos aromáticos, colorantes). |
|---|

Bibliografía:

- Butcher, D. N. E, Ingram D. S (1974). Plant Tissue Culture, Studies in Biology. Num 65, The Camelot Press L. T. D., Southanpton, Gran Bretaña. Pp 45.
- Cardone, S., Omos, S. y Echenique, V. 2010. Variación somaclonal. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. (Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mroginski, L. eds.). Ediciones INTA. pag. 229- 241.
- Cocking, E. C, 1977. Plant protoplast fusion: Progress and prospects for agriculture, In: Recombinant molecules: Impact on science and society. Ed. By Beers, R. F. et. al., Raven Press, New York.

- Constabel, F., Kirkpatrick J. W., Kao K. N., Kartha K. K., 1975. The effect of canavanine on the growth of cells from suspension cultures and on intergenetic heterokaryocytes of canavanine sensitive and tolerant plants. *Biochem. Physiol. P. flenzen.* 16, 319- 325.
- Doods, J. H., Roberts, L. W. 1982. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, Cambridge. 178 p.
- Handro, W. 1989. Mutagenesis and *in vitro* selection. In: Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture. Parte A. pp. 155-180.
- Herrero M, Hormaza JI. 1996. Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction* 9: 343-347.
- Hurtado, MV; Merino, ME. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.
- Larkin. P. J. 1976. Purification and Viability. Determinations of Plant Protoplasts. *Planta* 128: 213-216.
- Larkin P.; Scowcroft. W. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cells cultures from plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60, 197-214.
- Madlung A.; Comai, I. 2004. The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany.* 94:481-495.
- Redenbaugh, K. 1990. Application of artificial seed to tropical crops. *Hortscience,* 25: 251- 255.
- Roca, W. M y Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Capitulo N°12.
- Sacher, R.F., R.C. Staples, and R.W. Robinson. 1983. Ion regulation and response of tomato to sodium chloride: A homeostatic system. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108:566-569.
- Szabados, L. 1991. Protoplasto: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas.* (Roca, W. M.; Mrogrinski, L. A. eds.). CIAT. Cali. Capitulo 10. pág. 239- 254
- Yeoman M. M, Macleod A. J, 1977. Tissue (callus) culture techniques. In: H. E Street (ed.), *Plant Tissue and Cell Culture.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. Pp. 31- 59.

- Young, E.C. and Thorpe, T.A. 1989. *In vitro* fertilization and embryo culture. In: Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture. Part B. pp. 253-272.
- Zamir, D.; Gadish, I. 1987. Pollen selection for for low temperature adaptation in tomato. Theor. Appl. Genet.

CAPÍTULO 10

LAS PLANTAS COMO BIO-FÁBRICAS

PLANTAS MEDICINALES- METABOLITOS SECUNDARIOS

María Cecilia Rivas

Introducción

Desde tiempos remotos muchas plantas son conocidas por sus propiedades terapéuticas. Sus características morfológicas, las partes utilizadas, época de recolección, forma de administración, etc. se ha divulgado de generación en generación, en forma oral o escrita como el famoso *Códice De la Cruz-Badiano*. Se estima que entre 20 000 y 55 000 especies vegetales se han empleado medicinalmente, de las cuales solo una pequeña cantidad se ha investigado para desarrollar medicamentos.

Se define como **plantas medicinales** a aquellas plantas cuyas partes o extractos se utilizan como drogas o medicamentos para el tratamiento de alguna afección o enfermedad que padece un individuo o animal. Vale recordar se denomina droga vegetal a la parte “activa” de este tipo de plantas y se puede suministrar en forma de cápsulas, comprimidos, cremas, elixir, decocción, infusión, jarabe, pomada, tintura, y ungüento, entre otras. Para llegar a obtener un medicamento a partir de una planta habrá que cumplir con una serie de requisitos que comprenden la extracción y purificación de los principios activos, determinación de la actividad biológica y ensayos clínicos hasta su aprobación por parte del organismo competente. Los números hablan por sí mismo al momento de reivindicar a estas plantas como fuente de *fitofármacos*:

- El 75% de la población mundial utiliza medicina tradicional fundamentalmente bajo forma de extractos de plantas.
- El 75% de las nuevas estructuras químicas descubiertas provienen de las plantas.
- El 25% de los medicamentos de la industria farmacéutica son de origen vegetal.
- Se han estudiado sólo 5000 de las casi 300000 especies vegetales existentes en el planeta.

Ejemplos de productos de plantas medicinales en venta libre en países desarrollados y en desarrollo

- Quinidina, extraída de la corteza de *Cinchona sp.*: arritmia cardíaca
- Quinina, también extraída de *Cinchona sp.*: malaria o paludismo.
- Pilocarpina, extraída de *Pilocarpus sp.*, de Brasil: glaucoma.
- Picrotoxina, extraída de *Anamirta sp.*: usada en todo el mundo como estimulante del sistema nervioso.
- L-Dopa, extraída de *Mucuna sp.*: enfermedad de Parkinson.
- Bromelaína o bromelina, extraída de la piña (*Ananas sp.*): agente antiinflamatorio.
- Escopolamina, extraída de *Datura sp.*: sedante.
- Digitalina y digoxina, extraídas de *Digitalis sp.*: enfermedades cardíacas.
- Atropina, extraída de belladona (*Atropa sp.*): potente dilatador de la pupila.
- Curare, extraído de *Chondrodendron sp.*: relajador muscular, usado en particular en cirugía.
- Efedrina, extraída de *Ephedra sp.*, de China: descongestionante.
- Ipeca, extraída de *Cephaelis sp.*, de América Central: emético y remedio contra a disentería.
- Senósido, extraído de *Senna sp.*: laxante.

El primer desafío consiste en definir la o las estrategias para determinar el potencial de una especie vegetal en el universo de la biodiversidad para la obtención de medicamentos; algunas más tradicionales y otras más actuales: Selección al azar seguida de tamizaje químico o biológico.

Selección etnobotánica (tradición de uso).

Quimiotaxonomía.

Basados en la ecología.

Genómica y metabolómica.

Taxonomía botánica

La distribución de las plantas medicinales en las distintas regiones de la tierra forma parte de la biodiversidad del planeta y tanto el clima, el suelo y la latitud determinarán la calidad y el rendimiento de los principios activos responsables de su actividad. Es por ello que se hace necesario plantear las formas posibles de obtener material vegetal para su uso terapéutico; tanto se extraiga de poblaciones silvestres, en ese caso habrá que cuidar el recurso para evitar la sobreexplotación, tanto si se logra la domesticación y el cultivo, tratando aquí de manejar las condiciones para optimizar el o los productos activos a obtener. Estos productos activos pertenecen a la categoría química de metabolitos secundarios, compuestos derivados del metabolismo primario pero de limitada distribución en el reino vegetal. Los compuestos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario pero sí tienen una implicancia ecológica: actúan como respuesta a un estrés biótico como ataque de herbívoros, virus, hongos, bacterias (sustancias alelopáticas), fitoalexinas (Bourgaud y *otros.*, 2001). Otros tienen una función fisiológica muchas veces asociada a respuesta a algún tipo de estrés abiótico por ejemplo los alcaloides, las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, mientras los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas (Wink, 2007).

La información acerca de los genomas (genómica funcional) y de los perfiles metabólicos (metabolómica) permite conocer las rutas biosintéticas, predecir metabolitos secundarios existentes en plantas no conocidas y hasta manipular las rutas hacia una producción más eficiente, y se proyecta como una efectiva herramienta de control de calidad en los productos obtenidos. (Yuliana y *otros*, 2011)

Aproximadamente 1600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de

plantas superiores se describen cada año, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Fiehn, 2002)

En síntesis, para la industria farmacéutica el reto es descubrir nuevas drogas vegetales, estudiar las estructuras químicas y la actividad farmacológica de estas plantas. Es comprensible entonces el interés en la producción de compuestos naturales de importancia comercial, cuya calidad y costos no se afecten por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción; de ahí la necesidad de utilizar tecnologías diversas para su elaboración, caracterización e identificación. La biotecnología aparece a todas luces como una herramienta indispensable para la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos de origen vegetal.

Cultivo *in vitro* para producción de metabolitos secundarios de plantas

Como se ha descrito en otros capítulos, las principales ventajas del cultivo *in vitro* sobre el cultivo convencional radican tanto en la obtención de plantas completas genéticamente homogéneas, tanto de callos, órganos o células productoras de sustancias activas bajo condiciones asépticas, pudiendo controlar el sustrato, la cantidad y calidad de luz, de humedad y temperatura, así como conseguir un aumento significativo en el rendimiento de los metabolitos específicos por alteración de las rutas metabólicas originales (Vanisree y Tsay, 2007). Además, es posible reducir los costos e incrementar la productividad en sistemas cerrados y automatizados logrando una calidad uniforme y rendimientos constantes del producto (Paek y *otros.*, 2005;).

Varios ejemplos corroboran el uso del cultivo *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios de plantas en laboratorios de investigación (Tabla 1).

Especies	Compuesto activo	Cultivo	Referencia
<i>Digitalis purpurea</i>	cardenólidos	susp.celulares	Hagimori y <i>otros.</i> , 1982
<i>Morinda citrifolia</i>	antraquinonas	susp.celulares	Bassetti y <i>otros.</i> , 1995
<i>Panax ginseng</i>	saponinas	raíces	Choi y <i>otros.</i> , 2000
<i>Taxus chinensis</i>	taxoides	susp.celulares	Dong y Zhong, 2002

<i>Digitalis minor</i>	cardenólidos	brotos	Sales y otros., 2002
<i>Centella asiática</i>	triterpenos	plantas	Kim y otros., 2004
<i>Hypericum perforatum</i>	hipericina	susp.celulares	Xu y otros., 2005
<i>Hypericum perforatum</i>	hipericina	brotos	Liu y otros., 2007
<i>Artemisia annua</i>	artemisina	callos	Baldi y Dixit, 2008
<i>Morinda royoc</i>	antraquinonas	raíces	Borroto y otros., 2008
<i>Digitalis purpurea</i>	cardenólidos	brotos	Pérez-Alonso y otros., 2009
<i>Panax ginseng</i>	ginsenósidos	raíces	Kim y otros., 2009
<i>Pueraria candollei</i>	isoflavonoides	susp.celulares	Korsangruang y otros., 2010
<i>Atropa belladonna</i>	alcaloides	raíces	Yang y otros., 2011

Tabla 1. Metabolitos secundarios obtenidos mediante cultivo *in vitro* de células y tejidos de plantas en laboratorios de investigación. Fuente: Pérez-Alonso, N y Jiménez, E, *Biotecnología Vegetal Vol. 11, No. 4: 195 - 211, 2011.*

A continuación se describen algunas técnicas:

- **Micropropagación**

Por medio de esta técnica y como se ha descrito en profundidad en capítulos anteriores, es posible obtener un sinnúmero de plantas genéticamente homogéneas a partir de ejemplares seleccionados (plantas de elit) por su capacidad de producir compuestos activos determinados

El material obtenido se usará para posterior cultivo a campo o como base para otras biotécnicas.

- **Cultivo de células**

El cultivo de células, fundamentalmente en forma de suspensiones celulares, es similar al que se realiza con microorganismos. Permite una rápida multiplicación celular, se puede realizar a varias escalas, desde un sistema de Erlenmeyer de varios mililitros hasta el escalado en biorreactores de varios litros (Vanisree y otros., 2004), como se ha visto, se deberá ajustar todos y cada uno

de los pasos de un cultivo celular convencional a saber: sales, componentes orgánicos, PGR, oxígeno, temperatura y luz adecuados (Fig. 1).

Los biorreactores para el cultivo de células vegetales pueden clasificarse en tres grandes grupos dependiendo del tipo de cultivo: células en suspensión, células inmovilizadas y reactores de biopelícula (Kargi y Rosenberg, 1987). Sin embargo, no todos los compuestos son producidos en igual cantidad y calidad en células aisladas que los obtenidos en las plantas completas. Esto se debe a que muchos metabolitos se sintetizan integrados a eventos de diferenciación (Kreis, 2007). Además, puede darse cierta inestabilidad genética y fisiológica y una merma del producto en el tiempo.

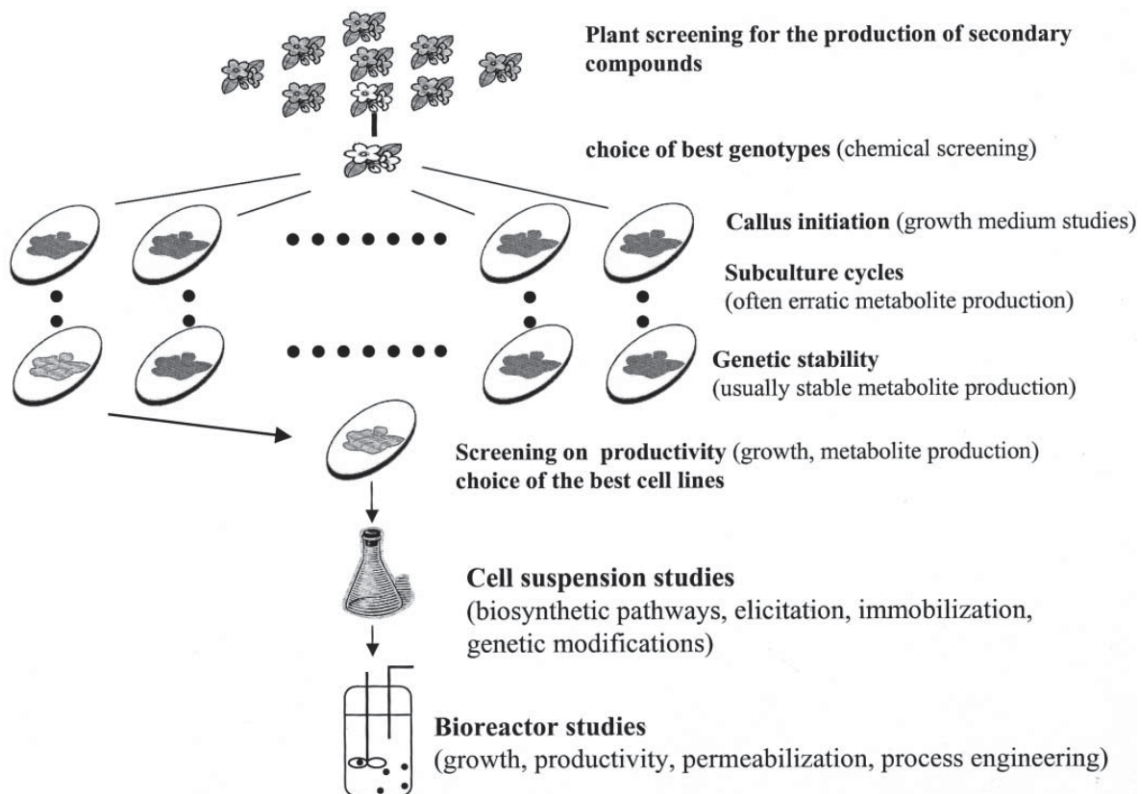


Fig. 1. Guidelines for the production of secondary metabolites from plant cell.
Fuente: F. Bourgaud y otros. / *Plant Science* 161 (2001) 839–85

- Cultivo de órganos

Hay que tener en cuenta que la síntesis de los metabolitos secundarios está asociada a la expresión y regulación de genes biosintéticos de ciertas organelas en cierto tipo de células de determinados órganos. Es por ello que el cultivo a gran escala de brotes y raíces aislados representa una alternativa prometedora. El más ampliamente difundido es el cultivo de raíces,

fundamentalmente bajo la forma de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*, estas raíces aéreas, en medio de cultivo apropiado y en ausencia de reguladores tienen un rápido crecimiento y alto ritmo de producción del compuesto deseado. Boitel-Conti y otros. (1997). Yang y otros. (2011).

En los casos exitosos de cultivo de órganos, se cuenta con la ventaja de la estabilidad genética. Es el caso del cultivo de brotes de *Lavandula officinalis* en medios de cultivo semisólidos el cual mostró mayor contenido de ácido rosmarínico que el obtenido en plantas en condiciones naturales, Wilken y otros. (2005). No es el caso de otras especies como *Hypericum perforatum*, *Cymbopogon citratus* y *Fabiana imbricata* donde las concentraciones de los compuestos deseados fueron menores que los obtenidos en las plantas en condiciones naturales.

Posibilidad de aumentar la producción de metabolitos secundarios

Una vez elegida la planta y el método para obtener el metabolito buscado, es posible optimizar el rendimiento y la calidad del producto. Desde ya que la composición del medio de cultivo y las condiciones físicas de incubación serán lo primero a tener en cuenta. Ejemplo de ello es el aumento de 14 veces del contenido de polifenoles en el cultivo de células de *Cayratia trifolia* por la adición de 3% de sacarosa en combinación con ácido salicílico. Arora y otros. (2010).

A continuación nos referiremos a algunas técnicas más sofisticadas para aumentar la producción de metabolitos secundarios

Selección de líneas celulares

Consiste en el monitoreo de las características celulares a lo largo del cultivo, por la posibilidad de cambios epigenéticos o genéticos. Se realizan mediante exámenes microscópicos, macroscópicos y químicos (Kreis, 2007).

Inmovilización celular

Mediante esta técnica se logra el uso continuo de la biomasa. La inmovilización celular tiene como ventajas las altas tasas de producción de biomasa; la misma puede ser utilizada continuamente, y las células pueden ser separadas fácilmente del medio de cultivo (Kreis, 2007). Por ejemplo, suspensiones celulares de *Taxus cuspidata* fueron inmovilizadas durante seis meses y se alcanzaron niveles de paclitaxel de 0.012% de peso seco (Fett-Neto y otros., 1992). De igual forma, Komaraiah y otros. (2003) realizaron estudios para incrementar el contenido de naftoquinonas en células inmovilizadas de *Plumbago rosea*.

