

A close-up photograph of green plant tissue culture explants submerged in a clear liquid medium. The explants are elongated and textured, with some showing small white structures. The background is a light purple color.

Anexo 1

## Propagación vegetal in-vitro

## Tipos principales de métodos de pago

### I- Inicio del ciclo productivo in-vitro

El concepto “In Vitro”, el cual hace referencia a la posibilidad de cultivar plantas en frascos de vidrio, en un ambiente artificial; este tipo de técnica presenta dos elementos o características fundamentales para su ocurrencia, los cuales son la asepsia y el control efectivo de los factores que afectan el crecimiento. El control mencionado aborda las condiciones tanto físicas como químicas en donde se ubica el explante.

**1.1.** Para establecer un proceso de propagación vegetal in-vitro, es necesario comprender la necesidad de contar un medio de cultivo apropiado para el desarrollo de las fases de implicadas. Para la técnica de cultivo in-vitro, el medio de cultivo funciona como sustrato, pero también como fuente energética, fundamental para el desarrollo de los tejidos.

La composición de un medio de cultivo es la siguiente:



- Al tratarse de una mezcla, el medio de cultivo necesita de una formulación y preparación apropiada:

Preparación de solución madre, que consiste en la elaboración de medios de cultivo preparados en concentraciones muy altas.

- Cálculo de cantidades, considerando las proporciones óptimas de cada componente.
- Preparación del medio de cultivo, o la elaboración propiamente dicha de la mezcla, conservando pH apropiado, consistencia y asepsia.

## II. Morfología vegetal

La morfología vegetal es el campo básico desde donde se puede comprender múltiples aspectos asociados a la funcionalidad de los organismos vegetales, así como los elementos biológicos que los posibilitan; por tal motivo, se genera una ruta que inicia por la identificación de las estructuras radiculares y aéreas de las plantas, la fotosíntesis y los órganos que la desarrollan, así como sus diferentes fases, concluyendo en un recorrido por el sistema vascular que proporciona a las plantas la posibilidad de circulación del agua y los nutrientes que requiere para vivir.

- 2.1.** Los medios de cultivo son la combinación de diferentes componentes, que varían proporcionalmente de acuerdo con las características del tejido que se pretende desarrollar, sean yema, porciones de hoja, células, porciones de tallo, etc., y por el proceso morfogenético que se desea seguir (cultivo de meristemos, organogénesis, embriogénesis somática, entre otros.).

La estructura interna cuenta con particularidades específica, en concordancia con el estado de desarrollo y clase de planta.

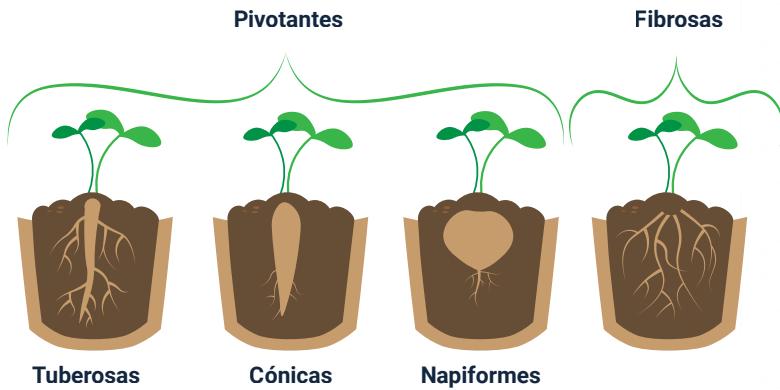
Estado de desarrollo de la planta: en la germinación de la planta se forma un cuerpo primario de la raíz desde el meristemo apical que se ubica en el extremo inferior del embrión; sucede un proceso de división celular de dicho meristemo, dando origen a tres tipos de tejidos primarios, que se reconocen como protodermis, meristema fundamental y procambium; estos tejidos, dan origen a los tejidos definitivos de la raíz.

Clase de planta: en dicotiledóneas, especialmente las leñosas, en ciertas etapas, surgen tejidos radiculares secundarios. Presenta como tejidos primarios la epidermis (capa externa de la raíz), corteza (conformado por tejidos de protección, crecimiento e ingreso de agua y nutrientes), estela (tejidos para formación de raíces laterales, vasculares primarios y cambium vascular que origina el tejido vascular secundario). En monocotiledóneas, son los mismos tejidos que presentan las dicotiledóneas, exceptuando el cambium vascular.