Agregado de precursores

Los metabolitos secundarios pueden ser modulados por la adición de precursores de sus rutas biosintéticas, esta técnica resulta una herramienta interesante a fin de aumentar el potencial biosintético de las enzimas presentes en el cultivo de células. Ejemplo de ello es la adición de fenilalanina, ácido benzoico o serina para aumentar la acumulación de paclitaxel® en el cultivo de callos y suspensiones celulares de *Taxus cuspidata* (Fett-Neto y otros., 1994). La síntesis de hiperflorina aumentó por el uso de L-fenilalanina en el cultivo de brotes en medio líquido de *Hypericum perforatum* (Liu y otros., 2007).

Elicidores

En un principio habíamos referido al rol de los distintos tipos de estrés en la producción de la mayoría de los metabolitos secundarios de plantas. La elicitación consiste en inducir la biosíntesis de metabolitos por exposición de cultivos a moléculas capaces de generar algún tipo de estrés mediante la expresión de genes asociados con las enzimas catalizadoras de diferentes vías metabólicas (Roberts y Shuler, 1997).

Ejemplo:

- elicitor bióticos: micelios y componentes de la pared celular de hongos, polisacáridos, glucanos, glucoproteínas y ácidos orgánicos de bajo peso molecular

- elicitores abióticos: radiación ultravioleta, sales de metales pesados, los herbicidas y el estrés osmótico

Transformación genética

En el caso particular de plantas de interés medicinal, algunos estudios describen la transferencia estable y la expresión de genes foráneos en este tipo de plantas para producción de compuestos de actividad farmacológica (Saito y otros., 1990; Sales y otros., 2007; Zhu y otros., 2009). Un sistema eficiente de transformación ha sido el descrito por varios autores mediante *Agrobacterium rhizogenes*. Por otra parte, autores como Canter y otros. (2005) mencionan varios ejemplos exitosos de transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* en especies de *Digitalis*, *Taxus*, *Artemisia*, entre otros géneros.

Plantas como biorreactores

El uso de plantas transgénicas para la producción de proteínas recombinantes para uso farmacéutico es una nueva tecnología conocida como “Molecular farming”. Las proteínas de interés farmacéutico pueden ser expresadas de una manera estable en plantas transgénicas o a través de expresiones transitorias en plantas infectadas con virus portadores de genes para proteínas de interés (Daniell y otros., 2002) se ha convertido en una tecnología con considerable potencial.

Ingeniería metabólica

Es posible alterar rutas metabólicas para permitir que las plantas, o sus células, funcionen como biorreactores (reactores biológicos); y de esta manera, estimular la producción de sustancias de valor farmacológico, como por ejemplo, vacunas y biofármacos

Se han desarrollado diversos métodos como la sobreexpresión de enzimas requeridas para la síntesis de los productos deseados, la canalización del flujo metabólico hacia el producto de interés, creación de nuevas rutas en

las redes metabólicas existentes, que pueden favorecer la acumulación de compuestos que no son normalmente producidos en ciertas especies de plantas.

Guttman y *otros.*, 2004 determinaron que nuevas sustancias químicas eran sintetizadas mediante la transferencia de genes biosintéticos de *Catharanthus roseus* a un cultivo celular de *Nicotiana tabacum* con el objetivo de introducir nuevas rutas metabólicas. Los nuevos perfiles metabólicos se comprobaron mediante el uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución y electroforesis capilar.

CONCLUSIÓN

Son innumerables los trabajos de investigación que buscan obtener metabolitos secundarios de plantas de interés farmacológico. Desde los más tradicionales que incluyen el cultivo *in vitro* tejidos indiferenciados como callos o células, pasando por cultivo de raíces transformadas, hasta lo de última generación que incluye la biotransformación, hasta el momento se han encontrado pocos resultados exitosos y otros que sí lo son y que justifican los esfuerzos realizados y avizoran futuro promisorio en el tema. Es el caso de los grupos de investigación que han desarrollado nuevas estrategias para la obtención de compuestos antitumorales como el paclitaxel de especies de *Taxus* (Ketchum y *otros.*, 1999), podofilotoxinas de *Podophyllum peltatum* (Kutney y *otros.*, 1991), camptotecina de *Camptotheca acuminata* (Wiedenfeld y *otros.*, 1997) así como vinblastina y vincristina de *Catharanthus roseus* (Verpoorte y *otros.*, 1997)

Bibliografía

- Arora, J, Goyal S, Ramawat KG. 2010. Enhanced stilbene production in cell cultures of *Cayratia trifolia* through co-treatment with abiotic and biotic elicitors and sucrose. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 46:430-436
- Boitel-Conti, M, Gontier E, Assaf C, Laberche JC, Ducrocq C, Sangwan-Norreel BS. 1997. Procédés de production de métabolites primaires et

- secondaires a partir d'organes végétaux cultivés in vitro. Patent: France no. FR 97 00641
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Review Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161 (2001) 839–851
 - Bresciani LFV, Yunes RA, Bürguer C, De Oliveira LE, Bof KL, Cechinel-Filho. 2004 Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Z Naturforsch* 59c: 229-232.
 - Canter, PH, Thomas H, Ernst E. 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology* 23:180-185
 - Croteau R, Kutchan TM, Lewis NM. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). En “Biochemistry and Molecular Biology of Plants”, Buchanan B, Grissem R, Jones R, (Eds). American Society of Plant Physiologists. EU.
 - Daniell H. 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat Biotechnol.* 20(6):581-6.
 - Fett-Neto, AG, Dicosmo F, Reynolds WF, Sakata K. 1992. Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Biotechnology* 10:1572-1575
 - Fett-Neto, AG, Melanson SJ, Nicholson SA, Pennington JJ, Dicosmo F. 1994. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell culture of *Taxus cuspidate*. *Biotechnol Bioeng* 44:967-971
 - Fiehn, Oliver. 2002 .Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155–171, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
 - Goldhaber-Pasillas GD, Mustafa NR, Verpoorte R. *Molecules*. 2014. Jul 15;19(7):10242-60. doi: 10.3390/molecules190710242. Jasmonic acid effect on the fatty acid and terpenoid indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*.
 - Guttman, A, Khandurina J, Budworth P, Xu W, Hou Y-M, Wang X. 2004. Analysis of combinatorial natural products by HPLC and CE. *PharmaGenomics* 4:32- 42

- Kargi y Rosenberg, 1987. Plant Cell Bioreactors: Present Status and Future Trends Biotechnology Progress Volume 3, Issue 1, pages 1–8, March 1987
- Ketchum, R, Gibson D, Croteau R, Shuler ML. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotech Bioeng* 62:97-105
- Komaraiah, P, Ramakrishna SV, Reddanna P, Kavi Kishor PB. 2003. Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and in situ adsorption. *Journal of Biotechnology* 101:181-187
- Kreis, W. 2007. In-vitro culturing techniques of medicinal plants. En: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*, pp. 157-185. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Kutney, JP, Arimoto M, Hewitt GM, Jarvis TC, Sakata K. 1991. Studies with plant cell cultures of *Podophyllum peltatum* L. I. Production of podophyllotoxin, deoxypodophyllotoxin, podophyllotoxone, and 4'-demethylpodophyllotoxin. *Heterocycle* 32:2305-2309
- Liu, X-N, Zhang X-Q, Zhang S-X, Sun J-S. 2007. Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 91:1-7
- Paek, KY, Chakrabarty D, Hahn EJ. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81:287-300
- Pérez-Alonso, Naivy, Jiménez, Elio .2011 .Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal* Vol. 11, No. 4: 195 – 211
- Roberts SC, Shuler ML. 1997. Large-scale plant cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 8: 154–159
- Saito, K, Yamazaki M, Shimomura K, Yoshimatsu K, Murakoshi I. 1990. Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes
- Sales, E, Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Segura J. 2007. Enhancement of cardenolide and phytosterol levels by expression of an N-terminally

- truncated 3- hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in transgenic *Digitalis minor*. *Planta Medica* 73:605-610
- Vanisree, M, Lee C-Y, Lo S-F, Nalawade SM, Lin CY, Tsay H-S. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sinica* 45:1-22
 - Vanisree, M, Tsay H-S. 2007. Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. En: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*, pp. 267-285. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
 - Verpoorte, R, van der Heijden R, Moreno PRH. 1997. Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells. En: Cordell GA (Ed) *The alkaloids*, pp. 221-299. Academic Press, San Diego
 - Wiedenfeld, H, Furmanowa M, Roeder E, Guzewska J, Gustowski W. 1997. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 49:213-218
 - Wilken, D, Jiménez E, Hohe A, Jordan M, Gómez R, Schmeda G, Gerth A. 2005. Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, pp. 525–537. Springer, Dordrecht
 - Wink, M. 2007. Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*, pp. 97-116. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
 - Yang, C, Chen M, Zeng L, Zhang L, Liu X, Lan X, Tang K, Liao Z. 2011. Improvement of tropane alkaloids production in hairy root cultures of *Atropa belladonna* by overexpressing *pmt* and *h6h* genes. *Plant Omics Journal* 4:29-33
 - Yuliana, Nancy Dewi, Khatib, Alfi, Choi, Young Hae, Verpoorte, Robert. 2011. *Metabolomics for Bioactivity Assessment of Natural Products. Review. Phy totherapy Research*
 - Zhu, Q, Wu F, Ding F, Ye D, Chen Y, Li Y, Zhifan Y. 2009. *Agrobacterium-mediated transformation of Dioscorea zingiberensis*

Wright, an important pharmaceutical crop. *Plant Cell Tiss Organ Cult*
96:317-324

CAPÍTULO 11

NUEVAS PLANTAS...NUEVAS SOLUCIONES

MEJORAMIENTO POR MODIFICACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS. EL APOYO DE LAS TÉCNICAS DE CTV.

Clara Bisio

Introducción

Mejoramiento Genético Vegetal. Objetivos e importancia económica.

El constante crecimiento de la población y la creciente demanda de alimentos para sostenerla han hecho necesario disponer de alimentos y materias primas industrializables en mayor cantidad y calidad, por unidad de superficie cultivable. Los notorios resultados prácticos alcanzados en los últimos años mediante la mejora genética de plantas en la producción de especies cultivadas, han demostrado la importancia de esta ciencia, ya universalmente reconocida y aceptada.

El objetivo principal del mejoramiento genético vegetal es incrementar la producción y la calidad de los productos agrícolas por unidad de superficie, en el menor tiempo, con el mínimo esfuerzo y al menor costo posible. Esto se logrará mediante la obtención de nuevas variedades o híbridos de alto potencial, es decir, que produzcan más grano, más forraje, más fruto, o más verduras en la menor área de terreno posible, y que se adapten a las necesidades del agricultor y consumidor. Con esto se espera contribuir sustancialmente a una mayor productividad agrícola.

Avances biotecnológicos

Las diferentes técnicas biotecnológicas, tales como el cultivo de células en suspensión, fusión de protoplastos y el cultivo de anteras, entre otras, son herramientas de gran utilidad para el mejoramiento genético de plantas, principalmente de aquellas en las que es difícil su propagación por semilla. Los avances de la biotecnología en algunos cultivos han sido muy rápidos, en poco tiempo se pueden producir mutaciones específicas, fusionar o transformar cualquier célula y de entre miles de células tratadas, hacer selección de aquellas que tengan posibilidades de regenerar plantas nuevas con las características deseadas (Robert, 1985). Es posible también aprovechar la variación que ocurre en las diferentes técnicas de cultivo de tejidos como el de protoplastos y recuperar plantas de diferentes genotipos en menor tiempo que con técnicas tradicionales (Krikorian, 1991).

Los programas de fitomejoramiento actuales, apoyados en la ingeniería genética, se proponen aumentar el rendimiento, disminuir las pérdidas ocasionadas por plagas y enfermedades y reducir los costos de producción (Nieto-Jacobo y otros., 1999). Por lo anteriormente mencionado puede decirse que el potencial de la biotecnología moderna aplicada al mejoramiento genético de plantas tiene un valor incalculable y claramente ya ha revolucionado la producción agrícola y animal (Fernandez, 2001).

Técnicas de mejoramiento

1. Selección artificial y cruzamientos selectivos: El hombre selecciona las plantas que le ofrecen más ventajas y realiza cruzamientos selectivos entre esas variedades para obtener descendencia con mejores rendimientos.

2. Hibridación (intervarietal, interespecífica, intergenérica): El hombre realiza cruzamientos no solo entre diferentes variedades de una misma especie, sino también interespecíficos (entre especies) e inclusive intergenéricos (entre diferentes géneros). Estos cruzamientos generan híbridos sexualmente

compatibles que dan como resultado una descendencia cuya combinación de genes será al azar, diferente de los progenitores.

3. Mutagénesis inducida: Por medio del uso de sustancias químicas o radiación se inducen mutaciones al azar en el genoma de las plantas que generan cambios, los cuales permiten luego seleccionar aquellos individuos que presenten las características deseadas.

4. Polinización y Fertilización *in vitro*: El hombre puede atravesar las barreras sexuales entre organismos de diferentes especies y géneros a través de la polinización (traslado del polen que contiene las gametas masculinas de la planta, hacia la estructura reproductiva femenina). Para esto, se aprendió a polinizar artificialmente las plantas gracias a las técnicas de fertilización *in vitro* de gametas aisladas las cuales se combinaron con técnicas como el cultivo de óvulos y rescate temprano de embriones bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

5. Cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales: Es un conjunto de técnicas que involucran el cultivo aséptico de células, tejidos u órganos, en medios sintéticos de cultivo y bajo condiciones ambientales controladas. El cultivo *in vitro* es posible debido a que las plantas tienen una propiedad denominada totipotencialidad celular: toda célula viva e íntegra de una planta, sin importar el grado de especialización alcanzado, es capaz de regenerar una planta entera igual a la original.

6. Obtención de haploides: Cultivo *in vitro* de estructuras sexuales haploides que generan organismos haploides, los cuales pueden contener caracteres agronómicos importantes. Esta técnica se suele complementar con técnicas de diploidización para restaurar la estructura cromosómica original dando así organismos doblehaploides (DH). Estas herramientas permiten acortar el tiempo requerido para la obtención de nuevas variedades, así como también para encontrar genotipos raros especialmente en el caso de caracteres recesivos, ya que no quedan enmascarados por alelos dominantes. Esta técnica resulta un buen complemento para programas de mejoramiento tradicionales. (Ver capítulo 6)

7. Variación somaclonal: Mediante cultivo de células o tejidos *in vitro* es posible generar variación de origen celular y/o citoplasmática que puede ser utilizada para el mejoramiento vegetal. (Ver capítulo 9)

8. Ingeniería genética: Las técnicas tradicionales de hibridación mezclaron durante años miles y miles de genes y muchas generaciones de plantas con el fin de obtener una característica deseada. La biotecnología acelera este proceso permitiendo a los científicos tomar solamente los genes deseados e introducirlos en las plantas, logrando de ese modo los resultados buscados en tan sólo una generación. La ingeniería genética es una herramienta más segura y eficiente para el mejoramiento de especies respecto de las técnicas tradicionales, puesto que elimina gran parte del azar presente en el mejoramiento tradicional. Asimismo, a través de esta tecnología es posible modificar la expresión de genes presentes en el genoma de la planta.

Esta metodología ofrece tres ventajas fundamentales respecto a las técnicas convencionales de mejora genética basadas en la hibridación:

1. Los genes que se van a incorporar pueden provenir no sólo de otras especies vegetales muy alejadas desde el punto de vista evolutivo sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales.
2. En la planta mejorada genéticamente se puede introducir un único gen nuevo sin alterar el fondo genético, es decir, preservando en su descendencia el resto de los genes de la planta original.
3. Este proceso de modificación demora mucho menos tiempo que el necesario para el mejoramiento por cruzamiento.

La transformación genética también constituye una herramienta útil para estudios básicos que permiten conocer y/o profundizar acerca de la estructura y función de genes específicos, aspecto particularmente relevante en la era genómica.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

Requerimientos para la obtención de plantas transgénicas

Para todas las técnicas de transformación desarrolladas hasta el momento es necesario disponer del transgen a introducir y de una metodología eficiente para su transferencia al genoma vegetal. Luego se induce el desarrollo de plantas mediante distintas técnicas de cultivo de tejidos y se procede al análisis molecular de las plantas regeneradas *in vitro* para identificar aquellas que porten y expresen el o los transgenes en los niveles deseados. Finalmente, mediante experimentos de campo y laboratorio se estudia el comportamiento de los individuos transgénicos y su descendencia.

Por lo tanto, los elementos básicos que se requieren en trabajos de transformación genética en plantas son:

1. Un sistema eficiente de cultivo de tejidos que permita regenerar plantas completas y fértiles.
2. Vectores apropiados, que permitan el clonado del gen de interés y su transferencia al tejido blanco de transformación.
3. Un protocolo de transformación, es decir, un sistema de transferencia de genes y de selección del material transformado.
4. Herramientas de análisis molecular para detectar la presencia del transgen y los productos del mismo en la planta.

Un transgen está compuesto por una secuencia codificante (región traducible comprendida entre los codones de iniciación y terminación de la traducción) y por secuencias regulatorias que determinan tanto el momento del desarrollo de la planta como el tejido y el nivel en el que se expresará.



Fig. 1: Estructura molecular del transgén. Fuente: Diaz y otros, 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II.

Métodos de transformación

La pared celular constituye un obstáculo para la entrada del ADN a la célula que todos los métodos de transformación genética tienen que superar de algún modo. Estos métodos pueden dividirse en:

- a) Transformación mediada por *Agrobacterium*, vector biológico que participa del proceso de transferencia (Fig. 2).
- b) Métodos de transformación genética directa, también llamados físicos, mediante los cuales, por distintos mecanismos no biológicos, se introduce el ADN en la célula (Fig. 2).

Transformación mediada por *Agrobacterium*

Las bacterias del género *Agrobacterium* son Gram-negativas, aeróbicas obligadas y viven en el suelo. Ellas son capaces de desarrollar un crecimiento saprofito o parasítico. El género comprende cuatro especies fitopatogénicas, dos de ellas ampliamente estudiadas (*A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*). Ambas especies son capaces de infectar una amplia variedad de especies de dicotiledóneas. La patogénesis se inicia a partir de heridas, provocando la proliferación de las células individuales infectadas. Así, *A. tumefaciens* causa tumores, enfermedad que se conoce como 'agalla de la corona' y *A. rhizogenes* induce la proliferación de raíces dando lugar a la enfermedad denominada 'raíz en cabellera'. La capacidad patogénica de estas bacterias está asociada a la presencia de megaplásmidos llamados Ti (por 'tumor-inducing'). El T-ADN contiene genes, llamados oncogenes,

que se expresan eficientemente en la célula vegetal infectada y producen síntesis de hormonas vegetales, responsables de la proliferación anormal del tejido. Además, contiene los genes responsables de la síntesis de opinas (fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria).

Más de 600 especies vegetales son hospedantes naturales de *A. tumefaciens*. Estas son en su mayoría dicotiledóneas y gimnospermas y más raramente monocotiledóneas.

La transformación con *A. rhizogenes* tiene fundamentalmente dos aplicaciones: la producción de raíces con alta tasa de crecimiento capaces de sintetizar metabolitos secundarios como productos farmacéuticos, aditivos alimentarios y cosméticos y por otra parte representa una valiosa herramienta para la estimulación de la rizogénesis en especies recalcitrantes, por ejemplo leñosas.

Transformación directa o por métodos físicos

La primer metodología de transformación genética de plantas desarrollada fue la de *A. tumefaciens*, pero no resultó inicialmente de utilidad para abordar la transformación de especies de gran importancia económica como los cereales, debido a que éstos no son hospedantes naturales de esta bacteria. Esta situación condujo al desarrollo de los métodos físicos de transformación. En ellos el transgen es introducido en la célula vegetal mediante distintas técnicas; tales como la transformación de protoplastos y el bombardeo de micropartículas. Este último es un proceso por el cual micropartículas cubiertas con ADN son aceleradas por un gas comprimido e introducidas en células vegetales. Como blanco de bombardeo se pueden emplear diversos tipos de explante vegetal, desde células o protoplastos hasta plántulas completas, pasando por tejidos organizados en embriones y meristemas.

Esta técnica, sin embargo, tiene limitaciones. Algunas especies oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas, dada por cutículas endurecidas, paredes celulares lignificadas o superficies vellosas. Sin embargo la principal limitación del método continúa siendo la baja relación entre el total de

células sometidas al bombardeo y el número de células que logran incorporar de manera permanente el transgen. Este método, conocido también como biolística, ha demostrado ser una buena opción para la producción de plantas transgénicas de soja, sorgo, papaya, espárrago, caña de azúcar y trigo, entre otras.

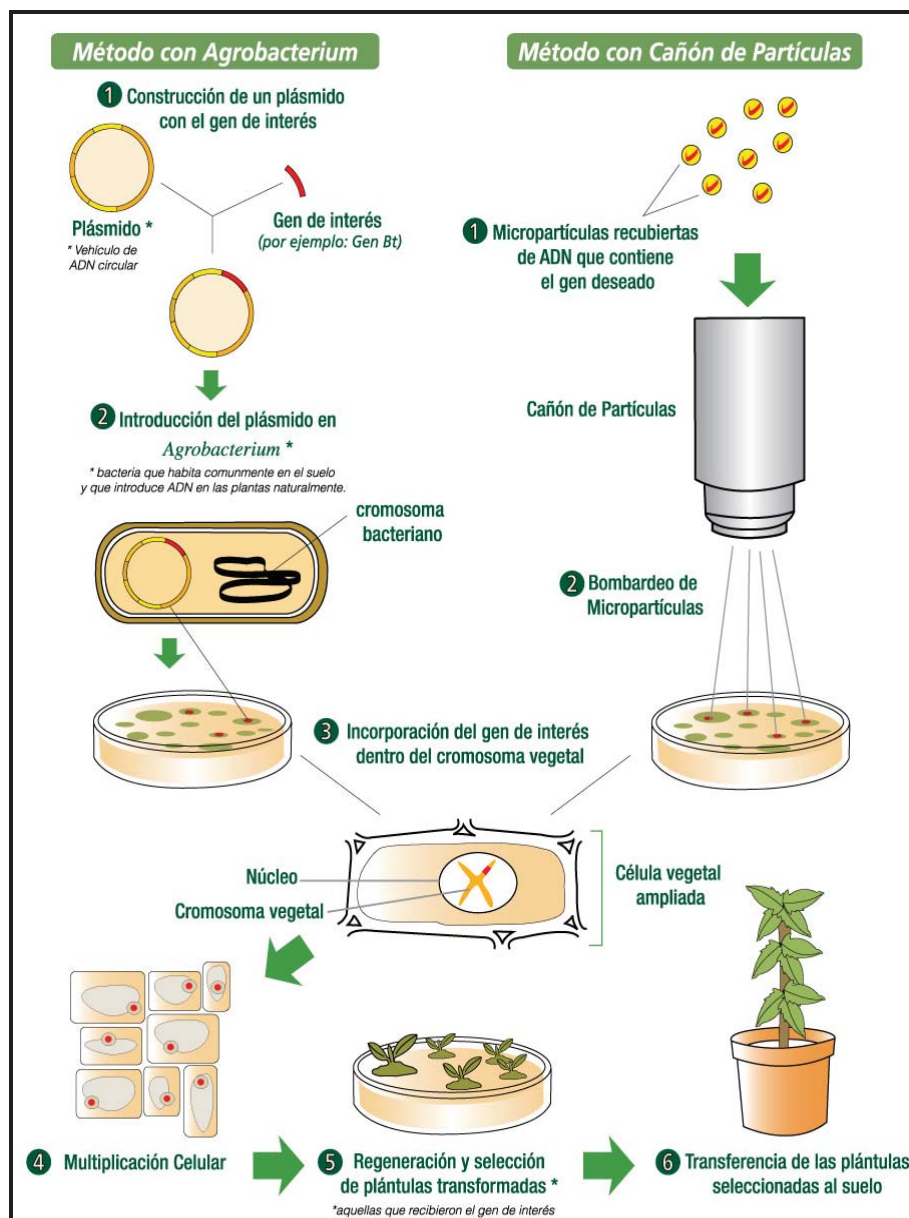


Fig. 2. Métodos de transformación genética. Fuente: Plants, Genes, and Crop Biotechnology, Maarten J. Chrispeels and David E Sadava. (Adaptación)

PARTE PRÁCTICA

Transformación vía *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria patógena que provoca la enfermedad denominada raíces en cabellera, cuyo síntoma más directo y notorio es la proliferación de raíces en el sitio de infección. Además, provoca otros efectos en dicotiledóneas, como enanismo, ruptura de dominancia apical tanto en tallos como raíces, alteración de la forma de las flores y las hojas, mayor capacidad de enraizamiento, disminución en la producción de polen y semillas y en algunos casos esterilidad.

Los genes responsables de estas alteraciones fenotípicas se denominan *rol* y se los conoce como *rol: A, B, C y D*. El gen *rol A* es el responsable de la formación de hojas arrugadas, entrenudos cortos y cambios en el metabolismo de poliaminas. El gen *rol B* tendría relación con la liberación de auxinas. El gen *rol C* produce un fenotipo similar al obtenido por la adición de citocininas, interrumpiendo la dominancia apical y acortando los entrenudos. La acción del gen *rol D* está ligada a la elongación de las raíces.

Dada la capacidad de las raíces producidas por la infección de *A. rhizogenes* de generar meristemas gemíferos, a partir de su cultivo en un medio adecuado, es posible la regeneración de plantas portadoras de los genes que inducen al fenotipo descrito en el párrafo anterior (Godo y otros, 1997).

Objetivo

Familiarizarse con la técnica de transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes*. La misma comprende los siguientes pasos:

- 1- Preparación de los explantos vegetales.
- 2- Agroinfección.
- 3- Co-cultivo.
- 4- Eliminación de las agrobacterias.

- 5- Cultivo de los explantos agroinfectados.
- 6- Detección de potenciales eventos de transformación.

Materiales necesarios

- Explantos vegetales (hojas de *Nicotiana tabacum*)
- Agrobacterias (Cepa de *Agrobacterium rhizogenes*)
- Placas de Petri estériles.
- Agujas estériles.
- Pinza y bisturí.
- Placas conteniendo 30 ml de medio semisólido MS 0,5X, sin reguladores de crecimiento ni antibióticos adicionados.
- Placas conteniendo 30 ml de medio semisólido MS suplementado con *Cefotaxima* (antibiótico) 500mg/L.

Procedimiento

Se elegirán como tejido blanco a transformar mitades de hojas en buen estado fitosanitario y totalmente desarrolladas de *Nicotiana tabacum*.

La agroinfección se llevará a cabo provocando heridas en los explantos con una aguja embebida en la suspensión bacteriana de *Agrobacterium rhizogenes* proveniente de un cultivo líquido en agitación de 48 hs. en oscuridad. Se pondrá atención en embeber la punta de aguja con la suspensión antes de efectuar cada herida a fin de asegurar una buena carga de inóculo para cada injuria. Se deben efectuar varias heridas por explanto.

Una vez inoculados los explantos, los mismos serán sembrados y cultivados durante 4 días en la oscuridad a 22°C, en placas de petri conteniendo medio semisólido MS 0,5X y libre de reguladores de crecimiento y antibióticos. (Solidificar con 7,5 g/L de Agar tipo A y ajustar pH a 5,7).

Luego del cocultivo directo los explantos serán lavados en medio MS 0,5X líquido suplementado con 500 mg/L de Cefotaxima (inmersión durante 10 min), posteriormente serán enjuagados 3 veces con agua destilada estéril, por último se

dejarán secar sobre papel de filtro estéril bajo campana de flujo laminar y se transferirán a placas de Petri conteniendo medio MS 0,5X suplementado con 500 mg/L de Cefotaxima libre de reguladores de crecimiento (Solidificar con 7,5 g/L de Agar tipo A y ajustar pH a 5,7).

La detección de los potenciales eventos de transformación se realizará luego de haber transcurridos varios días luego de la infección, cuando se puedan observar detenidamente los explantos e identificar aquellos que presenten callos y/o raíces.

Realizar la toma de datos necesaria para todo ensayo de transformación y calcular eficiencias finales (Número de explantos incluidos en el ensayo, % de explantos con respuesta satisfactoria, % de explantos sin respuesta, número de explantos perdidos por sobrecrecimiento de *Agrobacterium*, etc.).

Bibliografía

- Bhat S., Srinivasan S. 2002. "Molecular and genetics analyses of transgenic plants: considerations and approaches". *Plant Science* 163:673-681.
- Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. 2004. ArgenBio. Editores: Echenique V., Rubistein C., Mroginsky L., Ediciones INTA.
- Birch R. 1997. "Plant transformation: Problems and strategies for practical applications". *Annu. Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 48: 297-326.
- Castañon Nájera G. La Biotecnología y el Mejoramiento Genético Vegetal. Kuxulkab, Revista de divulgación. Vol. VII Número 14.
- Conci V.C. 1997. Virus y Fitoplasmas de ajo. In Burba J.L. (ed). 50 temas sobre producción de ajo. EEA-INTA La Consulta, Mendoza, Argentina. Vol. 3. pp 267-293.
- Conci V.C. y Nome S.F. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *J. Phytopathology*, 132, 189-192.
- Conci V.C. 2004. Obtención de plantas libres de virus. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L .eds.). Ediciones INTA. pág. 303-312.

- Diaz, M. L., Zappacosta, D. C., Franzone, P.M. y. Ríos, R. 2010. Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. (Levitus,G., Echenique V., Rubistein C., Hopp, E. ,Mroginsky L.eds.) .Ediciones INTA. Parte II, capítulo 6, pág. 243- 257.
- Fernandez, P. J. A. 2001. Un gran peligro para la vida sobre el planeta: Los OGM-Organismos Genéticamente Modificados. La Ingeniería Biogenética.
- Gella Fañanas R. 1993. Obtención de planta certificada. Servicio de Investigación Agraria.
- Gelvin S. 2003. “Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool”. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Mar. 2003: 16–37.
- Godo, T., Tsujii, O., Ishikawa, K. y Mii, M. 1997. Fertile transgenic plants of *Nierembergia scoparia* Sendtner obtained by a mikimopine type strain of *Agrobacterium rhizogenes*. Sci. Hort: 68: 101-111.
- Israel Giovanni González M. Métodos de transformación en plantas mediado por *Agrobacterium tumefaciens* y bombardeo de partículas “biolística”. Universidad de Pamplona.
- Krikorian, A. D. 1991. Estabilidad genotípica de células, tejidos y plantas derivadas de cultivo in vitro. Capítulo 13. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones.
- Nieto-Jacobo, MA. F., A. Guevara-García y L. Herrera Estrella. 1991. Plantas transgénicas. Investigación y Ciencia. 267:70-80.
- Robert, M. L. 1985. El potencial del cultivo in vitro de células vegetales en el mejoramiento genético de plantas. 89-110. En:El cultivo de tejidos en Mexico: M. Robert y V. M. Loyola Vargas, Comps. Centro de investigación científica de Yucatán (CICY), Mérida, Yucatán.
- <http://www.monografias.com/trabajos53/mejoramamiento-plantas/mejoramamiento-plantas2.shtml#ixzz32r1V3mSV>

CAPÍTULO 12

MEJOR SANITAS....

PLANTAS LIBRES DE VIRUS

Clara Bisio y María de los Angeles Basiglio Cordal.

Los virus de plantas son responsables de importantes pérdidas en los rendimientos, llegando a ser en algunos casos limitantes para el cultivo. La mayoría de ellos no se transmiten por semilla, por lo tanto, las especies que se multiplican por esta vía, tienen la posibilidad de liberarse de estos patógenos en forma natural. Por otra parte, las especies que se propagan exclusivamente en forma agámica no tienen esta ventaja. Cuando son infectadas sistémicamente por virus, estos son transmitidos desde la planta madre a la descendencia con alta eficiencia. Esta situación permite que la infección continúe de generación en generación y se disemine a diferentes regiones a través del comercio de estos propágulos (bulbos, tubérculos, esquejes, etc.). Ejemplo de ello son ajo, frutilla, frutales de carozo o pepita, yuca, papa, batata y numerosas especies ornamentales.

En estos casos, la obtención y multiplicación de plantas libres de virus por medios artificiales juega un papel importante para mejorar la producción y calidad. Una larga lista de especies han sido liberadas de virus a través de la regeneración de plantas *in vitro*. El sistema más frecuentemente utilizado y con mayores éxitos, es el cultivo de meristema suplementado, en algunos casos, por tratamientos de termoterapia o quimioterapia (Conci, 2004).

Localización de los virus en las plantas

Los virus en las plantas no están uniformemente distribuidos. En las infecciones sistémicas, algunos están limitados a:

- El floema
- A pocas células parenquimáticas adyacentes
- Todas o casi todas las células de la planta

- Sólo unos pocos invaden el tejido meristemático. *Los meristemas suelen tener pocos o ningún virus.*

Métodos para obtener plantas libres de virus

1. Cultivo de meristemas

Esta técnica consiste en aislar el meristema y sembrarlo en un medio de cultivo adecuado y bajo condiciones ambientales muy estrictas, para que posibilite el desarrollo de una planta completa. En la mayoría de los casos, se siembra el domo meristemático acompañado por uno o dos primordios foliares (Fig. 3).

En general se considera que las plantas provenientes del cultivo de meristema son idénticas, u homólogas, a la planta madre de donde se extrajo el explanto.

2. Termoterapia

Muchos virus han sido eliminados por medio de esta técnica. Los materiales usados para los tratamientos pueden ser partes vegetales en dormancia, o bien en crecimiento vegetativo. En el primer caso se suele utilizar agua caliente (35 a 54 °C) durante minutos u horas, según los casos. Para los restantes el calor se aplica mediante aire (35 a 42 °C).

La termoterapia puede utilizarse combinada con el cultivo de meristemas, siendo a veces la única posibilidad de regenerar plantas libres de virus. En los casos en que no es imprescindible, permite aumentar el tamaño de los explantos mejorando la tasa de regeneración de plantas.

3. Quimioterapia

El uso de antivirales sería la solución definitiva para estas enfermedades, sin embargo hasta ahora no se ha encontrado un compuesto así. Algunas sustancias químicas ocasionan una disminución en la concentración de virus, y atenúan o suprimen los síntomas que produce la infección, pero suspendido el tratamiento se recupera la concentración viral. Se han evaluado diferentes sustancias, la más utilizada es la Ribavirina (1-β-D-ribofuranosyl-1,2, 4-triazole-3-carboxamide, Virazole™ es el nombre comercial). Sin embargo un problema importante con este compuesto es su fitotoxicidad, que depende de la dosis empleada y de la especie tratada. El éxito del proceso en muchos

casos requiere de varios meses de tratamiento y la fitotoxicidad puede constituir una dificultad.

4. Electroterapia

El método consiste en aplicar corriente eléctrica a yemas por un período variable de tiempo para obtener plantas libres de patógenos. Se supone que la aplicación de electricidad produce la degradación de las partículas y pérdida de infectividad. Esta técnica ha sido implementada para liberar de mosaico al almendro cv Caetanuccia. En este caso, brotes de 9,6 mm se sometieron a 500 V por tiempos variables y luego se injertaron sobre pies sanos (obtenidos por semilla). Con 5 minutos de tratamiento los resultados fueron buenos y con 20 minutos se obtuvo completa inactivación viral. El método también ha sido empleado para eliminar bacterias de caña de azúcar, Potato leaf roll virus de papa, Dasheen mosaic virus de aráceas y Banana streak virus de banana, entre otras (Conci, 2004). La eficiencia de la técnica puede depender del cultivar, el patógeno y el genotipo.

5. Tratamiento con frío

En algunos pocos casos citados el tratamiento con frío parece tener un efecto similar al de la termoterapia para eliminar virus de plantas.