- Clasificación de raíces:

Según el origen: a. Primaria o principal (a partir del embrión); b. Secundarias (a partir del periciclo); c. Adventicias (desarrolladas en cualquier parte diferente a la raíz).

Según la morfología: a. Pivotantes (raíces secundarias características de árboles y plantas dicotiledóneas); b. fibrosas (raíces secundarias y adventicias que forman un tipo de "cabellera" con dimensiones similares).



Tanto raíces pivotantes como fibrosas, pueden ser carnosas, condición que permite el almacenamiento de considerables sustancias de reserva, que pueden ser cónicas (tipo zanahoria), napiformes (tipo remolacha) y tuberosas (tipo yuca).

Existen otro tipo de raíces, con modificaciones específicas, donde se clasifican neumatóforos (salen del suelo a absorber aire), fúlcreas (adventicias de anclaje), adherentes (fijación a otras plantas, tipo orquídeas), columnarias (adventicias que nacen como ramas y se introducen al suelo), tubulares (prolongaciones de partes superiores de raíces) y haustorios (plantas parásitarias).

La raíz cuenta con una estructura interna y una estructura externa, diferenciadas en sus características, de acuerdo con el tipo de planta a las que corresponda (monocotiledóneas o dicotiledóneas).

La estructura externa cuenta con una distribución zonal que presenta las secciones de cuello, ramificación, diferenciación, pelos absorbentes, alargamiento, meristema apical y cofia.

La estructura externa cuenta con una distribución zonal que presenta las secciones de cuello, ramificación, diferenciación, pelos absorbentes, alargamiento, meristema apical y cofia.

- Descripción de las zonas radiculares mencionadas.

El Cuello es la parte donde se une raíz y tallo de la planta; los pelos absorbentes son células epidérmicas alargadas encargados de la absorción de agua y nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta; la zona de diferenciación es la región donde los tejidos meristemáticos se diferencian como tejidos radiculares definitivos; las zonas de alargamiento y meristema apical se encuentran en el espacio que antecede la terminación de la raíz y se encuentra conformado por tejido meristemático y posibilitan el crecimiento longitudinal de la raíz, finalmente, la parte terminal de la raíz es la cofia, que protege el meristemo apical en el proceso de penetración de la raíz al suelo.

- Clases de tallos.

La clasificación sucede en función de hábitat, consistencia, hábito de crecimiento, forma y modificaciones. A continuación, una caracterización genérica de estas categorías.

Hábitat: los tallos pueden ser aéreos, subterráneos y acuáticos. Consistencia: pueden ser leñosos, donde se reconocen las subcategorías de árboles (plantas con altura superior a los 5 metros, con tronco principal y ramificaciones), arborescentes (plantas con tronco principal corto y ramificaciones cercanas al suelo) y arbustos (plantas con alturas máximas de 4 metros, donde no hay un tallo principal diferenciado); herbáceos (carentes de material leñoso o con bajos niveles de contenido del mismo); cañas (tejido parenquimático abundante) y; esponjosos (juncos).

Hábito de crecimiento: erguidos (troncos, estípite, cálamo, escapo), bejucos, trepadores y rastreros.

Forma: cilíndricos, sección circular, cuadrangulares, triangulares, alados, dilataciones longitudinales y aplazados.

Modificaciones: características adaptativas resultantes, como estolón (ramificaciones laterales), rizoma (subterráneo), tubérculo, bulbo tallo con yema central rodeado de escamas), cormo (similar al bulbo, pero con tallo más desarrollo y escamas reducidas), bulbillo (tejidos desarrollados en axilas de hoja, inflorescencias y hojas), cladodio (tejido con apariencia de hojas generadoras de espinas o escamas), espinas y acúleos (estructuras tipo espina o agujón sin tejido vascular).

- Clase de hojas.

Existen numerosas características diferenciales entre hojas, derivadas de las condiciones genéticas y la interacción evolutiva con el ambiente; el proceso de clasificación de los diferentes tipos de hojas corresponde a la identificación de rasgos asociados a forma, pecíolo, complejidad, nervaduras, ápice, base y bordes; a continuación, una caracterización genérica de estas categorías.

Forma: acicular (pino), lineal (gramíneas), lanceolada (sauce), oblanceolada, espatulada, oblonga, elíptica, ovalada, obovada, orbicular, peltada, abcordada, rombioidal, reinforme, sagitada, deltoide, obdeltoide, astada, cuneiforme, perfoliada, pandurada, decurrente, falcada, ensiforme.

Pecíolo: peciolada, subpeciolada, sésiles, envainadas y aladas. Complejidad: simples y compuestas (que poseen más de una lámina foliar). Las compuestas se dividen en palmado compuestas (láminas emergen de un mismo punto del pecíolo), pinnado-compuesta (láminas emergen a lo largo del raquis).

Nervaduras: retinervadas (nervadura central y ramificaciones secundarias y terciarias) y paralelinervadas que presenta dos subdivisiones, la primera, nervadura central y otras nervaduras paralelas y, la segunda, nervadura central y nervaduras paralelas perpendiculares a la nervadura.

Ápice: redondeado, robusto, agudo, atenuado, truncado, emarginado, retuso, cuspido, mucrunato, acuminado, espinoso, aristado, caudado. Base: asignación relacionada con la forma de la base, donde se distinguen redondeada, asimétrica, obtusa, aguda, cordada, cuneada, atenuada, truncada, sagitada, auriculada, abrazadora y astada. Borde: entero (cuando no existe escotadura o dientes) o lobado (cuando existen escotaduras y lóbulos más o menos anchos).

### 2.3. Órganos fotosintéticos.

Fotosíntesis: es un proceso físico-químico a través del cual las plantas, algas y algunas bacterias utilizan energía solar para sintetizar los compuestos orgánicos necesarios para su supervivencia. En este proceso, se utiliza el dióxido de carbono atmosférico, liberando oxígeno molecular, dando lugar a la fotosíntesis oxigénica. En términos evolutivos, el desarrollo biológico que significó la fotosíntesis oxigénica transformó radicalmente las posibilidades biológicas en el planeta, estableciendo un conjunto de condiciones sin precedentes para la vida.

Las plantas presentan pigmentos fotosintéticos, organizados en estructuras denominadas fotosistemas; el complejo molecular de pigmentos fotosintéticos y proteínas se une a la membrana tilacoidal; en este sitio también se encuentra un centro de reacción fotoquímica constituido por un complejo molecular de clorofila y proteínas.

Las membranas tilacoidales presentan dos tipos de fotosistemas; estos complejos fotoquímicos son conocidos como fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII), cada uno contiene un centro de reacción fotoquímico, identificados como P700 y P680, respectivamente.

#### 2.4. Fase luminosa y oscura de la fotosíntesis.

La fotosíntesis implica la transformación de energía lumínica en energía química, para que esto suceda, deben ocurrir un conjunto de situaciones específicas en su conjunto; los organismos deben captar la luz y luego los pigmentos fotosintéticos deben disponerse en la membrana tilacoidal para desarrollar el proceso de síntesis. En mayor nivel detalle, puede definirse la fotosíntesis en dos categorías específicas de reacciones: la fase fotoquímica (fase luminosa) y la fase de fijación de carbono (fase oscura). La primera, corresponde a la transformación de la energía lumínica en energía química.

#### 2.5. Sistema de tejidos vasculares.

Otros tejidos fundamentales además de Xilema y Floema:

- Elementos del vaso: células alargadas con paredes gruesas que regularmente no contienen protoplasma vivo en su estado de madurez, estos órganos forman filas unidas longitudinalmente conectadas entre sí mediante perforaciones, las funciones de éstos son el transporte de agua y minerales, así como el sostenimiento de la planta.
- Fibras: son paredes fuertemente lignificadas, conformando estructuras más largas que las traqueidas, que terminan en puntas agudas, su función es de tipo mecánico en la planta.
- Parénquima: es similar al parénquima que se encuentra en el resto de la planta; su función es el almacenamiento de sustancias requeridas por la planta.
- Elementos cribosos: existen dos tipos, las células cribosas (menormente especializados) y los tubos cribosos (mayormente especializados); son células vivas, los tubos se encuentran dispuestos longitudinalmente, en sus paredes, se forman llamadas áreas cribosas, la función de estas estructuras es el transporte de savia elaborada hasta los sitios de almacenamiento y consumo.
- Células acompañantes: células parenquimáticas altamente especializadas que suelen asociarse a los tubos cribosos, guardan una función complementaria con los elementos cribosos.