Factores que pueden afectar la producción de plantas libres virus

Varios factores pueden afectar el desarrollo *in vitro* de una planta a partir de un meristema:

- El medio de cultivo empleado.
- Localización y estado fisiológico del explanto.
- Tamaño del explanto.
- La concentración de hormonas endógenas.
- Las contaminaciones internas o externas producidas durante el desarrollo del cultivo.



Fig 3. Eliminación de virus en especies de papas mediante cultivo de meristema.
Fuente: http://www.cia.ucr.ac.cr/?page_id=121

CULTIVO DE MERISTEMAS:

Los meristemas son grupos de células indiferenciadas que retienen la capacidad de dividirse durante todo el ciclo de vida de una planta, determinan su crecimiento y dan origen a todos sus órganos. En la actualidad, se sabe que los meristemas vegetales están libres de contaminantes endógenos que afectan el resto del cuerpo de una planta. La ausencia de contaminantes es un prerequisite que asegura el adecuado crecimiento y alta productividad de las especies vegetales de interés comercial.

El cultivo de tejidos posibilita el saneamiento de las plantas multiplicadas vegetativamente. El cultivo de meristemas *in vitro* permite, en gran cantidad de casos, el establecimiento de cultivos libres de patógenos.

En los primeros estadios del desarrollo embrionario vegetal la división celular tiene lugar en todo el organismo, pero a medida que el embrión se desarrolla y se transforma en una planta adulta la adición de nuevas células se restringe a ciertas partes de la misma, mientras que el resto de la planta se especializa en otras actividades específicas. Los meristemas incluyen meristemas de raíz, de tallo (principales y laterales) e intercalares, así como también el engrosamiento de meristemas primarios y meristemas secundarios, como lo son el felógeno y el cambium. El meristema apical de tallo da lugar a diversos tipos de células, tejidos y órganos (Wolff ,1759) citado en Hurtado y Merino,1987). Esau (1976, citado en Hurtado y Merino, 1987) reconoció que esta región indiferenciada daba origen al crecimiento de la planta.

La técnica de “cultivo de meristemas” consiste en el aislamiento del domo apical, más uno o dos primordios foliares (Fig.1).

El cultivo de meristemas fue utilizado en un inicio, para la eliminación de hongos y bacterias en plantas, y poco después, para la producción de plantas libres de virus. En la actualidad se obtienen los mejores resultados al combinar la termoterapia, la quimioterapia y la electroterapia con el aislamiento y el cultivo de meristemas y la subsecuente regeneración de plantas completas. Se han observado grandes diferencias en el porcentaje de plantas libres de virus en relación al tamaño del meristema aislado. En general, entre menos primordios foliares tenga el ápice meristemático, mayor es el porcentaje de plantas libres de virus producidas, sin embargo, existen evidencias de que el domo aislado sin primordios difícilmente se desarrolla hasta planta completa.

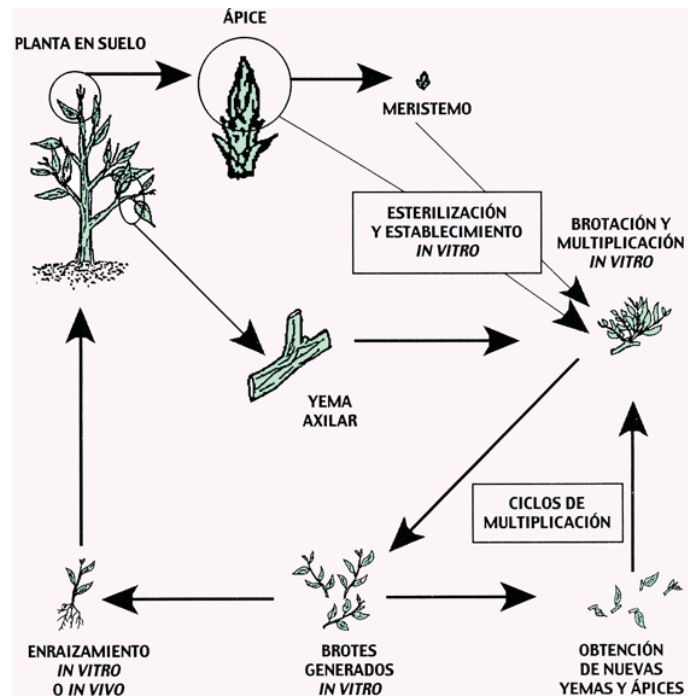


Fig. 1: Sistema de propagación por cultivo de meristemas o yemas

Fuente: Martín y otros, 1999

http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/2013/203024/leccin_321_cultivo_de_meristemas.html

Parte Práctica

Cultivo de meristemas

Tipo de Explante: domo meristemático de cualquier especie disponible, según la época del año.

Metodología:

A- Desinfección del tejido:

-Remover de la planta, secciones juveniles de tallo de aproximadamente 5 cm de largo.

-Retirar las hojas.

-Colocar en solución de etanol 70% durante 2 minutos.

-Colocar en solución de hipoclorito de sodio 30% durante 30 minutos.

-Enjuagar tres veces con agua estéril, bajo campana de flujo laminar.

B- Disección de ápices meristemáticos: este trabajo debe realizarse en forma aséptica (bajo campana de flujo laminar).

-Esterilizar los instrumentos a utilizar (bisturí, agujas, pinzas).

-Limpiar la lupa y el área de disección con una solución de etanol 70%.

-Sostener el tallo desinfectado con una pinza estéril y observarlo bajo la lupa.

-Remover las hojas externas con un bisturí hasta llegar al domo meristemático (se observa como un punto brillante).

-Hacer cuatro cortes en ángulos iguales, remover el domo con dos primordios y depositarlo suavemente en el medio de cultivo.

-Incubar los meristemas en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

Aplicaciones de la técnica

* Obtención de plantas libres de patógenos.

** Mantenimiento de plantas libres de enfermedades

*** Clonación

**** Conservación de germoplasma

Bibliografía

- Conci V.C. 1997. Virus y Fitoplasmas de ajo. In Burba J.L. (ed). 50 temas sobre producción de ajo. EEA-INTA La Consulta, Mendoza, Argentina. Vol. 3. pp 267-293.
- Conci V.C. y Nome S.F. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *J. Phytopathology*, 132, 189-192.
- Conci V.C. 2004. Obtención de plantas libres de virus. *Biología y Mejoramiento Vegetal*. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L .eds.). Ediciones INTA. pág. 303-312.
- Hurtado, MV; Merino, ME. 1987. *Cultivo de tejidos vegetales*. México, Trillas. 232 p.

CAPÍTULO 13

¿BANCOS PARA GUARDAR PLANTAS?

CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

Fernanda Gugole

Métodos de conservación de germoplasma

La conservación de germoplasma vegetal como actividad científica fue propuesta en los años '70 con el objetivo de prevenir la erosión genética y mejorar la productividad agrícola de muchas especies a partir de la conservación de diferentes especies y genes de interés. Existen dos estrategias básicas para la conservación de germoplasma vegetal, la conservación *in situ* y la conservación *ex situ* (Nodarse y otros., 1998). Estas dos modalidades son complementarias y permiten garantizar la conservación del patrimonio genético de las especies y sus poblaciones, en el mediano y largo plazo.

Conservación *In Situ*

El Convenio sobre la Diversidad Biológica, define que la conservación *in situ* “es la conservación, mantención y recuperación de poblaciones viables en sistemas dinámicos y evolutivos del hábitat original, bosques, praderas, etc. o, en el caso de especies cultivadas, en el entorno en que hayan desarrollado sus características” (Frankel & Soulé, 1992).

Requiere de información básica para establecer una estrategia efectiva y es muy importante lograr una correcta identificación taxonómica de las especies (Given, 1994). Además, se deben confeccionar mapas de distribución de las

poblaciones y de las comunidades, con la caracterización de los hábitats y de los paisajes existentes (León, 1998).

Se distinguen tres tipos de conservación *in situ* de los recursos fitogenéticos Maxted y otros. (1997):

- La conservación de especies silvestres en bosques, praderas, etc. Se consideran las especies arbóreas, las forrajeras, las medicinales, las emparentadas a las cultivadas, las especies en peligro y aquellas “keystone” o emblemáticas para los ecosistemas (Frankel y otros., 1995).
- La conservación en granjas o fincas, de variedades locales o criollas en los sistemas agrícolas tradicionales. La misma permite también la conservación de especies ruderales y de malezas asociadas a los cultivos.
- La conservación en quintas también propone la conservación *in situ* en zonas agrícolas, pero se refiere a áreas menores, involucrando la conservación de ornamentales, frutales, medicinales, aromáticas, que típicamente se plantan para el uso doméstico.

Conservación Ex Situ

Implica la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales en las que la especie ha evolucionado. Las ventajas que proporcionan estos métodos son control directo sobre el material, fácil accesibilidad y disponibilidad (Reid & Miller, 1989).

El método de conservación de las especies vegetales depende del tipo de semillas que presente la especie de interés. Las especies se clasifican dependiendo del comportamiento de sus semillas durante el almacenamiento en:

- **Especies con semillas ortodoxas:** Estas semillas son tolerantes a la desecación (5% de contenido de agua o menos) y pueden ser almacenarse por períodos muy prolongados a baja temperatura (5°C a -20°C) y baja humedad

relativa. Especies como el maíz (*Zea mais*), chile, arroz (*Oriza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*) y muchas otras se incluyen en esta categoría.

- **Especies con semillas recalcitrantes:** Las semillas producidas se caracterizan por presentar un alto contenido de humedad a la hora de la cosecha. Son incapaces de resistir la desecación y generalmente son muy sensibles al frío. Cuando se almacenan bajo condiciones de alta humedad y temperaturas cálidas, permanecen viables solamente por pocas semanas o meses. Muchas especies de origen tropicales o subtropical, como el cacao (*Theobroma cacao*), aguacate (*Persea americana*), palmas, chayote (*Sechium edule*), mango (*Mangifera indica*) y coco (*Cocus nucifera*) entre otras, producen este tipo de semillas.

- **Especies con semillas intermedias:** Son especies que producen semillas que pueden tolerar la desecación, pero no resisten el almacenamiento a bajas temperaturas. Muchas especies tropicales presentan este tipo de semillas (Ellis y *otros.*, 1990).

La conservación de germoplasma *ex situ* tiene lugar en forma de colecciones de plantas y bancos de germoplasma (Withers y *otros.*, 1990; Rao, 2004; Quirós y *otros.*, 2008; Soengas y *otros.*, 2009), los cuales se describen a continuación:

Colecciones de plantas

Constituyen el método tradicional de conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Se pueden considerar tanto las colecciones de plantas en campo como en los jardines botánicos. En éstos últimos se almacena germoplasma de especies amenazadas en forma de colecciones de plantas.

La mayor desventaja de estas colecciones es que no aseguran el mantenimiento de los materiales a largo plazo, ya que están expuestas a plagas, enfermedades y desastres naturales, como sequías, inundaciones, fuego, etc. y debido a que están fuera de su hábitad natural, algunas veces las condiciones no son favorables para su crecimiento (Engelmann, 2000).

Banco de germoplasma

Dentro de esta categoría podemos distinguir bancos de semillas, bancos de polen, bancos de genes o bancos de ADN y bancos de cultivo *in vitro*.

- a) **Bancos de semillas:** Constituye uno de los procedimientos de conservación *ex situ* más válidos y extendidos en la actualidad. Es el método más recomendado para el almacenamiento de especies que presentan semillas ortodoxas como por ejemplo: arroz, trigo, avena, tabaco, tomate y lechuga. El almacenamiento a largo plazo constituye una operación relativamente simple y económica en términos de tecnología, infraestructuras, personal y gastos de mantenimiento (Maxted y otros., 1997).
- b) Los **bancos de polen** son otra opción para la conservación de especies raras o amenazadas. El almacenamiento se produce a bajas temperaturas. Resulta aplicable para especies con semillas ortodoxas y recalcitrantes; sin embargo, conservan sólo la mitad del genoma (Wang y otros., 1993).
- c) **Bancos de genes o ADN:** El ADN que se extrae de los individuos de una población se almacena a -80 °C en nitrógeno líquido. Esta técnica presenta como ventaja el manejo de pequeñas cantidades de material vegetal para su almacenamiento y la posibilidad de transferir genes a genotipos o especies relacionadas, además de utilizarse con especies amenazadas o incluso especies extintas. Se pretende facilitar el uso directo de los genes y las secuencias regulatorias existentes en los recursos genéticos, acelerar la identificación y clonación de genes valiosos existentes en los recursos genéticos (Irujo y Alegre, 2001).

Conservación *In vitro*

Los bancos de germoplasma *in vitro* son sitios para la conservación de los recursos genéticos en condiciones controladas de laboratorio y que involucran

diversas técnicas de cultivo y almacenamiento *in vitro*. En los mismos se busca maximizar la diversidad de ejemplares recolectados de poblaciones en campo o en su centro de origen. La unidad de colección que se mantiene en condiciones controladas puede ser la semilla botánica o explantes vegetativos, dependiendo principalmente del hábito de crecimiento de la especie (Rao, 2004, Wang y *otros.*, 2005, Tyagi y *otros.*, 2007).

Esta estrategia de conservación permite mantener al germoplasma libre de patógenos por medio de su propagación en condiciones asépticas y las plantas pueden ser rápidamente propagadas cuando se requiera, ya que los materiales también se mantienen bajo condiciones estériles y en un ambiente controlado. Una de las desventajas es el costo por la demanda de infraestructura y equipo especializado, además la estabilidad genética debe ser analizada periódicamente (Engelmann, 1997).

Las técnicas de cultivo *in vitro* presentan dos modalidades de conservación: Conservación a corto o mediano plazo, en este caso puede ser empleado el método de crecimiento mínimo, y la conservación a largo plazo o crioconservación, las cuales se detallan a continuación.

Método de crecimiento mínimo

El objetivo de este método es disminuir la actividad fisiológica y metabólica de los tejidos vegetales, modificando las condiciones de crecimiento y extendiendo el período entre subcultivos, permitiendo a los explantes permanecer *in vitro* hasta por 12 meses. Para ello se recurre a modificaciones medioambientales tales como la manipulación de la composición del medio de cultivo, la modificación de las condiciones de incubación y una combinación de ambas (Abdelnour Esquivel, 2011).

Medio de cultivo: La reducción en la concentración de elementos minerales y/o carbohidratos metabolizables (por ejemplo, sacarosa) en el medio de cultivo puede ser una estrategia importante para la reducción del crecimiento del explante (Engelmann, 1991; Rao, 2004). Otra medida puede ser aumentar las

concentraciones de gelificantes, aumentar el potencial osmótico del medio (mediante el uso de manitol o sorbitol, por ej.) y/o adicionar ciertos reguladores de crecimiento (ácido abscísico) o de otras sustancias (Cloruro de Magnesio) para reducir daños en el explante. Sin embargo en algunos casos se recomienda evitar el uso retardadores de crecimiento y osmóticos para evitar la aparición de variantes somaclonal (Ashmore, 1997).

Condiciones de incubación

Uno de los recursos más utilizados para disminuir el crecimiento del cultivo es la reducción de la temperatura, que en condiciones óptimas se encuentra entre los 20 y 30°C. Sin embargo la disminución de la misma va a depender de la sensibilidad de la especie de interés.

El fotoperiodo y la intensidad de la luz también son factores que influyen en el control de la velocidad de crecimiento, principalmente cuando interaccionan con la temperatura.

Otros recursos utilizados con el fin de disminuir el crecimiento del material vegetal *in vitro* son modificaciones de la fase gaseosa del recipiente como el tamaño del contenedor.

Estos cambios en las condiciones de incubación influyen en: el medio gaseoso del cultivo, la cantidad de medio de cultivo, y en ocasiones en el control de la recepción lumínica, la tasa de evaporación del agua del medio y la humedad relativa en el contenedor (Engelmann, 1998).

Encapsulación

Consiste en la formación de “semillas sintéticas” a través de recubrimiento con una cubierta gelatinosa de alginato de calcio de embriones somáticos, yemas gametofíticas (en briófitas) o ápices.

Esta encapsulación le confiere protección frente a las bajas temperaturas y a la deshidratación durante el almacenamiento. Los ápices de fresa y moras, microtallos de piña y embriones somáticos de *Citrus reticulata* Blanco son algunos

ejemplos en los que se empleó esta técnica para el almacenamiento a mediano plazo.

Crioconservación

La crioconservación se define como un grupo de técnicas que permiten el almacenamiento de organismos vivos en un estado de suspensión animada por periodos extensos, en los que se detienen todos los procesos metabólicos y la división celular; mediante la utilización de temperaturas ultra bajas producidas generalmente a través del uso de nitrógeno líquido (-196 °C). En algunos casos el nitrógeno se combina con otros gases inertes como el helio y el argón (Hirai & Sakai, 2000; Engelmann, 2004).

Esta técnica, desarrollada a partir de la década de los setenta, y el cultivo *in vitro* representan con frecuencia las únicas opciones seguras para la conservación a largo plazo de los recursos filogenéticos de aquellas especies que tienen semillas recalcitrantes o que se propagan vegetativamente (Panis & Lombardi 2005; Khoury y otros. 2010). Se pudo observar en las semillas de café por ejemplo, que este método de conservación es uno de los más seguros, ya que permite el almacenamiento de los embriones en nitrógeno líquido hasta por un año sin que se produzca variabilidad genética, mientras que pierden rápidamente la viabilidad durante el almacenamiento convencional (Kumar y otros., 2006; Santana-Buzy y otros., 2007).

Algunas de las ventajas que presenta la crioconservación es que el material puede preservarse en espacios reducidos, condiciones seguras, sin variabilidad genética y sin grandes costos de mantenimiento (Hirai & Sakai, 2000). Por ello se usa extensivamente en agricultura, horticultura y forestería para investigación y monitoreo ambiental.

El proceso de crioconservación

Una de las etapas más importantes en este proceso es inducir cierto grado de deshidratación en los materiales para evitar daños causados por la formación de cristales.

Se pueden almacenar ápices, meristemos, semillas, embriones cigóticos y somáticos y polen. Se recomienda que el material a conservar sea tan joven y meristemático posible, ya que resisten mejor el congelamiento.

En una primera etapa (pretratamiento) se cultiva el material durante unas horas o días en presencia de sustancias llamadas crioprotectoras, de manera que el material se prepara para “soportar” el proceso de crioconservación. Estas sustancias previenen el daño por frío en los tejidos al desplazar el agua que se encuentra intra e intercelularmente, evitando la ruptura de las membranas. Se han formulado diferentes mezclas vitrificadoras para plantas. Entre ellas se destacan el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol y la sacarosa (Sakai, 2004).

La siguiente etapa es la de congelamiento, que presenta distintos procedimientos:

- Congelamiento lento: es utilizado en las técnicas clásicas de crioconservación, la velocidad de enfriamiento (comprendidas entre 0,1°C/min y 0,3°C/min) del material puede ser controlada y los resultados precisos y reproducibles.
- Congelamiento escalonado: El material se somete a temperaturas por debajo de los 0°C, se mantiene durante cierto tiempo en ellas y luego se almacena el material en nitrógeno líquido.
- Congelamiento rápido: Consiste en sumergir el material directamente en nitrógeno líquido. Es el más utilizado en los protocolos desarrollados recientemente.

Luego de la etapa de congelamiento, el material se almacena en nitrógeno líquido, tanto en la fase líquida (-196°C) como en la fase gaseosa (-150°C) por tiempo indefinido (Abdelnour Esquivel, 2011).

La descongelación de las muestras es un paso sencillo, aunque es considerado el más crítico de la crioconservación, ya que debe evitarse la fusión

de cristales de hielo formados durante la congelación para prevenir el daño celular. En esta etapa se sumergen los microtubos que contienen el material en baños de agua de a 40°C por uno o dos minutos. Posteriormente, se somete a distintos tratamientos para evitar daños, como por ejemplo la dilución de los crioprotectores con el fin de impedir efectos tóxicos por estar en contacto durante largos períodos con estas sustancias (Engelmann, 1991).

El método más empleado para estimar la viabilidad del material luego de ser crioconservado es recultivarlo bajo condiciones óptimas de crecimiento y evaluar su capacidad de regeneración (Roca & Mroginski, 1991).

Procedimientos utilizados para la crioconservación

Métodos clásicos

El primer paso está asociado a la reducción máxima posible del contenido de agua que se puede congelar. Incluye la deshidratación de las muestras, inducida en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar, y se alcanza fundamentalmente durante el proceso de descenso de la temperatura. Para ello, el enfriamiento se realiza de forma lenta hasta un nivel intermedio (usualmente -40°C) antes de efectuar la inmersión rápida en el nitrógeno líquido. Para disminuir gradualmente la temperatura, se utilizan por lo regular equipos de congelación programable y se ajusta la tasa de enfriamiento al régimen deseado.

También se utilizan sustancias crioprotectoras para proteger la integridad de la membrana y el incremento de la viscosidad de la solución celular (González-Arno y *otros*. 2008).

Nuevos métodos

Están basados en la vitrificación, que consisten en el cambio de estado líquido a un estado intermedio llamado vítreo que evita la formación de cristales de hielo, los cuales son la principal causa de daño mecánico a las membranas durante la congelación.

Estas nuevas técnicas son: (i) encapsulación-deshidratación, (ii) vitrificación, (iii) encapsulación-vitrificación, (iv) desecación, (v) precrecimiento, (vi) precrecimiento-vitrificación y (vii) gota-vitrificación (Engelmann, 2000; Dixit y *otros.*, 2004).

(i) Encapsulación-deshidratación

Este método permite la manipulación de tejido al unísono, ya que consiste en encapsular meristemas, ápices y embriones somáticos en alginato de calcio o en polioxietilen glicol. Se utiliza sacarosa como agente osmótico, lo cual lo hace más tolerante al desecado al aire, y se realiza un congelamiento rápido mediante inmersión en nitrógeno líquido. Para la etapa de descongelamiento se expone el material encapsulado al aire corriente en una campana de flujo laminar o con sílica gel en lugar de utilizar baño María a +40 °C (Fabre & Dereuddre, 1990; Ara y *otros.*, 2000).

Diversos protocolos se han adaptados para numerosas especies de origen templado y tropical (Shibli y *otros.*, 2001).

(ii) Vitrificación

Promueve la deshidratación celular y la “solidificación” de líquidos en ausencia de cristales de hielo intracelulares. Esta transición de agua en estado líquido a una fase amorfa cambia la conformación estructural hacia una apariencia vidriosa. Se realiza un pretratamiento con soluciones concentradas de crioprotectores, seguido por el congelamiento rápido en nitrógeno líquido (Dixit y *otros.*, 2004). Esta técnica permitió la crioconservación de especies subtropicales (manzana, uva, pera) y tropicales (piña, chayote, banano) (Engelmann, 2000; Abdelnour-Esquivel & Engelmann, 2002).

(iii) Encapsulación-vitrificación

Este método combina las dos técnicas descritas anteriormente. Tiene la ventaja de poder manipular abundante material encapsulado en alginato de calcio, además de acortar el protocolo criogénico completo en comparación con el requerido para la encapsulación-deshidratación, ya que utiliza una solución

crioprotectora a 0°C por unas horas. Este método ha sido utilizado específicamente para meristemas (Dixit y *otros.*, 2004).

(iv) **Precrecimiento**

La técnica involucra el cultivo *in vitro* previo de los embriones en presencia de crioprotectores por varios días. Se ha utilizado para embriones somáticos y cigóticos (Engelmann, 2000; Dixit y *otros.*, 2004).

(v) **Desecación**

Consiste en la deshidratación de semillas por varios periodos y luego se produce el congelamiento mediante la inmersión en nitrógeno líquido. Se utiliza principalmente en la crioconservación de semillas recalcitrantes, embriones cigóticos y estructuras haploides como polen y óvulos (Engelmann, 2000; Dixit y *otros.*, 2004).

(vi) **Precrecimiento/deshidratación:**

Se utilizan segmentos de tallo previamente cultivados en un medio alto en sacarosa. Posteriormente se desecan en flujo de aire y se congelan directamente en nitrógeno líquido (Engelmann, 2000; Dixit y *otros.*, 2004). Esta técnica se utiliza también para callos embriogénicos de yuca (Danso & Ford Lloyd, 2004).

(vii) **Gota-vitrificación:**

Se utilizado esta técnica con ápices de tallo. Se logra una ultra rápida velocidad de enfriamiento y de calentamiento de las muestras, dado que los tejidos se transfieren a una gota o a un volumen muy reducido de la solución vitrificadora colocada sobre una pequeña lámina de papel aluminio, en la que son inmersas directamente al nitrógeno líquido (Panis y *otros.*, 2005). Este protocolo ha sido utilizado en 150 variedades de papa, ha permitido la recuperación de meristemas en altos porcentajes. Un ejemplo exitoso fue realizado con ápices de tallo de 18 cultivares de *Colocasia esculenta* (ñame) (Sant y *otros.*, 2008).

Para la mayoría de las especies vegetales los protocolos de crioconservación están en una fase experimental, sin embargo esta técnica de conservación se utiliza de manera rutinaria para el almacenamiento de un gran número de genotipos de los géneros *Rubus*, *Pyrus*, *Solanum* spp y *Elaeis guineensis* (Ashmore, 1997).

En Argentina, a partir del 2001, comenzaron las investigaciones para el desarrollo de protocolos para la crioconservación de germoplasma vegetal. Ha sido considerada como una alternativa ideal para la conservación de germoplasma vegetal, tanto de especies de interés económico como de especies nativas en peligro de extinción. Aunque se han desarrollado varios protocolos, ninguno ha sido implementado en forma práctica para ninguna especie. Algunas especies vegetales con las que se han implementado diferentes técnicas de crioconservación son: *Allium sativum* (ajo), *Arachis pintoi* (maní forrajero), *Citrus sinensis* (naranja), *Ilex paraguariensis* ("yerba mate"), *Ipomoea batatas* (batata), *Solanum tuberosum* (papa), entre otras (Mroginski & Rey 2007).

Bibliografía

- Abdelnour Esquivel, A. 2011. Conservación *In vitro* de los recursos genéticos vegetales, 10: 125-144. In: Sharry, S. Ed. Conjuntos de estudios de caso sobre biotecnologías simples, sostenibles y de bajo costo para la agricultura familiar, Santiago de Chile, Chile, p.167.
- Abdelnour-Esquivel, A.; Engelmann, F. 2002. Cryopreservation of chayote (*Sechium edule* Jacq. SW.) zygotic embryos and shoot-tips from in vitro plantlets. *CryoLetters* 23: 299-308
- Ara, H.; Jaiswal, U.; Jauswal, VS. 2000. Synthetic seed: Prospects and limitations. *Current Science* 78:1438-1444.
- Ashmore, S. 1997. Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 67p.

- Danso, KE; Ford Lloyd BV. 2003. Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. *Plant Cell Rep* 21:718–725.
- Dixit, S; Ahuja, S; Narula, A; Srivastava, PS. 2004. Cryopreservation: a potential tool for long-term conservation of medicinal plants. p. 278 - 288. *In: Srivastava, PS; Narula, A; Srivastava, S. Eds. Plant biotechnology and molecular markers. Kluwer Academic Publishers, Holanda - Anamaya Publishers, Nueva Delhi, India. 400 p.* Ellis, RH; Hong, TD; Roberts, EH. 1991. An Intermediate Category of Seed Storage Behavior? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41: 1167-1174.
- Ellis, H. R.; Hong, T. D. and Roberts, E. H. 1990. Effect of moisture content and method of rehydration on the susceptibility of pea seeds to imbibitional damage. *Seed Sci. Technol.* 18:131-137.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm a review. *Euphytica*-57:227-243
- Engelmann, F. 1997. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetative propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletters* 112:9-18.
- Engelmann, F. 1998. *In vitro* germoplasm conservation. *Acta Horticulturae* 461: 41-47.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. p. 8-20. *In: Engelmann, F. Takagi, H. (eds). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant.* 40(5):427-433.
- Fabre, J; Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *Cryoletters* 11:413-426.

- Frankel, OH; Soulé, ME. 1992. Conservation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 327 p.
- Frankel, OH; Brown, AHD; Burdon, J.J. 1995. The conservation of plant biodiversity. Cambridge University Press. 299 p.
- Given, D. 1994. Principles and Practice of Plant Conservation. Timber Press, Inc. Portland. Oregon.
- Gonzalez-Arno, T; Panta, A; Roca, W; Escobar, R; Engelmann, F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. Plant Cell Tissue and Organ Culture 92:1-13.
- Hirai, D; Sakai, A. 2000. Cryopreservation of in vitro grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification, p. 205-211. In: Engelmann, F; Takagi, H. Eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for agricultural sciences, Tsukuba-, Japan. International Plant genetic resources institute, Rome, Italy. 496 p.
- Irondio Alegría, JM. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16 (1): 5-24.
- Khoury, C; Laliberte, B; Guarino, L. 2010. Trends in *ex situ* conservation of plant genetic resources: a review of global crop and regional conservation strategies. Genetic Resources and Crop Evolution 57:625-639.
- Kumar, V; Naidu, M; Rayishankar, GA. 2006. Developments in coffee biotechnology - *in vitro* plant propagation and crop improvement. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 87:49-65.
- León, PL. 1998. Conservación *in situ* de recursos fitogenéticos: consideraciones genéticas y ecológicas. Serie La Platina 68:16-24.
- Maxted, N; Ford-Lloyd, BV; Hawkes, JG. 1997. Complementary conservation strategies. In: Maxted, N.; Ford-Lloyd, B.V. and J. G. Hawkes. Plant Genetic Conservation. The in situ approach. Chapman & Hall. pp. 15-39.

- Mroginski, L; Rey, H. 2007. Cryopreservation of plant germoplasm in Argentina. *Adv. Hort. Sci.*, 21:(4):270-273.
- Nodarse, O; Santana, I; Cornides, MT; Figueredo, Y; Héctor, E; Rodríguez, R. 1998. Comparación de probaciones de caña de azúcar conservadas *in vitro* e *in situ*. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana.
- Panis, B; Lambardi M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In *The Role of Biotechnology for the Characterization and Conservation of Crop, Forest, Animal and Fishery Genetic Resources in Developing Countries*. Eds. FAO. Turin, Italy, pp 43–54.
- Panis, B; Piette, B; Swennen R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* 168:45-55.
- Quirós, W; Guevara, AL; Sánchez, P; Aguilar, ME; Bonilla, N; Quesada, P; Barrantes, W; Jiménez, ML; Castro, M; González, MG; Noches, L. 2008. Costa Rica, el estado de los recursos fitogenéticos 2008. Segundo informe nacional. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Oficina Nacional de Semillas, Comisión Nacional de Recursos Filogenéticos. Costa Rica. Ed. Columna Artes Gráficas S.A. p. 131.
- Rao, NK. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3:136-145.
- Reid, WV; Miller, KR. 1989. *Keeping Options Alive. The Scientific Basis for Conserving Biodiversity*. World Resources Institute, Washington, 128 pp.
- Roca, WM; Mroginski, LA. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p. 715-730
- Panis, B.; Lambardi, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees) (en línea). In *International workshop “The Role of Biotechnology for the Characterisation and Conservation of Crop, Forestry, Animal and Fishery*

- Genetic Resources” (2005, Turín, IT, FAO). Disponible en <http://www.fao.org/biotech/docs/panis.pdf>. Consultado 17 feb. 2011.
- Sakai, A. 2004. Plant cryopreservation. In: Life in the frozen state. Fuller, BJ; Lane, N; Benson, EE. Eds. Boca Raton, US, CRC Press. p. 329-345.
 - Sant, R; Panis, B; Taylor, M; Tyagi, A. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta*) accessions. *Plant cell, Tissue and Organ culture* 92:107-111.
 - Santana-Buzzy, N; Rojas Herrera, R; Galaz-Ávalos, RM; Kucauich, JR; Mijangos-Cortés, J; Gutiérrez- Pacheco, LC; Canto, A; Quiroz-Figueroa, F; Loyola Vargas, VM. 2007. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43:507-520.
 - Shibli, RA; Haagenson, DM; Cunningham, SM, Berg, WK, Volenec, JJ (2001).Cryopreservation of alfalfa cells by encapsulationdehydration. *Plant Cell Report* 20: 445-450.
 - Soengas, P; Cartea, E; Lema, M; Velasco, P. 2009. Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions. *Molecular Breeding* 23:389-395.
 - Tyagi, RK; Agrawal, A; Mahalakshmi, C; Hussain, Z; Tyagi, H. 2007. Low cost media for *In vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RPPD markers. *In Vitro cellular and Developmental Biology Plant* 43:51-58.
 - Wang BSP; Charest PJ.; Downie B.; 1993. Ex-Situ Storage of Seeds, Pollen and *In Vitro* Cultures of Perennial Woody Plant Species. FAO Forestry Paper 113. UN Food and Agriculture Organization, Roma, 83 pp.
 - Wang, YL; Fan, MJ; Liaw, SL. 2005. Cryopreservation of in vitro–grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica* 46:29-34.
 - Withers, LA; Wheelans, SK; Williams, JT. 1990. *In vitro* conservation of crop germoplasm and the IBPGR databases. *Euphytica* 45:9-22.

CAPÍTULO 14

ALGUNAS RECETAS DE “COCINA”...

PROTOCOLOS ESPECÍFICOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS *IN VITRO*

Protocolo 1. ORGANOGÉNESIS DIRECTA DE *Pelargonium graveolens*

Especie: Nombre científico: *Pelargonium graveolens*

Nombre común: Malva rosa

Vía de regeneración: Organogénesis directa

Establecimiento de los cultivos

a) Explante utilizado

Se utilizan como explantos segmentos de tallos: secciones nodales no lignificadas de aproximadamente 1 a 2 cm de largo y 0.3 a 1.0 cm de diámetro, de ramas cercanas al ápice.

b) Desinfección del explante:

Los explantos son acondicionados mediante un lavado con agua corriente durante 24 hs; luego se colocan en agua oxigenada (70:30 v/v) con gotas de Tween 20 durante 5 minutos. Para la desinfección superficial el método más adecuado es: fungicida (Kptan 1500 ppm) durante 20 minutos, seguido de inmersión en etanol 70% (5 minutos), bicloruro de mercurio 0,2 % (3 minutos) e hipoclorito de sodio 10% (10 minutos). Se lavan dos veces con agua bidestilada estéril bajo campana de flujo laminar. Como antioxidantes se usan ácido ascórbico (2,5 g en 300 ml)

durante 20 minutos en el acondicionamiento o ácido cítrico (5g en 500 ml) en el agua de lavado.

c) Medio de cultivo para el establecimiento: los explantos una vez desinfectados se colocan en diferentes medios de cultivo para la obtención de plantas completas. Estos medios contienen los macro y micronutrientes de Murashige & Skoog (1962) (MS) completos o a la mitad de su concentración en forma semisólida o líquida. Como fuente de carbono se utiliza sacarosa (1 a 4%), como agente gelificante agar-agar (0.6 a 0.8 %). Se emplean en los tratamientos diferentes reguladores de crecimiento: bencil amino purina (BAP), ácido indol acético (AIA) y cinetina (CIN) en diferentes concentraciones. Los medios fueron dispensados en erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio de cultivo semisólido o en tubos de ensayo con 10 ml de medio líquido cada uno y puente de papel. El pH se ajusta entre 5.8 y 6.2 y los medios se esterilizan en autoclave a 120°C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

d) Medio básico, hormonas

Una vez desinfectados los explantos se colocan en un medio de cultivo para inducir la proliferación de yemas (**MPY**)

Medio de Proliferación de Yemas (MPY)	MPY I		MPY II		MPY III	
Medio basal (macro y micro nutrientes)	MS completo		MS mitad		MS mitad	
Complejos Vitamínicos	MS		MS		MS	
Agar (g. L ⁻¹)	6		7		7	
Sacarosa (g. L ⁻¹)	10 a 30		10		20	
Reguladores de crecimiento (mg. L ⁻¹)	BAP	2	BAP	1	BAP	2.5

Tiempo (días)	7 a 30	7 a 30	7 a 30
------------------	--------	--------	--------

e) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura; fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹.