- Elementos cribosos: existen dos tipos, las células cribosas (menormente especializados) y los tubos cribosos (mayormente especializados); son células vivas, los tubos se encuentran dispuestos longitudinalmente, en sus paredes, se forman llamadas áreas cribosas, la función de estas estructuras es el transporte de savia elaborada hasta los sitios de almacenamiento y consumo.
- Células acompañantes: células parenquimáticas altamente especializadas que suelen asociarse a los tubos cribosos, guardan una función complementaria con los elementos cribosos.
- Células parenquimáticas: células similares a las del xilema, su función es el almacenamiento de sustancias de reserva, como almidón, grasa, taninos, resinas.
- Fibras: estas fibras forman paredes secundarias después de completar su alargamiento.
- Traquiedas: células muertas alargadas, con terminación en punta roma y presencia de poros laterales; sus funciones básicas son el transporte de savia bruta y sostenimiento de la planta.

### 3. Clasificación de material vegetal

Uno de los elementos centrales en el logro de rendimientos apropiados en la producción agrícola radica en la utilización de una semilla de calidad para generar el desarrollo de los cultivos respectivos; este tipo de premisa es también fundamental en el establecimiento de estrategias de propagación in-vitro del material vegetal, pese a no recurrirse al uso directo de la semilla en muchos de sus procedimientos, el concepto de propagación remite al mismo principio de necesidad de contar con un reservorio genético apropiado para la multiplicación de ejemplares cuyo uso o intencionalidad final, será la productividad general que pueda generar implícitamente.

3.2. Determinación de especie madre e importancia de la selección de la Planta Madre Inicialmente, debe determinarse el tipo de especie que se espera reproducir, la selección de la especie es crucial y debe responder a las condiciones que motivan el ejercicio de propagación que se empieza a emprender, sea con fines investigativos o comerciales, debe establecerse claridad en el panorama no solo de las especies, también de las variedades vegetales a utilizar, a partir de la confrontación entre el objetivo de los ensayos de laboratorio y las características específicas de cada material vegetal con potencial de uso.

Posterior a la determinación de los individuos donantes, se procederá a realizar la selección de las estructuras vegetativas para realizar la propagación de las Plantas Madre, en este punto, se ha de generar la respectiva toma del material vegetal necesario para el desarrollo del cultivo, guardando las debidas medidas de control fitosanitario; posterior a la propagación del material vegetal, se procede a cultivar las plantas obtenidas, seleccionando aquellas que presentan un perfil de desarrollo vigoroso y libre de enfermedades u otras anomalías, determinando de esta manera, las plantas donantes de material vegetal objeto de micropropagación (Suárez. 2020). El sostenimiento del Banco de Plantas Madre debe asegurarse durante periodos de tiempo prudenciales que oscilan entre semanas y meses bajo condiciones controladas de sanidad vegetal, nutrición e irrigación, garantizando una consolidación apropiada de los ejemplares donantes.

- 3.3. Descripción del estado sanitario y nutricional de la especie o planta madre Regularmente, los medios de cultivo usados resultan suficientes para mantener saludable a las Plantas Madre; sin embargo, es posible adicionar coayudantes como micorrizas y estimuladores de enraizamiento al sustrato, permitiendo mejorar el perfil de complementariedad del sustrato mediante la flora microbiana.

Es fundamental la realización de un seguimiento oportuno al proceso de consolidación de las Plantas Madre, debido a que muchos de los indicativos del crecimiento y desarrollo son reconocibles únicamente desde la observación sistemática del cultivo, por esta razón, el levantamiento de un registro claro y permanente de las características de los ejemplares es el mecanismo principal para la identificación de posibles anomalías, pero también para preservar las memorias de la metodología utilizada para futuras ocasiones.

#### 4. Selección de explantes para utilización de técnica in-vitro

##### 4.1. Descripción del fenotipo

El seguimiento de las condiciones fenotípicas se realiza desde el levantamiento de registro de variables cualitativas y variables cuantitativas a partir de la identificación de condiciones observables de la planta; entre las primeras, destacan color, tipo de estructura (árbol, arbusto, etc.), forma de copa, entre otras, para el caso de la segunda, destacan la arquitectura del ejemplar (área foliar, ángulo foliar, ángulo de ramas, interceptación solar), crecimiento del ejemplar (número de cruces, altura, diámetro, número de nudos), para los estadios de madurez, una interpretación de este tipo de condiciones también incluye las características de los frutos (longitud, ancho, espesor y peso) y pedúnculos (longitud).