Subcultivo

a) Explante: Una vez obtenidos los brotes son subcultivados a un medio de enraizamiento líquido (sobre puente de papel) (**MR**).

b) Medio de cultivo:

Medio de Enraizamiento (MR)		
Medio Basal (macro y micronutrientes)	MS completo	
Agar (g. L ⁻¹)	0	
Sacarosa (g. L ⁻¹)	10	
Reguladores de Crecimiento (mg. L ⁻¹)	AIA	10
	CIN	0,04
Tiempo (días)	7 a 14	

c) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura; fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹.

Aclimatación

Las plantas completas obtenidas en el medio **MR** se aclimatan en envases con vermiculita húmeda estéril, bajo condiciones ambientales controladas y riego con

fungicidas (kptan 1500 ppm). Luego de 15 a 30 días se pasan a condiciones de invernadero bajo riego por neblina. A los 30 días pueden transplantarse a condiciones de campo.

Rendimiento de este protocolo: (datos de eficiencia)

El promedio de brotes nuevos que se obtienen con los medios **MPY I, II y III** es de 10 a 15 por nudo, con hojas pequeñas, normales y de color verde intenso.

En el medio **MR** (medio líquido sobre puente de papel) se observa que los brotes enraizan y elongan los entrenudos, presentando raíces normales con gran cantidad de pelos radicales. El tiempo total para la obtención de plantas completas por medio de organogénesis directa es de 2 meses.

Responsable de la elaboración de este Protocolo

Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E.Pro.Ve.). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina. Tel.: (54) 221-423-6616
E-mail: ceprove@agro.unlp.edu.ar

Bibliografía:

- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plants*, 15: 473-497.
- Sharry S. y W. Abedini. 1998. Micropropagación de *Pelargonium graveolens* L`Herit "malva rosa". *Horticultura Argentina* 17 (42-43):51-59

Protocolo 2. ORGANOGÉNESIS INDIRECTA DE *Pelargonium graveolens*

Especie: Nombre científico: *Pelargonium graveolens*

Nombre común: Malva rosa

Vía de regeneración: Organogénesis indirecta

Establecimiento de los cultivos:

a) Explante utilizado

Segmentos de tallos (secciones nodales e internodales) y pecíolos de individuos selectos de “malva rosa”.

b) Desinfección del explante

Los explantos son acondicionados mediante un lavado con agua corriente durante 24 hs; luego se colocan en agua oxigenada (70:30 v/v) con gotas de Tween 20 durante 5 minutos. Para la desinfección superficial el método más adecuado es: fungicida (Kptan 1500ppm) durante 20 minutos, seguido de inmersión en etanol 70% (5 minutos), bicloruro de mercurio 0,2 % (3 minutos) e hipoclorito de sodio 10% (10 minutos). Se lavan dos veces con agua bidestilada estéril bajo campana de flujo laminar. Como antioxidantes se usan ácido ascórbico (2,5 g en 300 ml) durante 20 minutos en el acondicionamiento o ácido cítrico (5g en 500 ml) en el agua de lavado.

c) Medio de cultivo para el establecimiento

Los explantos una vez desinfectados se colocan en diferentes medios de cultivo para la obtención de callo organogénico. Estos medios contienen los macro y micronutrientes de Murashige & Skoog (1962) (MS) completos o a la mitad de su concentración. Como fuente de carbono se utiliza sacarosa 1 a 4 %, como agente gelificante agar-agar (0.6 a 0.8 %) y diferentes reguladores de crecimiento: ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D), ácido naftalen acético (ANA), bencil amino purina

(BAP) y ácido giberélico (AG₃). Los medios fueron dispensados en erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio de cultivo semisólido o en tubos de ensayo con 10 ml de medio líquido cada uno y puente de papel. El pH se ajusta entre 5.8 y 6.2 y los medios se esterilizan en autoclave a 120°C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

d) Medio básico, hormonas, duración del establecimiento

Una vez desinfectados los explantos se colocan en un medio de cultivo para inducir la formación de callo organogénico **(MIC)**.

Medio de inducción de callo (MIC)		
Medio Basal (macro y micronutrientes)	MS mitad	
Agar (g. L ⁻¹)	7	
Sacarosa (g. L ⁻¹)	20 a 30	
Reguladores de crecimiento (mg.L ⁻¹)	AIA	2
Tiempo (días)	30	

e) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura, un fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹

Subcultivo

a) Explante: transcurridos los 30 días los callos son subcultivados a un medio de proliferación de yemas **(MPY)**.

Medio de proliferación de yemas (MPY)		
Medio Basal (macro y micronutrientes)	MS completo	
Agar (g.L ⁻¹)	6	
Sacarosa (g. L ⁻¹)	10 a 30	
Reguladores de crecimiento (mg.L ⁻¹)	BAP	2
Tiempo (días)	15 a 30	

b) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura, un fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹

Subcultivo

a) Explante: Pasados unos 15 a 30 días las yemas se colocan en un medio de elongación **(ME)**.

Medio de elongación (ME)		
Medio Basal (macro y micronutrientes)	MS mitad	
Agar (g. L ⁻¹)	8	
Sacarosa (g. L ⁻¹)	10	
Regulador de crecimiento (mg. L ⁻¹)	AG ₃	5
Tiempo (días)	15	

b) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura, un fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹

Enraizamiento:

a) Medio de cultivo:

Las yemas ya elongadas se colocan en un medio de enraizamiento **(MR)**:

Medio de Enraizamiento (MR)		
Medio Basal (macro y micronutrientes)	MS completo	
Agar (mg. L ⁻¹)	8	
Sacarosa (g. L ⁻¹)	10	
Reguladores de Crecimiento (mg. L ⁻¹)	ANA	1
Tiempo (días)	14 a 30	

b) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura, un fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹

Aclimatación:

Las plantas completas obtenidas se aclimatan en envases con vermiculita húmeda estéril, bajo condiciones ambientales controladas y riego con fungicidas (kptan 1500 ppm). Luego de 15 a 30 días se pasan a invernadero bajo riego por neblina. A los 30 días pueden transplantarse a condiciones de campo.

Rendimiento de este protocolo: (datos de eficiencia)

Los callos obtenidos en el medio **MIC** originan entre 40 a 60 yemas cada uno en el medio **MPY**, las yemas elongan en el medio **ME** y se produce el enraizamiento de las mismas en el **MR** (100% de brotes enraizados) dando plantas completas fenotípicamente normales, en un período de 2 a 6 meses.

Responsable de la elaboración de este Protocolo

Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E.Pro.Ve.). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina. Tel.: (54) 221-423-6616 .

E-mail: ceprove@agro.unlp.edu.ar

Bibliografía:

- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plants*, 15: 473-497.
- Sharry S. y W. Abedini. 1998. Micropropagación de *Pelargonium graveolens* L'Herit "malva rosa". *Horticultura Argentina* 17 (42-43):51-59

Protocolo 3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Pelargonium graveolens*

Especie: Nombre científico: *Pelargonium graveolens*

Nombre común: Malva rosa

Vía de regeneración: Embriogénesis somática indirecta

Establecimiento de los cultivos

a) Explante utilizado

Segmentos de tallos (secciones nodales no lignificadas de aproximadamente 1 a 2 cm de largo y 0.3 a 1.0 cm de diámetro) y ápices.

b) Desinfección del explante:

Los explantos son acondicionados mediante un lavado con agua corriente durante 24 hs; luego se colocan en agua oxigenada (70:30 v/v) con gotas de Tween 20 durante 5 minutos. Para la desinfección superficial el método más adecuado es: fungicida (Kptan 1500ppm) durante 20 minutos, seguido de inmersión en etanol 70% (5 minutos), bicloruro de mercurio 0,2 % (3 minutos) e hipoclorito de sodio 10% (10 minutos). Se lavan dos veces con agua bidestilada estéril bajo campana de flujo laminar. Como antioxidantes se usan ácido ascórbico (2,5 g en 300 ml) durante 20 minutos en el acondicionamiento o ácido cítrico (5g en 500 ml) en el agua de lavado.

c) Medio de cultivo para el establecimiento: los explantos una vez desinfectados se colocan en diferentes medios de cultivo para la obtención de callo embriogénico. Estos medios contienen los macro y micronutrientes de Murashige & Skoog (1962) (MS) completos o a la mitad de su concentración. Como fuente de carbono se utiliza sacarosa 1 a 4 %, como agente gelificante agar-agar (0.6 a 0.8 %). Se emplean diferentes reguladores de crecimiento: bencil amino purina (BAP), ácido naftalen acético (ANA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético

en diferentes concentraciones. Los medios son dispensados en erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio de cultivo semisólido o en tubos de ensayo con 10 ml de medio líquido cada uno y puente de papel. El pH se ajusta entre 5.8 y 6.2 y los medios se esterilizan en autoclave a 120°C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

d) Medio básico, hormonas, duración del establecimiento.

Los explantos se colocan en un medio de inducción de callo:

Medio de inducción de callo (MIC)		
Medio basal (macro y micronutrientes)	MS completo	
Agar (g. L ⁻¹)	7	
Sacarosa (g. L ⁻¹)	20 a 30	
Reguladores de crecimiento (mg. L ⁻¹)	BAP	1
	ANA	2
Tiempo (días)	30 a 60	

e) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura; fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹.

Subcultivo

a) Explante: transcurridos entre 30-60 días los callos son subcultivados a un medio de inducción de embriones (**MIE**)

Medio de inducción de embriones (MIE)
--

Medio Basal (macro y micronutrientes)	MS Mitad	
Agar (g. L ⁻¹)	7	
Sacarosa (g. L ⁻¹)	40	
Reguladores de crecimiento (mg. L ⁻¹)	ANA	2
Tiempo (días)	60	

b) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura; fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹

Subcultivo

a) Explante: pasados unos 60 días los callos inducidos del **MIE** son subcultivados en un medio de maduración de embriones (**MME**):

Medio de maduración de embriones (MME)	
Medio Basal (macro y micro nutrientes)	MS mitad
Agar (g. L ⁻¹)	7
Sacarosa (g. L ⁻¹)	30
Reguladores de crecimiento (mg. L ⁻¹)	0
Tiempo (días)	30 a 60

b) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura; fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹.

Subcultivo

a) Explante: posteriormente los embriones pasan a un medio de proliferación de yemas (**MPY**):

Medio de proliferación de yemas (MPY)		
Medio Basal (macro y micronutrientes)	MS Completo	
Agar (g. L ⁻¹)	6	
Sacarosa (g. L ⁻¹)	10 a 30	
Regulador de crecimiento (mg.L ⁻¹)	BAP	2
Tiempo (días)	2 a 10	

b) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura; fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y con una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹.

Subcultivo

a) Explante: Una vez obtenidos los brotes son subcultivados a un medio de enraizamiento líquido (sobre puente de papel) (**MR**).

Medio de Enraizamiento (MR)	
Medio Basal (macro y micronutrientes)	MS completo

Agar (g. L ⁻¹)	0	
Sacarosa (g. L ⁻¹)	10	
Reguladores de Crecimiento (mg. L ⁻¹)	AIA	10
	CIN	0,04
Tiempo (días)	7 a 14	

b) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C de temperatura; fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹.

Aclimatación:

Las plantas completas obtenidas se aclimatan en envases con vermiculita húmeda estéril, bajo condiciones ambientales controladas y riego con fungicidas (kptan 1500 ppm). Luego de 15 a 30 días se pasan a condiciones de invernadero bajo riego por neblina. A los 30 días pueden transplantarse a condiciones de campo.

Rendimiento de este protocolo: (datos de eficiencia)

El número promedio de embriones somáticos por gramo de callo es de 70-80. El porcentaje de conversión de embriones somáticos a plantas es del 60 a 70%. Las plantas son fenotípicamente normales. El tiempo total para la obtención de plantas completas por medio de embriogénesis somática es de 4 a 6 meses.

Observaciones: los explantos comienzan la dediferenciación de tejidos luego de 7 días de colocados en un medio **MIC** concluyendo en la formación de un callo friable, color marrón oscuro. Cuando porciones de estos callos se colocan en un medio **MIE** originan en su superficie numerosas estructuras globulares que se separan fácilmente del callo, de unos 0,5 a 1 mm de diámetro. Subcultivados a un medio **MME** sin reguladores de crecimiento, estas estructuras siguen un esquema de desarrollo similar al de un embrión cigótico, observándose distintas etapas

(globular, corazón, torpedo y cotiledonar) con diferenciación de un extremo apical y otro distal. Estos embriones somáticos subcultivados a **MPY** germinan dando lugar a una planta completa.

Responsable de la elaboración de este Protocolo

Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E.Pro.Ve.). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina. Tel.: (54) 221-423-6616
E-mail: ceprove@agro.unlp.edu.ar

Bibliografía:

- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plants*, 15: 473-497.
- Sharry S. y W. Abedini. 1998. Micropropagación de *Pelargonium graveolens* L`Herit "malva rosa". *Horticultura Argentina* 17 (42-43):51-59.

Protocolo 4. ORGANOGÉNESIS INDIRECTA DE *Melia azedarach*

Especie: Nombre científico: *Melia azedarach*

Nombre común: paraíso

Vía de regeneración: Organogénesis somática indirecta

Establecimiento de los cultivos:

a) Explante utilizado

Se utilizan como fuente de explantes semillas que se hacen germinar, para obtener plántulas a las que se le quitan los cotiledones y la radícula y se seccionan en segmentos de 1 cm; se utilizan como explantos tanto el epicótilo como hipocótilo.

b) Desinfección de los explantes:

- Las semillas son desinfectadas con hipoclorito de sodio comercial 20% (8 g de cloro activo por litro de agua) durante 1 hora con agitación; se enjuagan con agua destilada estéril y se hacen germinar en vermiculita en condiciones ambientales controladas (22 °C y 16 horas luz).
- El epi e hipocótilo son desinfectados con fungicida (Kptan 1500 ppm) durante 30 minutos, luego con hipoclorito de sodio 20% con gotas de “Tween 20” durante 10 minutos; finalmente se lavan con solución de antibiótico (Cloranfenicol: 1 g cada 50 ml de agua destilada estéril).

c) Medios de cultivo

Los explantes se colocan en diferentes medios de cultivos compuestos por las sales minerales de Greeshoff y Doy (1972) (GD) o Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementados con complejos vitamínicos de Jacquiot (1959). Se utilizan distintos reguladores de crecimiento (PGR) solos o en combinaciones para inducir las diferentes respuestas. Como fuente de carbono se usa sacarosa (en

concentraciones de 10 a 30 g/L) y como agente gelificante Difto Bacto Agar (6.5 a 7 g/L). El pH de los medios se ajusta a 6, se colocan en frascos erlenmeyer de 125 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo cada uno y se esterilizan en autoclave a 120°C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

d) Medio básico, hormonas

Una vez desinfectados el epi e hipocótilo se colocan en un medio de cultivo para inducir la formación de callo (**MIC**).

Medio Basal (macro y micronutrientes)	Greeshoff y Doy (1972)	
Complejos Vitamínicos	Jacquiot (1959)	
Sacarosa (g / L)	30	
Agar (g / L)	6,5	
Reguladores de Crecimiento (mg / L)	ANA	3
	BAP	1
	AG ₃	5

e) **Condiciones de incubación:** 4°C en condiciones de oscuridad durante 30 días.

Subcultivo

a) Explante:

Los callos en crecimiento en el medio **MIC** se transfieren a un medio de proliferación de brotes.

b) **Medio de cultivo:** Medio de Proliferación de Brotes (**MPB**).

Medio Basal (macro y micronutrientes)	Greeshoff y Doy (1972)	
Complejos Vitamínicos	Jacquiot (1959)	
Sacarosa (g / L)	10	
Agar (g / L)	7	
Reguladores de Crecimiento (mg / L)	KIN	4

c) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C , con un fotoperíodo de 16 horas de luz y una irradiancia de 60 $\mu\text{m m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Enraizamiento

a) Explantes: transcurridos unos 15 a 30 días los brotes obtenidos en el medio **MPB** se colocan en medios para enraizar.

b) Medio de cultivo: Medio de enraizamiento (**ME**).

Medio Basal (macro y micronutrientes)	MS a la mitad	
Complejos Vitamínicos	Jacquiot (1959)	
Sacarosa (g / L)	20	
Agar (g / l)	7	
Reguladores de Crecimiento (mg / L)	IBA	2

c) Condiciones de incubación: 21°C +/- 2°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y una irradiancia de 60 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Aclimatación

Al cabo de 30 días se obtienen plantas completas que se traspasan a frascos con vermiculita estéril cubiertas con polietileno y se riegan con fungicida (Benlate 1500 ppm). Se colocan en condiciones de cultivo controladas (21°C, 16 horas de luz). Al mes son desprovistas de la cubierta de polietileno y se llevan a invernadero con riego por neblina.

Rendimiento de este protocolo: datos de eficiencia

La cantidad de brotes originados por callo tratado con frío es en promedio de 1 a 5 por cada 250 mg de callo. Las raíces de los brotes son normales con formación de pelos radiculares. El tiempo total de obtención de plantas completas vía organogénesis somática es de 4 a 6 meses.

Responsable de la elaboración de este Protocolo

Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E.Pro.Ve.). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina. Tel.: (54) 221-423-6616
E-mail: ceprove@agro.unlp.edu.ar

Bibliografía:

- Gresshoff P.M. and Doy C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 17: 161–170
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plants*, 15: 473-497.
- Sharry S. y W. Abedini. 2001. Selección de callos organogénicos tolerantes a baja temperatura y regeneración de plantas de *Melia azedarach* L. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 24 (1):95-102.

Protocolo 5. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Arachis glabrata*

Especie: Nombre científico: *Arachis glabrata* Benth

Nombre común: maní perenne.

Vía de regeneración: Embriogénesis somática indirecta.

Establecimiento de los cultivos:

a) Explante utilizado: Los explantes se tomaron de hojas inmaduras (con aproximadamente el 80% del tamaño final) provenientes de plantas adultas de cinco accesiones de *Arachis glabrata* Benth. (A6138, A6146, AF385, Lavia 5 y Lavia 6) que crecen en el jardín del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE). Los mismos consistieron en porciones de aproximadamente 4 mm² de la parte central de láminas foliares, incluyendo la nervadura media.

b) Desinfección del explante: Las hojas fueron desinfectadas por inmersión en etanol 70% durante 30 segundos, seguida por una inmersión en una solución de NaOCl al 1% más una gota de Tween[®] durante 12 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

c) Medio de cultivo: Se utilizaron medios de cultivo compuestos por las sales minerales, vitaminas y sacarosa de acuerdo con Murashige & Skoog (1962) (MS), suplementados con diferentes concentraciones (2; 5; 8; 10 y 15 mg/L) de picloram (PIC) solo o combinado con 0,01 o 0,1 mg/L de bencilaminopurina (BAP). El pH de los medios fue ajustado a 5,8 antes del agregado de 0,7% de agar Sigma[®] (A-1296). Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 0,101 MPa durante 20 minutos. Los explantes fueron colocados sobre 3 cm³ de medio de cultivo en tubos de vidrio de 11 cm³ de capacidad, los cuales se obturaron con Resinite AF 50.

Los porcentajes más altos de embriogénesis somática fueron obtenidos al emplear 10 y 15 mg.L⁻¹ de PIC, pero las respuestas fueron altamente dependientes del genotipo.

d) Condiciones de incubación: Los cultivos fueron incubados en un cuarto climatizado a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 14 horas y una intensidad lumínica de $116 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Conversión de los embriones somáticos:

Luego de 90 días en el medio de inducción, los embriones somáticos fueron transferidos medios de cultivo compuestos por MS completo o diluido (1/2 y 1/4), suplementado o no con carbón activado (CA). El más eficiente fue el constituido por MS + CA 1 g/L durante 30 días, seguido por la transferencia de los embriones a medios conteniendo MS, donde al cabo de aproximadamente 20 días brindaron plantas.

Aclimatación:

Las plántulas obtenidas fueron lavadas y plantadas en recipientes conteniendo un sustrato formado por una mezcla de tierra, arena y turba (1:1:1). Las plantas fueron aclimatadas en cámara húmeda en un cuarto climatizado a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 14 horas y una intensidad lumínica de $336 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, y luego fueron colocadas en un invernáculo.

Rendimiento del protocolo:

Siguiendo este protocolo se logró el 20% de embriogénesis somática en la accesión A6138. El 6% de los embriones somáticos obtenidos regeneró plantas.

Observaciones:

Muchos de los embriones fallaron en su conversión a plantas, y merced a los estudios histológicos pudo constatar que estos embriones tenían meristemas

caulinares deficientes. Esta anomalía morfológica fue también encontrada en otras especies de *Arachis*.

Responsables de la elaboración de este protocolo: María Laura Vidoz

Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), Casilla de Correos 209, 3400 Corrientes, Argentina. E-mail: mlvidoz@agr.unne.edu.ar, fax: +54-3783-427131.

Bibliografía:

- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plants*, 15: 473-497.
- Vidoz, M. L.; Rey, H.Y.; Gonzalez, A.M.; Mroginski, L.A. 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration through leaf culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae). *Acta Physiologiae Plantarum* 26 (1): 59-66. Página web: www.ibone.unne.edu.ar

Protocolo 6. ORGANOGÉNESIS DIRECTA DE *Allium sativum*

Especie: Nombre científico: *Allium sativum*

Nombre común: ajo

Vía de regeneración: Especificar: Organogénesis directa

Establecimiento de los cultivos:

a) Explante utilizado

Meristema (constituido por el domo más 1 primordio foliar (0,3 mm aproximadamente). Hacer la extracción a partir de bulbillo (diente) despierto.

b) Desinfección del explante: para la extracción del meristema se corta un trozo de tejido en forma cúbica, incluyendo el disco basal donde está el meristema. Este se desinfecta mediante una inmersión en alcohol 70% y luego con hipoclorito de Na al 5 % durante 10-15 min. Posteriormente el trozo de tejido es colocado sobre papel estéril bajo una lupa estereoscópica dentro de una cámara de flujo laminar y con la ayuda de instrumental estéril se procede a la extracción del explanto. Luego de la escisión el explanto debe ser rápidamente sembrado en medio de iniciación donde se desarrollará una planta completa.

c) Medio de cultivo para el establecimiento:

Soluciones madre (Murashige and Skoog, 1964)

Compuestos Orgánicos

Thiamina.....0,4 mg/l

Inositol.....100 mg/l

Acido Nicotínico.....0,5 mg/l

Piridoxina.....0,5 mg/l

Glicina.....2 mg/l

Sulfato de Adenina.....80 mg/l

Agar.....6-7 mg/l

pH: 5,7

Medio de Iniciación (meristema)

Soluciones Madre y compuestos orgánicos

Sucrosa: 30 g/l

Hormonas: AIA.....0,1 mg/l

Cinetina.....0,1 mg/l

d) condiciones de incubación: 21 °C

Subcultivo:

a) Explante: plántula

b) Medio de cultivo

Medio de Multiplicación

Soluciones Madre y compuestos orgánicos

Sucrosa: 30 g/l

Hormonas: 2ip.....3 mg/l

ANA.....0,30 mg/l

c) Condiciones de incubación: 23-25 C

Enraizamiento:

a) Medio de cultivo: en el mismo medio de cultivo.

b) condiciones de incubación: 23-25 C

Rusticación y transplante ex vitro

Después de varios ciclos in vitro, muchas plantas bulbifican espontáneamente y otras deben ser inducidas. Repicando los plantines a un medio sin hormonas, con alto contenido de sacarosa y luz continua se consigue mejorar el porcentaje de bulbificación en algunos clones, o bien, se obtienen plantas más robustas que soportan el transplante a suelo sin dificultad.

Aclimatación:

Los minibulbillos obtenidos *in vitro* son cosechados y sembrados en suelo estéril compuesto por una mezcla de tierra/mantillo/arena (1/1/1). Las plantas que no forman bulbos son transferidas a suelo y mantenidas en cámara húmeda por un tiempo variable entre 15 y 20 días, luego son paulatinamente adaptadas a las condiciones naturales de humedad y temperatura.

Rendimiento de este protocolo: datos de eficiencia,

Tasa de multiplicación variable según cultivar alrededor 1/6 cada 8 semanas.

Responsable de la elaboración de este Protocolo: Vilma Cecilia Conci, INTA-IFFIVE, Camino 60 cuadras km 5,5 (5119) Córdoba, Argentina. TE: 0351-4973636 FAX: 0351-4974330 E-mail: vconci@correo.inta.gov.ar

Bibliografía:

- Conci V. C.; Cafrune E. E.; Lunello P.; Nome S. y Perotto C. 2004. Producción de planas de ajo libres de virus. En Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte VIII, Cap. 6: 313-316. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina. ISBN 987-521-138-9.
- CONCI, V. C. 2004. Obtención de plantas libres de virus. En Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte VIII, Cap. 5: 303-312. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina. ISBN 987-521-138-9.
- CONCI, V.C. 1997. Virus y Fitoplasmas de ajo. In BURBA, J. L. 50 temas sobre producción de ajo. Vol. 3: 267-293. EEA-INTA La Consulta, Mendoza, Argentina.
- CONCI, V.C. y S.F. Nome. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. J. Phytopathology 132: 189-192.

- MORICONI, D. N.; V. C. CONCI and S. F. NOME. 1990. Rapid Multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 51 (2): 145-151. ISSN: 0031-9457.
- PEROTTO, M. C.; CONCI, V. C.; CAFRUNE, E. E.; ALOCHIS, P. and BRACAMONTE, R. 2003. Differences in the Response of Garlic Cultivars to the Eradication of Five Viruses. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*: 233-240.

Protocolo 7. GERMINACIÓN *IN VITRO* DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS

Especie: *Cattleya nobilior*

Vía de regeneración: Germinación *in vitro* de semillas

Establecimiento de los cultivos:

a) Explante utilizado: semillas de orquídeas.

La mejor manera de conservar las semillas de orquídeas para la siembra en medios de cultivo es que se mantengan dentro de la capsula de la planta. Si tenemos la capsula cerrada podemos realizar la desinfección antes de la siembra ya que las semillas se mantendrán estériles en su interior. Si por el contrario las capsulas ya están maduras y comenzando a abrirse es mejor retirar las semillas del interior y guardarlas en un papel teniendo mucho cuidado ya que se dispersan fácilmente.

b) Desinfección de explante y siembra

SIEMBRA DE SEMILLAS DE CAPSULA VERDE (CERRADA):

El acondicionamiento y desinfección de la capsula comprende el lavado con agua corriente para retirar los restos de tierra (se puede usar cepillo delicado) seguido del uso de hipoclorito de sodio comercial al 10% con 20 gotas de tween 20 durante 10 minutos. Posteriormente en el flujo laminar realizar 3 enjuagues con agua bidestilada estéril. Sumergir las pinzas en alcohol (pinza, bisturí, espátula) y flamearla en mechero. Abrir la capsula con bisturí haciendo cortes longitudinales. Dispersar las semillas de orquídeas sobre el medio de cultivo con la ayuda de una espátula o escalpelo. Cerrar con film los frascos que contienen el medio de cultivo con las semillas y llevarla a cámara de incubación (Temperatura 24°C y Fotoperiodo 12 horas luz y 12 hs de oscuridad)

SIEMBRA DE SEMILLAS MADURAS (CAPSULA ABIERTA):

Si la capsula está abierta es necesario desinfectar las semillas. Las semillas envueltas en un sobre (de papel de filtro de café) o gasa se sumergen en hipoclorito de sodio comercial al 35% con 20 gotas de tween 20 durante 10 minutos y se agita suavemente. Luego se realizar 3 enjuagues con agua bidestilada estéril en cabina de flujo laminar. Previamente desinfectar todo el material a utilizar pinzas, bisturí, etc. Con la pinza estéril abrir el sobre y esparcir las semillas sobre el medio de cultivo. Llevar los cultivos a la cámara de crecimiento con condiciones controladas de luz y temperatura.

c) Medio de cultivo para orquideas.

Fórmula Knudson “C”

- 1.0 gr de Nitrato de Calcio
- 0.250 gr de Fosfato monopotásico
- 0.250 gr de Sulfato de Magnesio
- 0.500 gr de Sulfato de Amonio
- 0.025 gr de Sulfato de hierro
- 0.0075 gr de Sulfato de Manganeso
- 20.0 gr de azúcar
- 10.0 gr de agar agar
- 1000 ml de agua destilada.

Fórmula de plátano

- 100gr de plátano hecho puré o licuado.
- 10gr de agar-agar
- 15gr de azúcar
- 1,2gr de tiamina
- 900ml de agua destilada.

Otros ejemplos de medios de cultivo caseros para Orquideas	
Fórmula Tomate y Zanahoria <ul style="list-style-type: none"> - 100 ml de jugo de zanahoria - 100 ml de jugo de tomate - 10.0 g de agar agar - 15.0 g de azúcar - 1.2 g Tiamina - 800 ml de agua destilada 	Fórmula Abono <ul style="list-style-type: none"> - 3 cc de abono DynaGro 7-9-5 o 10-5-5 - 12.0 g de agar agar - 20.0 g de azúcar - 2.0 g de carbón vegetal o carbón activado - 5 tomates perita sin semillas - 150.0 ml de agua de coco - 40.0 g de banana - 800 ml de agua destilada
Fórmula Juvenal Meyer <ul style="list-style-type: none"> - 500 ml agua destilada. - 500 ml de jugo de tomate - 20 gr de azucar, miel, glucosa o dextrosa - 14 gr de agar agar - 2 gr de <u>carbon</u> activado en polvo - 1 gr abono 30-10-10 	Formula de Tomate y Plátano <ul style="list-style-type: none"> - 40gr de plátano hecho puré - 100ml. de jugo de tomate - 10gr de agar agar - 20gr de azúcar - 1.2gr tiamina - 800ml. de agua destilada
Formula de la Piña <ul style="list-style-type: none"> - 200ml. de jugo de piña dulce y madura - 10gr de agar agar - 15gr de azúcar - 1.2gr tiamina - 800ml de agua destilada 	Fórmula de Tomate <ul style="list-style-type: none"> -250g. de tomate maduro y sano (hacer puré y colar en un colador muy fino) -10gr de agar agar -15gr de azúcar -1.2gr de tiamina -900ml de agua destilada

d) Condiciones de incubación: Las plántulas se mantendrán bajo tubos fluorescentes de 20 watts en un cuarto de crecimiento que está regulado entre 22 y 24°C, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Estas recomendaciones pueden variar, dependiendo del origen de las plantas que va a sembrarse.

Subcultivo:

La germinación de orquídeas epífitas puede tardar de unos pocos días a varios meses. Las semillas comienzan a cambiar de color amarillo a verde cuando comienzan a realizar fotosíntesis en presencia de luz. Algunas especies en lugar de formar hojas y raíces directamente forman primero una pequeña esfera de células verdes que se llama protocormo. Una vez que el protocormo crece se observa el desarrollo de pelos radiculares y posteriormente el brote con la aparición de las hojas.

Como generalmente germinan más semillas de las esperadas, el frasco puede quedar lleno de semillas y es necesario transferir los protocormos desarrollados a nuevos medios de cultivo para que puedan crecer y desarrollarse *in vitro* de forma adecuada.

Rusticación

Una vez que las plantas han crecido *in vitro* y han desarrollado completamente sus raíces es posible transferirlas a un medio exterior y llevarla a condiciones de invernadero. Pasos para transferir y aclimatar las vitroplantas:

- Retirar con mucho cuidado los plantines tratando de no dañar las raíces.
- Lavar las raíces con abundante agua para eliminar restos de medio de cultivo.
- Sumergir las plantas completas en solución diluida de fungicidas.
- Colocar las plantas en los sustratos previamente esterilizados (sustrato en base a pedazos de ladrillo o roca, musgo, trozos de corteza de árboles)
- Cubrir las macetas con los plantines con plástico transparente. Es necesario mantener la humedad lo más alto posible para evitar la deshidratación y muerte de las plantas. Luego de dos semanas ir destapando de a poco hasta que las plantas estén adecuadas a las nuevas condiciones
- No colocar las plantas directamente en el sol, por lo menos las primeras dos semanas de invernadero.
- La humedad es un factor importante, generalmente se realizan dos riegos semanales verificando que el sustrato se haya secado entre un riego y otro (el riego excesivo es causante muchas veces de muerte de estas plantas)

- El uso de fertilizante también es muy importante para el buen crecimiento y floración de las plantas de orquídeas.

Responsable de la elaboración de este Protocolo: Autores: Rubens Barbery Knautt y Ingrid Morales Benabent. 2011. Manual para el Cultivo *in vitro* de la Orquídea *Cattleya nobilior* “Flor símbolo de Concepción”, publicación del Centro para la participación y el Desarrollo Sostenible CEPAD- Bolivia.
<http://www.festivaldelaorquidea.com/docs/ManualOrquideas2011.pdf>

Bibliografía

<http://www.festivaldelaorquidea.com/docs/ManualOrquideas2011.pdf>
<http://orquideoteca.blogspot.com.ar/2008/07/frmulas-para-epfitas-y-terrestres.html>
http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF

Protocolo 8. ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO DE CALLOS DE *Daucus carota*

Adaptado de Dodd and Roberts, 1985.

Especie: Nombre científico: *Daucus carota*

Nombre común: Zanahoria

Vía de regeneración: Organogénesis indirecta

Establecimiento de los cultivos:

a) Explantes: Raíces de Zanahoria (*Daucus carota*)

b) Desinfección de explante y siembra

- Lavar las zanahorias con agua corriente y jabón dentro de un recipiente agitando manualmente.
- Pelar las zanahorias con un pelador de vegetales, eliminar 2 mm del tejido.
- Cortar a las zanahorias en rebanadas de 1 cm de grueso.
- Sumergir las rebanadas en una solución de etanol al 70% por 30 segundos.
- Sumergir las rebanadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10%, durante 10 minutos, a partir de este paso trabajar en la campana de flujo laminar.
- Lavar el material vegetal cinco veces con agua destilada y estéril, con agitación dentro de un vaso de precipitados, durante 30 segundos.
- Del vaso de precipitados, tomar una a una las rebanadas y transferirlas a una caja de Petri estéril y con la ayuda de unas pinzas de disección, cortar cubos de la zona del cambium de un centímetro por lado.
- Colocar tres cortes (cubos) de cambium por frasco, procurando que la superficie de uno de los lados del cubo quede en contacto con la superficie del medio de cultivo.

c) Medios de cultivo para el establecimiento:

Preparar medio de cultivo MS complementarlo con 2,4-D 1.0 mg/L, sacarosa 20 g/L y agar-agar 6.0 g/L, mioinositol 0.1 g/L y vitaminas. Ajustar el pH a 5.5 con NaOH 1.0 N, antes de agregar el agar.

Preparar otro medio de cultivo, MS sin mioinositol. Todo los demás componentes a la misma concentración y ajustar el pH del medio a 5.5.

Fundir el agar en calor y verter 25 mL por frasco, tapar con doble tapa de papel aluminio y sujetar con una liga o con tapa de plástico, esterilizar en autoclave a 1 atm. de presión durante 20 min

d) Condiciones de incubación: Coloque los frascos con los explantes en un cuarto de cultivo con fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 de oscuridad a una temperatura de 24-26 °C.

Observaciones: Cada tres días el desarrollo de los cultivos, anotar las apariencias y cambios que van sufriendo los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y describir si se trata de contaminación bacteriana o fúngica. Es de particular importancia determinar el tiempo de aparición de los callos.