#### 4.1. Descripción del fenotipo.

El cultivo de las Plantas Madre en un medio aséptico permite una reducción considerable de las posibilidades de agentes contaminantes, como es el caso de hongos que pueden llegar a encontrar un medio propicio para reproducirse en laboratorio aprovechando condiciones ofrecidas por el medio de cultivo y el microclima generado en el mismo; gran parte del riesgo de contaminación con potencial de afectación sanitaria al cultivo in-vitro, proviene de las Plantas Madre, por este motivo, es fundamental lograr un diagnóstico oportuno de la condición de salud de las plantas donantes y, en consecuencia, la realización de un tratamiento acorde con la situación.

#### 4.2. Separación de explantes como yemas o meristemas axilares.

El tamaño del explante, es una condición que también presenta relevancia dentro del proceso de establecimiento del cultivo in vitro; por una parte, mientras es más pequeña la muestra de tejido obtenido, menor es su capacidad de supervivencia, esto debido a que es un menor número de células las que terminan soportando el proceso de crecimiento y correspondiente estrés asociado en la diferenciación; en cuanto al cultivo de meristemas, orientado hacia la propagación de material vegetal libre de virus, puede presentarse una condición contradictoria a este principio, puesto que la probabilidad de propagación de plantas sanas es inversamente proporcional al tamaño del explate, es decir, a menor tamaño de la muestra de tejido utilizado, disminuye el riesgo de obtener plantas con agentes patógenos (Suárez. 2020).

En este escenario, los meristemos representan un papel importante dentro del proceso de reproducción in vitro; estos son grupos de células en estado juvenil que cuentan con una capacidad notable de división constante, siendo su principal funcionalidad, la reproducción de plantas libres de agentes patógenos; dicha funcionalidad sucede a causa de la ausencia de canales conductores de organismos como virus, por ejemplo, permitiendo una disminución del riesgo a contaminación del material vegetal resultante. El explante más utilizado, son las yemas apicales del vástago, estacas uninodales portadoras de yemas axilares, discos de hoja, secciones de raíz y meristemas (Sharry. et al. 2015). El proceso de remoción y manipulación de cada tejido debe conservar protocolos de asepsia específicos, así como establecer la metodología más apropiada en concordancia con la morfología vegetal y las características concretas de las respectivas especies vegetales a propagar.

#### 4.3. Limpieza de explantes

El profundizar en este campo, expone aspectos que en apariencia no ejercerían incidencia sobre las condiciones de sanidad de las plantas, pero que, ciertamente, pueden llegar a afectar gravemente el recurso biológico manipulado, entre estos aspectos se reconoce la arquitectura de los espacios de trabajo, edad y procedencia del material vegetal, condiciones culturales de los operarios traducida en prácticas de higiene y hasta la habilidad o destreza en el ejercicio, pudiendo llegar a generar presuntas afectaciones (Sharry. 2015).

Entre los organismos que pueden representar riesgo de contaminación al material vegetal, se encuentran hongos, bacterias y levaduras, muchos de los cuales, en espacios de producción (cultivo en campo), no representan una amenaza manifiesta a las plantas consolidadas; sin embargo, en el cultivo in-vitro, si ocasionan afectaciones directas y/o indirectas sobre el desarrollo de los tejidos propagados, en la búsqueda de diferenciación celular y generación de órganos especializados.

Bajo estas consideraciones, debe realizarse desinfección del explante, previa a su utilización, de manera que se eliminen organismos patógenos que pueda traer consigo; para el desarrollo de esto, se reseña lo postulado por Sharry. et al. (2015), cuando expresa que se deben utilizar sustancias químicas que proporcionen la posibilidad de eliminar los microorganismos indeseados, sin afectar el material vegetal para la propagación.

### 4. Unidades de expresión de las sustancias en preparación cultivo

- 4.1. En el año de 1962, Toshio Murashige y Floke K. Skoog mientras investigaban requerimientos minerales en el tabaco, obtuvieron una combinación de sales con altos contenidos de nitrato y amonio que permitieron alcanzar tasas de crecimiento vegetal de hasta 25 veces más que las combinaciones usadas tradicionalmente hasta ese momento. el rendimiento sin precedentes de esta formulación ha permitido que en la actualidad siga siendo el principal medio de cultivo utilizado en el mundo.

Nota: en la tabla 1 del documento central, el primer medio de cultivo denominado MS, corresponde al planteamiento realizado por Murashige y Skoog y que se referenció como el mayormente utilizado en el campo de la propagación vegetativa in-vitro.