Responsable de la elaboración de este Protocolo: Manual elaborado por Jesús Agustín Badillo Corona, María del Carmen Oliver Salvador, Karen Gisela Moreno Guerrero, Verónica Pacheco González y Hernán Cortés. 2009. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. México.

<http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Manual%20del%20Laboratorio%20de%20Cultivo%20de%20Tejidos%20.pdf>

Bibliografía

-Lebowitz, R. J. 1995. Micropropagation of African Violet. In Plant Biotechnology. A Laboratory Manual. WCB Wm. C. Brown Publishers. Dubuque, Iowa; Melbourne, Australia; Oxford, England.

-Mc Donald, K., Jackman, A., Thorup, J. And Dandekar, A. 1995, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 54. 93-108.

-Dixon, R. A. 1985, Isolation and Maintenance of callus and cell suspension cultures in plant cell culture. A practical approach. Ed. Dixon R. A. IRL Press, Oxford. Washington.

-Murashige T and Skoog F . 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.

Protocolo 9. REGENERACIÓN DE PLANTAS COMPLETAS A PARTIR DE HOJAS DE *Nicotiana tabacum*

Especie: Nombre científico: *Nicotiana tabacum*

Nombre común: Tabaco

Vía de regeneración: Organogénesis indirecta

Establecimiento de los cultivos

a) Explante utilizado: Hojas de tabaco provenientes de plantas que crecieron *in vitro*. Las hojas que mas rápido y mejor regeneran son las más jóvenes pero en teoría hojas de cualquier edad son útiles.

b) Siembra:

Cortar hojas jóvenes de la planta de tabaco. Colocar las hojas en una caja de Petri y realizar cortes de 1 x 1 cm. Cortar el tejido vascular principal y eliminar. Las hojas se manipulan mejor si se colocan con el envés hacía arriba. Colocar los cortes (3-4 por frasco) en medio de cultivo.

c) Medio de cultivo para el establecimiento: MS semi-sólido suplementado con 1.0 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de ANA.

d) Condiciones de incubación: 25°C +/- 2°C de temperatura; fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h oscuridad y una irradiancia de 40 mE.m⁻²/s⁻¹.

Subcultivo

Realizar observaciones cada semana. El tejido se expande y luego forma brotes pasando por un periodo casi imperceptible de callo. Si a las 4 semanas no han surgido brotes, transferir el tejido a medio fresco.

Enraizamiento: Cuando hayan surgido brotes y éstos hayan crecido de 2-3 cm, transferirlos a medio MS semi-sólido, con vitaminas B5 y SIN REGULADORES DE CRECIMIENTO, para que formen raíces.

Responsable de la elaboración de este Protocolo: Manual elaborado por Jesús Agustín Badillo Corona, María del Carmen Oliver Salvador, Karen Gisela Moreno Guerrero, Verónica Pacheco González y Hernán Cortés. 2009. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. México.
<http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Manual%20del%20Laboratorio%20de%20Cultivo%20de%20Tejidos%20.pdf>

Bibliografía

- Murashige, T. And Skoog, 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol.Plantarum*. 15:473-497.

Protocolo 10. Propagación *in vitro* de violeta africana *Saintpaulia ionantha* Wendi.

Adaptada de Franco y García, 1995.

Especie: Nombre científico: *Saintpaulia ionantha* Wendi

Nombre común: violeta africana

Una planta ornamental de gran interés dentro del comercio y la jardinería, es la violeta africana *Saintpaulia ionantha* Wendi, originaria del este de África. En la actualidad, se conocen más de 20 especies y cientos de variedades, las que se propagan por germinación de semillas o en forma vegetativa por esquejes. Las violetas son plantas muy apreciadas y por lo mismo, se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo a través de las asociaciones de floricultores y aficionados. Las violetas africanas presentan gran diversidad morfológica y con una amplia gama de tonalidades de flores que van desde violeta púrpura a blancas.

En la literatura encontramos varios autores que desarrollaron diversas técnicas de cultivo “*in vitro*” para obtener violetas africanas a gran escala, a partir de pequeñas porciones de peciolo y tejido foliar, entre ellos se puede citar a Start y Cumming (1976), Bilkey y Mc.Cown (1978) y Cooke R. (1977).

Establecimiento de los cultivos

a) Explante utilizado: a) peciolo, b) parte central de hoja y c) parte externa de la hoja de violeta africana, de la planta patrón o una planta sana. Escoger varias hojas desarrolladas, jóvenes (2-3 cm de diámetro) y sanas, dejar un centímetro de peciolo.

b) Desinfección del explante:

- Colocar las hojas dentro de un vaso de precipitados, lavar con agua corriente y jabón agitando manualmente.
- Sumergirlas en una solución de etanol al 70% por 30 seg.
- Sumergir las hojas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10%, durante 10 minutos. A partir de este paso trabajar en la campana de flujo laminar.
- Lavar el material vegetal cinco veces con agua destilada y estéril, con agitación dentro de un vaso de precipitados, durante 30 seg.
- Del vaso de precipitados, tomar una a una las hojas, transferir a una caja Petri estéril y con la ayuda de unas pinzas de disección, cortar en fracciones de un centímetro cuadrado.
- Colocar dos o tres fracciones foliares por frasco, procurando que el envés foliar quede en contacto con la superficie del medio de cultivo.

c) Medio de cultivo para el establecimiento:

Deben utilizarse los siguientes medios con los explantes: 1) MS y 2) MS a un cuarto de sales y 15 g/L de sacarosa.

Preparar un litro de medio de cultivo semi-sólido de Murashige y Skoog (1962), MS, complementarlo con ácido nicotínico 0.5 mg, piridoxina 0.5 mg, ácido indolacético 2.0 mg, 6-bencil aminopurina 0.08 mg, sacarosa 30 g y agar 6.0 g. Ajustar el pH a 5.7.

Preparar el medio MS disminuyendo a la cuarta parte la concentración de las sustancias inorgánicas y sacarosa 15 g/L. El resto de los componentes se utilizará en la misma concentración. Ajustar el pH a 5.7.

Fundir el agar en calor y verter 20 mL por frasco, tapar con doble tapa de papel aluminio y sujete con una liga o con tapa de plástico. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión y 121°C durante 15 min.

d) Condiciones de incubación: Colocar los frascos con los explantes en un cuarto de cultivo, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.

Observaciones: Mirar cada tercer día el desarrollo de sus cultivos.

Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica

Responsable de la elaboración de este Protocolo: Manual elaborado por Jesús Agustín Badillo Corona, María del Carmen Oliver Salvador, Karen Gisela Moreno Guerrero, Verónica Pacheco González y Hernán Cortés. 2009. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. México.

<http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Manual%20del%20Laboratorio%20de%20Cultivo%20de%20Tejidos%20.pdf>

Bibliografía

- Bilkey, P.C. and B.H. Mc Cown 1978. Micropropagation of African Violet from Petiolo Cross- Section. HortScience 13 (1):37-38. Instituto Politécnico Nacional
- Cooke, R. 1997. Tissue Culture Propagation of African Violets. HortScience 12(6):549
- Franco Rodríguez José y M. T. García, 1995. Ensayo demostrativo sobre la propagación de violeta africana Saintpaulia ionantha Wendi por cultivo de tejidos. An.Esc.Nac.Cienc.Biol.México, 40:107-115.
- Martin, C. 1985. Cultivo de plantas en probeta. Mundo Científico. No.44:160-169.
- Murashige, T. And Skoog, 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiol.Plantarum. 15:473-497.
- Pierik, R.L.M.1994. Biotecnología Vegetal como herramienta en la horticultura ornamental: Revista Chapingo, serie Horticultura 1:45-57. México.
- Smith, R.H. and R.E. Noris. 1983. In vitro propagation African Violet chimeras. HortScience 18(4):436-437.
- Star, N.D. and B.G. Cumming. 1976. In vitro propagation of Saintpaulia ionantha

Wendl. HortScience 11:204-206.

- Lebowitz, R. J. 1995. Micropropagation of African Violet. In Plant Biotechnology. A Laboratory Manual. WCB Wm. C. Brown Publishers. Dubuque, Iowa; Melbourne, Australia; Oxford, England

LOS AUTORES



Ing. Ftal. (M. Sc.) Walter I. Abedini

Profesor Titular Ordinario con dedicación Exclusiva. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata. Docente Investigador Cat. I. Programa de Incentivos UNLP. Investigador Adjunto Carrera de Investigador Comisión de Investigaciones Científicas (CIC. PBA). Director Departamento de Tecnología Agropecuaria y Forestal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata. Director C.E.Pro.Ve. (Centro Experimental de Propagación Vegetativa). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata.

Mail: tecaf@agro.unlp.edu.ar
ceprove@agro.unlp.edu.ar



Lic. Marina Adema

Licenciada en Biología Orientación Ecología. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata (UNLP) Buenos Aires, Argentina. Docente de la materia optativa Biotecnología Vegetal de Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP y de la materia Biotecnología Aplicada a la Producción Vegetal, Centro Experimental de Propagación Vegetativa C.E.Pro.Ve de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP. Ha desarrollado CD ROM educativos para Campaña de Comunicación de la Biotecnología en República Dominicana destinados a diferente público: infantil, adolescentes y adultos, proyecto FAO/TCP/DOM/3202(D).

Fortalecimiento de las capacidades institucionales para la investigación en biotecnología y bioseguridad. Integrante del Grupo de trabajo de la Red Iberoamericana de Educación en Biotecnología agroalimentaria. "Bioeducar"- CYTED- Fundación REDBIO Internacional (2007-2010). Docente participante del proyecto de extensión: "Plantas de probeta, dejemos descansar al poroto". En el marco del Plan Estratégico Agroalimentario y Agroindustrial PEAA- Ministerio de Educación- Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP (2013). Realiza tareas técnicas en cultivo *in vitro* y micropropagación de orquídeas. En vivero Orquidácea, fábrica de flores.

Mail: marinaadema@yahoo.com.ar



Lic. María de los Ángeles Basiglio Cordal

Licenciada en Biología Orientación Ecología. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP. Profesora de Biología, Ciencias Naturales y Físico-Química en Nivel Secundario. Escuela Agropecuaria N°1 "Lucio Manssilla" en Bme. Bavio, Instituto Sagrada Familia, Esc. Ed. Media N°1 (Magdalena, Provincia de Buenos Aires). Desde 2009 hasta la fecha trabaja en el Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E.Pro.Ve.) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP, aplicando las técnicas de cultivo *in-vitro* de tejidos vegetales, micro y macropropagación en especies forestales nativas. Responsable técnico del Laboratorio de Micropropagación del CEAMSE.



Lic. María Clara Bisio

Licenciada en Biología con Orientación en Ecología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata (UNLP). Actualmente responsable de la Plataforma de Transformación y Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR). Dirige activamente proyectos de transformación genética de cultivos de interés agronómico para el país y la región, así como también proyectos de innovación tecnológica. Coordina un equipo de trabajo integrado por técnicos profesionales y asistentes.

Mail: clarabisio@gmail.com



Lic. Patricia Boeri

Lic. En Biología en Facultad de Cs. Naturales y Museo (Univ. Nacional de La Plata). Es Profesor Adjunto Regular y becaria doctoral en el Laboratorio de Tecnología en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Nacional de Río Negro, sede Atlántica. Fue pasante del CEProVe, donde inició su formación profesional. Ha capacitado a profesionales y docentes de escuelas técnicas en el seminario de Biotecnología (Ministerio de Educación de la Provincia de Río Negro-UNRN). Actualmente dicta la materia optativa "Biotecnología y Bioprospección" para la carrera de Ingeniería Agronómica (UNRN). Participa de varios proyectos de investigación y actividades de capacitación y extensión.

Mail: pboeri@unrn.edu.ar

Ing. Ftal. María Valentina Briones

Mail: valentinabriones@gmail.com



Lic. Marianelén Cedrés Gazo

Licenciada en Ciencias del Ambiente, Universidad Nacional de Río Negro (UNRN). Responsable técnica del proyecto “Multiplicación de especies nativas del monte xerofítico rionegrino”, a partir de un Laboratorio básico de Biotecnología Vegetal y métodos convencionales, fomentando su valorización en el manejo sustentable de estos ambientes (Proyecto MINCYT - PFIP 2009 CONVENIO 158/11, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la provincia de Río Negro).

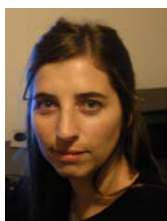
Email: mcg_cedres@hotmail.com



Dr. Alejandro Salvio Escandón

Investigador del Instituto de Genética. Obtuvo su título de Bioquímico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA lo obtuvo en 1984. Gran parte de su trabajo de tesis de posgrado sobre el estudio del comportamiento del ADN en la morfogénesis *in vitro* de vegetales, lo llevó a cabo en el Institute de Biologie Moleculaire des Plantes (CNRS) en Estrasburgo, Francia, entre los años 1988 y 1989, donde además se especializó en transgénesis vegetal. En 1990 obtuvo el título de Doctor en Bioquímica en la FFyB de la UBA. Su especialidad es la Biotecnología Vegetal, en particular el cultivo de tejidos y la transgénesis, su línea de trabajo es el mejoramiento genético a través de biotécnicas. En la actualidad participa del proyecto: Plataformas tecnológicas y comerciales, para aromáticas cultivadas, nativas y medicinales. Desde el año 2009 hasta el 27/04/2015 ejerció la presidencia de la REDBIO Argentina Asociación Civil, asociación de la que ahora es tesorero.

Email: escandon.alejandro@inta.gob.ar



Dra. María Fernanda Gugole

Doctora en Ciencias Naturales (Facultad de Ciencias Naturales y Museo -UNLP). Actualmente es becaria Postdoctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), bajo la dirección del Dr. Guillermo Houg. Desarrolla su trabajo en el Departamento de Evaluación Sensorial de Alimentos (DESA) del Instituto

Superior Experimental de Tecnología Alimentaria (ISETA), 9 de Julio, Provincia de Buenos Aires. Fue pasante del CEPROVE.

Email: fernanda@desa.edu.ar



Lic. Jesica Iannicelli.

Becaria CONICET en el Instituto de Genética. Obtuvo su título de Licenciada en Biología de la Facultad de Cs. Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad de Morón. Tiene una beca de Doctorado de CONICET, desde 2011 hasta el 2016. Desarrolla su trabajo tanto en el Instituto de Genética y de Floricultura de INTA Castelar como en la Cátedra de Farmacognosia de la FFyB de la UBA. Su especialidad es la Biotecnología Vegetal, en particular el cultivo de tejidos y la poliploidización, su línea de trabajo es el mejoramiento genético a través de biotécnicas.

Email: jesi.iannicelli@gmail.com



Dra. Noelia Nikoloff

Doctora de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de la Plata. Actualmente, es becaria Postdoctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) en el Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET) y su tema de investigación está vinculado a biotecnologías de la reproducción en ganado bovino. Fue pasante del CEPROVE y participó en varios cursos de formación de recursos humanos en CTV.

Email: noenik_@hotmail.com



Lic. Sebastián Pariani

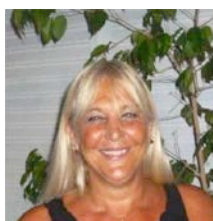
Lic. en Biología en Facultad de Cs. Naturales y Museo (Univ. Nacional de La Plata). Becario doctoral en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del IIB-INTECH sede Chascomús. Docente en la carrera de Técnico Universitario en Laboratorio (Univ. Nacional de General San Martín) y en la carrera de Técnico Superior en Gestión Ambiental (Fundación de Altos Estudios en Cs. Comerciales). Fue pasante del CEPROVE participando de varios proyectos y actividades de capacitación y extensión.

Mail: sebastianpariani@gmail.com

Lic. M Sc. Cecilia Rivas

Lic. En Botánica. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Master Sc. en Plantas Medicinales-FCE-UNLP. Ex docente-investigador del INFIVE y del CEPROVE-FCAyF-UNLP. Especialista en cultivo de tejidos de plantas medicinales.

Mail: rivasduran@yahoo.com.ar



Dra. Sandra E. Sharry

Licenciada en Biología con Orientación Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo.UNLP. Vicedecana de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata. Profesor Adjunto Ordinario con dedicación Exclusiva, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata. Docente Investigador Cat. III. Programa de Incentivos Profesional Principal. Comisión de Investigaciones Científicas (CIC. PBA). Integrante del LIMAD- C.E.Pro.Ve. Centro Experimental de Propagación Vegetativa. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata. Secretaria Técnica de REDBIO Internacional (Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal de América Latina y el Caribe). Vicepresidente de ProDiversitas. Programa Panamericano de Defensa y Desarrollo de la Diversidad biológica, cultural y social. Experto CTPD /FAO, en Biotecnología vegetal.



Lic. Blanca Villarreal

Licenciada en Biología Orientación Botánica. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata (UNLP). Posgrado en realización: Maestría en Biotecnología de Plantas de la Universidad Internacional de Andalucía. Docente de la materia optativa Biotecnología Vegetal de F.C.N.yM.,

UNLP y de la materia Biotecnología Aplicada a la Producción Vegetal, Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E.Pro.Ve), F.C.A.yF, UNLP. Ha desarrollado, para la Campaña de Comunicación de la Biotecnología en República Dominicana, CD ROM educativos destinados a público: infantil, adolescentes y adultos, proyecto FAO/TCP/DOM/3202(D). Integrante del Grupo de trabajo de Argentina de la Red Iberoamericana de Educación en Biotecnología Agroalimentaria. "Bioeducar"- CYTED- Fundación REDBIO Internacional. Docente del proyecto de extensión: "Plantas de probeta,

dejemos descansar al poroto” del Plan Estratégico Agroalimentario y Agroindustrial PEAA- Ministerio de Educación-FCAyF, UNLP. Colaboración con el Grupo Interdisciplinario de Especialistas en Ingeniería Ambiental (GIDEIAM), de la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional La Plata (UTN-FRLP).

Email: villarrealblanca@gmail.com

Libros de **Cátedra**

ISBN: en trámite

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES

n
naturales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA