

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Isidro Elías Suárez Padrón



CULTIVO DE **TEJIDOS VEGETALES**

Isidro Elías Suárez Padrón, Ph. D.



© Cultivo de Tejidos Vegetales, Fondo Editorial Universidad de Córdoba,
Cra. 6 No. 77 -305 Montería Colombia,
ISBN 978-958-5104-09-9

Edición 2020

Isidro E. Suárez Padrón, Ph. D., Profesor Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas,
Universidad de Córdoba.

Email: iesuarez@correo.unicordoba.edu.co

Diseño, Diagramación e impresión: GRÁFICAS DEL CARIBE S.A.S. Cra. 1B No. 40-42 Montería
Tel. (57) (4) 782 6622

Email: diseno@graficaribe.co



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.

DEDICATORIA

A Claudio y Juan.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

La Universidad de Córdoba

La Vicerrectoría de Investigación y Extensión

La Facultad de Ciencias Agrícolas

El Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural

Rodolfo Sánchez Torrecilla

El Equipo de Trabajo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la
Universidad de Córdoba

CONTENIDO

PRESENTACIÓN	11
1. PREHISTORIA E HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	13
1.1 El primer cultivo de tejidos	14
1.2 La teoría celular y totipotencia	14
1.3 El primer cultivo in vitro	14
1.4 Crecimiento de tejidos in vitro	15
1.5 Cultivo indefinido	16
1.6 Micropropagación	17
1.7 Cultivo indefinido de callo	17
1.8 Cultivo de meristemas y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
1.9 Citocininas y organogénesis	18
1.10 Medios de cultivo	18
1.11 Embriogénesis somática	19
1.12 Se prueba la teoría celular	19
2. EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	21
2.1 Áreas del laboratorio	22
2.2 Medidas de seguridad	26
2.3 Equipos, utensilios y reactivos básicos necesarios	27
3. TÉCNICA ESTÉRIL DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	29
3.1 Tipos de contaminantes en el cultivo in vitro	30
3.2 Fuentes de contaminación	32
3.3 Técnica estéril	34
4. MEDIOS DE CULTIVO	41
4.1 Componentes de un medio	42
4.2 Formulación y preparación de medios de cultivo	50
5. MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS	57
5.1 Generalidades de la micropropagación	58
5.2 Métodos de micropropagación de plantas	59

6.	SUSPENSIONES CELULARES	79
6.1	Material vegetal	80
6.2	Fases de un cultivo en suspensión celular	80
6.3	Medición del crecimiento en suspensiones celulares	84
7.	CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA IN VITRO	87
7.1	Almacenamiento por crecimiento lento	89
7.2	Crioconservación	89
8.	CULTIVO DE PROTOPLASTOS	95
8.1	Aislamiento de los protoplastos	96
8.2	Aplicaciones del aislamiento y cultivo de protoplastos	99
9.	SELECCIÓN IN VITRO	101
9.1	Selección in vitro de variantes somaclonales	102
	BIBLIOGRAFÍA	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Busto de Gottlieb Haberlandt en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Ciencias Agrícolas en Bengaluru, India.	15
Figura 2.	Esquema de una cámara de flujo laminar.	25
Figura 3.	Plano del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Córdoba.	28
Figura 4.	Crecimiento micelial de hongos en cultivo de tejidos.	31
Figura 5.	Esquema del proceso de micropropagación.	61
Figura 6.	Estados de establecimiento (A), multiplicación (B), enraizamiento (C) y adaptación ex vitro (D) en la micropropagación de plantas de caña flecha (<i>Gynerium sagittatum</i> Aubl.).	66
Figura 7.	Organogénesis de plantas de tabaco.	67
Figura 8.	Inducción (A), multiplicación de tejidos embriogénicos (B) y desarrollo de embriones somáticos de ñame (C) <i>Dioscorea</i> sp.	75
Figura 9.	Recuperación de una planta de aguacate (<i>Persea americana</i>) a partir de un embrión somático.	76
Figura 10.	Gráfica del crecimiento de suspensiones celulares de cuatro líneas embriogénicas de aguacate (Suárez, 2003).	83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Formulación de macro y micronutrientes de cuatro medios de cultivos.	51
Tabla 2.	Tiempos de esterilización en autoclave de acuerdo con la cantidad de medio en el recipiente.	54

PRESENTACIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que comprende el mantenimiento de plantas o componentes de estas en condiciones ambientales controladas, ausencia de microorganismos asociados, nutrición heterotrófica y en recipientes de plástico o vidrio; que ha sido utilizado en muchos aspectos del desarrollo agrícola y la investigación vegetal.

El establecimiento exitoso de plantas, o partes de estas, ha permitido desarrollar técnicas alternativas de manejo agronómico que han revolucionado los sistemas de producción agrícola, y en algunos casos ha posibilitado la aplicación de ciertos métodos que sin el desarrollo de protocolos de cultivo *in vitro* sería imposible ejecutarlos. La micropropagación de plantas permite la propagación clonal masiva de plantas en espacios reducidos y obteniendo tasas de multiplicación inimaginables bajo condiciones normales de multiplicación de propágulos asexuales, la propagación eficiente de plantas que no producen semillas y la oportunidad de producir plantas sanas a partir de material infectado con contaminantes sistémicos. El cultivo de protoplastos facilita la inserción de moléculas o componentes en el citoplasma celular que son imposibles de introducir en tejidos o células intactas. El cultivo de porciones caulinares, células de callo o embriones somáticos facilita el almacenamiento de recursos genéticos en condiciones eficientes de espacio con una mayor seguridad en contra de deterioros naturales y amenazas ambientales. Las mismas estrategias ofrecen la posibilidad de convertirse en fuentes alternas de generación de variabilidad genética en especies con dificultades para evolucionar por métodos tradicionales de mejoramiento vegetal y la posibilidad de regenerar plantas a partir de células de forma individual es condición indispensable para recuperar plantas que se originan por procedimientos de transformación genética.

El presente texto ofrece una mirada integral de la ciencia del cultivo de tejidos vegetales abarcando desde la evolución de las técnicas de los pioneros que iniciaron en ausencia de técnicas asépticas, pasando por las necesidades logísticas para su implementación actual, enfatizando en los fundamentos biológicos y procedimentales de cada técnica y especificando las ventajas y limitantes para la aplicación en agricultura, con lo cual espera convertirse en una referencia para estudiantes, docentes, empresarios y científicos de esta maravillosa área de la biotecnología vegetal.

EL AUTOR

1. PREHISTORIA E HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo in vitro de tejidos vegetales se define como el crecimiento aséptico de plantas, o partes de estas, en recipientes de vidrio o plásticos, con medios de cultivos artificiales y mantenidas en condiciones controladas de luz y temperatura. Este conjunto de técnicas tuvo el desarrollo mas acelerado hacia mediados del siglo XX como resultado de los trabajos que permitieron el empleo de una gran variedad de medios de cultivo suplementados con hormonas sintéticas y los avances en el manejo fisiológico de las plantas madres. A pesar de los avances relativamente recientes, las bases para este gran desarrollo tecnológico comenzaron a edificarse cientos de años atrás. En esos inicios, los pioneros del cultivo de tejidos no contaron con insumos como técnicas microbiológicas, equipos precisos de medición o suplementos sintéticos modernos, lo cual hace más significativo sus aportes.

1.1 El primer cultivo de tejidos

El primer reporte conocido de un cultivo de tejidos vegetales fue consignado por Henri-Louis Duhamel du Monceau, Agrónomo e inspector general de la marina francesa (Arditi, 2008). En su larga obra, Du Monceau publicó experimentos relacionados con la circulación de savia en las plantas, injertos y cicatrización de heridas. En una de sus anotaciones describe como al remover un pequeño anillo de corteza de un Olmo, se observaba el crecimiento de un tejido amorfo que ayudaba a la cicatrización de la herida. La descripción que hizo Du Monceau del tejido sería mas tarde entendido como el callo formado por masas de células indiferenciadas que crecen de manera desorganizada e indefinida.

1.2 La teoría celular y totipotencia

Los trabajos realizados por Matthias Schleiden relacionados con la observación microscópica de tejidos vegetales, le permitió formular la teoría celular (Schleiden, 1838). En su tesis, conceptuó que la célula vegetal constituía la unidad básica, común y estructural de todas las plantas. Posteriormente, Theodor Schwann formularía la misma teoría relacionada con animales, unificando las bases celulares en ambos organismos (Schwann, 1939).

El concepto de totipotencia, derivado de la teoría celular, afirma que toda célula contiene la información suficiente y necesaria para regenerar otras células e incluso el organismo entero. Este concepto influyó notablemente en los trabajos científicos sucesivos, los cuales orientaron todos sus objetivos en la búsqueda de probar la teoría celular.

1.3 El primer cultivo in vitro

El primer cultivo de tejidos vegetales utilizando un medio de cultivo como sustrato y desarrollado dentro de recipientes de vidrio, fue obra del botánico alemán Gottlieb Haberlandt (Gautheret, 1985) (Figura 1). El experimento consistió en el aislamiento de células individuales

de tejidos foliares del parenquima empalizada, seguido del establecimiento de las mismas en medios de cultivo suplementados con glucosa. A pesar de las condiciones tecnológicas de la época, Haberlandt mantuvo sus cultivos libres de contaminación y observó un aumento en el volumen de las células, pero la división de las mismas no se llevó a cabo y con el tiempo murieron.



Figura 1. Busto de Gottlieb Haberlandt en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Ciencias Agrícolas en Bengaluru, India.

Al final de su vida profesional, y dejando a un lado su pensamiento dogmático, Haberlandt humildemente reconoció la selección equivocada de sus tejidos (células individuales altamente diferenciadas) y enfatizó en la necesidad de conocer los requerimientos nutricionales de las células para poder inducir la división y multiplicación de estas.

1.4 Crecimiento de tejidos in vitro

El primer avance en la proliferación de tejidos vegetales en condiciones in vitro fue fruto del trabajo de W. J. Robbins y Kotte de forma separada, pero en periodos de tiempo simultáneos (Robbins, 1922; Kotte, 1922).

Ambos investigadores establecieron meristemos radicales de plantas de maíz en condiciones in vitro, basándose en la posibilidad

de que los tejidos meristemáticos crecieran con mayor rapidez que otros tejidos. Al principio, los tejidos crecieron en presencia de medios suplementados con extracto de levaduras, glucosa y otros compuestos nitrogenados; sin embargo, con el tiempo el crecimiento disminuyó, se presentó un deterioro progresivo y fenolización que finalmente causó la muerte de los mismos.

Las evaluaciones posteriores determinaron que la falta de transferencias a medios frescos y el uso de una especie monocotiledona de naturaleza recalcitrante al cultivo in vitro contribuyeron a evitar el crecimiento indefinido de los tejidos establecidos.

1.5 Cultivo indefinido

Tomando como base el trabajo de Robbins y Kotte, Phillip White logró el primer cultivo indefinido de tejidos en condiciones in vitro (White, 1934).

Habiendo analizado los reportes de sus antecesores, White cambió de especie y, en lugar de maíz, utilizó meristemos radicales de tomate, los cuales transfirió de forma periódica a medios de cultivo nuevos de la misma formulación. Esta estrategia le permitió alcanzar el éxito que fue esquivo a sus predecesores, reafirmando la necesidad de las transferencias periódicas a medio nuevo y la dificultad de trabajar in vitro con especies monocotiledoneas.

Resulta interesante anotar que el trabajo de White en el Instituto Rockefeller consistió en encontrar las condiciones para perpetuar la infección de virus vegetales en tejidos in vitro, lo cual obtuvo exitosamente. Sin embargo, en varias oportunidades notó la presencia de tejidos sanos obtenidos a partir de otros infectados. Las observaciones más detalladas, le permitieron constatar que al aislar y cultivar solamente la zona meristemática del apice radical, los nuevos tejidos crecían sin la presencia del virus, y para conservar la infección era necesario tomar dicha zona asociada con mayor

cantidad de tejido proximal (basal). Esta observación fue la base para explicar mas tarde la técnica de cultivo de meristemos utilizada para la eliminación de partículas virales y otros patógenos sistémicos.

1.6 Micropropagación

La primera aplicación comercial de las técnicas de cultivo de tejidos resultó de la publicación de Ernest Ball relacionada con la propagación sostenida de plantas in vitro (Ball, 1946). El trabajo consistió en la identificación de meristemos apical y axilar como los explantes ideales para desarrollar una planta completa. Este avance vino a convertirse en el método de micropropagación a partir de explantes con meristemos pre-existentes, el cual es el mas utilizado en la micropropagación comercial moderna para la producción masiva de plantas en condiciones in vitro.

1.7 Cultivo indefinido de callo

Los avances mas significativos en el cultivo de callos fueron publicados de forma independiente y simultanea por Pierre Nobercourt, Philip White y Roger Gauthereth (Nobercourt, 1938; Gautheret, 1939; White, 1939). Nobercourt utilizó explantes consistentes de discos de raíces de zanahoria, mientras que White estableció tejidos originados en tumores de un híbrido de *Nicotiana glauca* x *Nicotiana langsdorffii*. Además de utilizar explantes de zanahoria, Gauthereth utilizó tejido cambial de diversas especies y observó el dinámico crecimiento de éstos. Con el fin de mejorar las posibilidades de supervivencia y subcultivo de los tejidos adicionó por primera vez una hormona aislada (ácido indolacético) al medio de cultivo, lo cual incrementó la proliferación del callo inducido e inició una nueva era en el cultivo de tejidos vegetales in vitro.

1.8 Cultivo de meristemos y *Agrobacterium tumefaciens*

Los avances logrados por White en sus experimentos con raíces de tomate, fueron las bases del trabajo realizado por Georges Morel

quien fue uno de los primeros investigadores en trabajar in vitro con especies como orquídeas y vid (Morel, 1963).

Morel desarrolló los métodos prácticos de aislamiento y cultivo de meristemos apicales para la obtención de plantas sanas a partir de material parental infectado con virus, especialmente en orquídeas. Para la época en que se realizaban estos estudios, una enfermedad caracterizada por la formación de tumores (agallas) en la corona de los tallos, y considerada en su momento un cáncer vegetal, centró la atención de muchos investigadores. Gracias a sus estudios, Morel fue el primero en descubrir la presencia de opinas, unos metabolitos sintetizados por *Agrobacterium tumefaciens*, en los tumores desarrollados en las plantas y considerar el término transformación para explicar dicho fenómeno (Petit et al., 1970).

1.9 Citocininas y organogénesis

La adición de agua de coco en los medios de cultivo y su efecto en la proliferación de los tejidos vegetales cultivados in vitro, interesó de manera particular a varios investigadores. Inicialmente se demostró el efecto inductor de crecimiento y multiplicación celular de la adenina en los tejidos vitro (Skoog y Tsui, 1948) y posteriormente, fue aislada la kinetina a partir de extractos de levadura sometidos a altas temperaturas mediante el autoclave (Miller et al., 1955).

El aislamiento previo de las auxinas, y ahora de las citocininas, dieron un impulso significativo al crecimiento de los tejidos en condiciones in vitro, demostrándose de forma experimental la influencia de las proporciones de auxinas y citocininas en la formación de órganos y crecimiento de callo a partir de cultivos de tabaco (Skoog y Miller, 1957).

1.10 Medios de cultivo

El desarrollo de formulaciones que proporcionaran el medio de cultivo ideal para el crecimiento de los cultivos aislados y cultivados en condiciones in vitro fue un tema de gran actividad investigativa a

partir de la segunda mitad del siglo XX. Esto permitió el desarrollo de varias formulaciones para diferentes propósitos, la mayoría de estas basadas en cantidades relativamente bajas de sales.

Murashige y Skoog (1962) estudiaron de forma detallada los requerimientos minerales de cultivos celulares de tabaco, obteniendo una formulación con mayores cantidades de sales. El alto contenido de NO_3 y NH_4 permitió que los tejidos tuvieran tasas de crecimiento hasta 25 veces superiores a las obtenidas hasta ese momento con otras formulaciones. En la actualidad, el medio de Murashige y Skoog es el más utilizado en el cultivo de tejidos vegetales a nivel mundial.

1.11 Embriogénesis somática

El primer reporte difundido acerca de la formación de embriones a partir de células somáticas en condiciones in vitro fue publicado por F. C. Steward, en el Congreso Botánico de Kiev en 1958, mostrando la formación de embriones a partir de suspensiones celulares de zanahoria (Steward et al., 1958).

La publicación acerca de la embriogénesis somática causó gran controversia por tratarse de la primera vez que se conocía del desarrollo de embriones fuera del saco embrionario, considerado como el ambiente único para el crecimiento embriogénico. Posteriormente, se pudo comprobar que la formación de embriones somáticos fuera del saco embrionario había sido previamente lograda por Stevenson (1956) y Mahershwari y Rangaswamy (1956) a partir de tejidos nucelares de cítricos.

1.12 Se prueba la teoría celular

La demostración de la teoría celular y el efecto de totipotencia, convertida en casi una obsesión, fue esquiva hasta pasada la primera mitad del siglo XX.

La errónea concepción inspirada en los trabajos de Haberland donde se consideró la posibilidad de que células aisladas pudieran dar origen a una planta completa fue descartada, promoviendo nuevas estrategias que permitieron identificar el origen de una nueva planta a partir de una célula en particular sin ser necesario que esta se encontrara en completo aislamiento. Vasil y Hildebrandt (1965), utilizando células del híbrido *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana tabacum*, utilizaron un sistema de separación mediante una membrana que evitaba el contacto directo de la célula individual con un grupo de células, sin evitar que los exudados de una y otra entraran en contacto (separación sin aislamiento). Este método determinó que el efecto de vecindad entre las células era determinante y que la totipotencia era una realidad incompatible con el aislamiento celular.

2. EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos es la parte de la biotecnología aplicada a la propagación de plantas y estudio de los sistemas celulares vegetales en condiciones de estricto control de las condiciones ambientales, por lo que debe desarrollarse en sitios que garanticen ciertas condiciones ambientales denominados laboratorios.

El laboratorio de cultivo de tejidos es una localidad en la cual se busca modificar las condiciones normales de luz, temperatura y humedad, y prevenir la presencia de agentes contaminantes. Adicionalmente, debe estar dotado con una serie de equipos y herramientas para ser utilizados en la preparación de medios de cultivo, desinfección de materiales y crecimiento de plantas, órganos o tejidos vegetales.

El proceso global que se lleva a cabo en un laboratorio de cultivo de tejidos consta de una secuencia jerárquica de operaciones que se articulan para ejecutar un proceso global, en el cual la eficacia y eficiencia dependen de la coordinación con que se desarrollen cada una de las etapas o fases del mismo. Es por esto, que las áreas o secciones en las cuales se encuentra organizado un laboratorio de cultivo de tejidos deben estar distribuidas de tal forma que el flujo de las actividades se desarrolle con el propósito de alcanzar una mayor eficiencia de cada una de las actividades y del proceso en general.

2.1 Áreas del laboratorio

Área de dirección

Es el área destinada a la realización de actividades administrativas y académicas, donde se encuentran ubicadas preferencialmente las personas que dirigen el laboratorio y los investigadores asociados.

El área administrativa debe estar dotada de mobiliarios de oficina, equipos de cómputo y sala de juntas; debe estar conectada con el área experimental, pero no ubicarse dentro de ésta, ya que en algún momento es posible contar con la presencia de personal ajeno a las actividades propias del laboratorio.

Área de lavado y limpieza

La limpieza inadecuada de los recipientes y utensilios, así como la disposición deficiente de los desechos, constituyen algunas de las principales fuentes de contaminación en las operaciones del cultivo de tejidos. Para favorecer una asepsia adecuada, todo laboratorio debe contar con un área definida para realizar la limpieza de utensilios y herramientas, y contar con un sistema eficaz para la disposición final de los materiales que puedan generar contaminación.

El área de lavado y limpieza debe tener paredes y mesas construidas con materiales rígidos y lisos (enchapes, acero, etc.) para prevenir la acumulación de microorganismos, tener un suministro permanente de agua, contar con lavaderos y drenajes, recipientes cerrados para la disposición de desechos, contar con sitios que permitan el secado de la cristalería y demás materiales lavados.

Área de preparación de medios de cultivo

La preparación de medios de cultivo requiere del uso de equipos como balanzas, platos giratorios y potenciómetros, utensilios como beakers, tubos de ensayos, espátulas y barras giratorias, e insumos como sales, hormonas y reactivos.

Ciertos equipos, como el potenciómetro, deben ser calibrados diariamente, y anexo al sitio donde se ubica cada equipo debe encontrarse impreso el protocolo que debe seguirse para su utilización y el manual del fabricante para resolver cualquier inquietud. Los utensilios deben mantenerse limpios, guardados en sitios cerrados y ordenados en grupos comunes, mientras que los insumos y reactivos se deben almacenar en sitios cerrados protegidos de las altas temperaturas e impermeables a la alta humedad relativa.

Es conveniente ubicar los insumos y reactivos en vitrinas cerradas y ordenarlos alfabéticamente, teniendo en cuenta que ácidos y bases deben almacenarse separadamente; igualmente, los compuestos higroscópicos deben ubicarse en sitios secos distantes de los demás productos. Debido a los costos y las cantidades utilizadas, para los compuestos que requieran de refrigeración (reguladores de crecimiento, antibióticos, etc.) es preferible adquirirlos y almacenarlos en pequeñas cantidades para evitar pérdidas que se puedan presentar por fallas en el fluido eléctrico o por vencimiento de viabilidad.

Con el fin de mantener un control permanente de las existencias y evitar pérdidas o insuficiencias, algunas veces con repercusiones graves en los procesos, es necesario llevar un registro de inventario que indique no solamente las cantidades existentes de cada uno de los productos sino también sus características físico químicas y el sitio de almacenamiento.

Área de esterilización

Esta es el área donde se encuentran los equipos destinados a reducir significativamente los contaminantes potenciales del medio de cultivo y explantes. Aunque algunas veces se utiliza filtración, normalmente la esterilización de medios y utensilios se lleva a cabo en autoclaves, que generan altas temperaturas (120 °C) y presiones (1.1 PSI) que son imposibles de soportar por los organismos vivos, complementado con colocación previa en estufa de secado (1 a 3 horas a 200 °C) de todos los elementos de vidrio y metálicos.

El área de esterilización debe tener una buena ventilación para contrarrestar las altas temperaturas generadas por el autoclave, en el laboratorio contar con espacios suficientes que permitan la libre movilidad y estar adecuada con mesas construidas con materiales resistentes al calor intenso.

La adopción de un plan de mantenimiento preventivo que permita detectar de forma temprana fallas en conexiones eléctricas, fugas de agua o presión, y deterioro de partes, es indispensable para tener un buen funcionamiento de los equipos y reducir los riesgos de accidentes laborales.

Área de producción

Esta es la zona del laboratorio donde se llevan a cabo las labores de establecimiento de explantes y subcultivos que tienen como objetivo la multiplicación de plantas o tejidos vegetales.

Las tasas de producción en cultivo de tejidos son una resultante de la selección de un explante en condiciones fisiológicas óptimas, el suministro de un medio de cultivo adecuado durante los estados de establecimiento y multiplicación, y la presencia de un ambiente libre de contaminantes. Para cumplir con este último requerimiento, el área de producción debe estar dotada con cámaras de flujo laminar, las cuales proveen un ambiente de trabajo limpio como resultado de la filtración del aire que expulsa (Figura 2).

Además de la desinfestación superficial del explante inicial, las labores normales y rutinarias que se desarrollan en el área productiva, como son la apertura de recipientes, transferencias a medios frescos y manipulación directa de los tejidos, son las que presentan el mayor riesgo de contaminación el material vegetal in vitro. Es por esto que el área de producción debe ser una de las secciones con la mayor restricción para el tránsito de personas ajenas a las actividades que se realizan en esta área, y donde los protocolos de las técnicas estériles deben seguirse más estrictamente para lograr un buen funcionamiento.

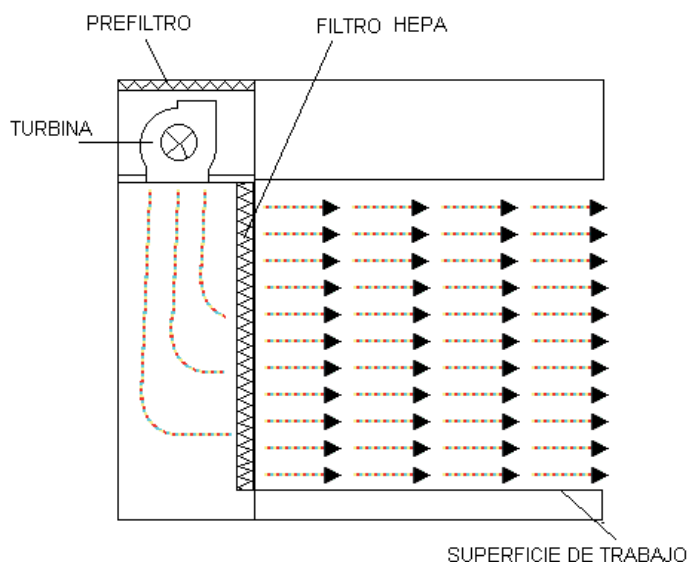


Figura 2. Esquema de una cámara de flujo laminar.

El área de producción también debe estar dotada con recipientes para el depósito de desechos, sitios para colocar de forma momentánea los recipientes desde donde se transfirieron los cultivos, instalaciones eléctricas que permitan uso de equipos como balanzas y microscopios, y tener un espacio suficiente que facilite el desplazamiento y la rápida evacuación.

Área de crecimiento

Es el área destinada a permitir el crecimiento y desarrollo de los tejidos después de haber sido establecidos en los medios de cultivo.

Una vez subcultivado, el material vegetal debe ser colocado en condiciones ideales de luz y temperatura proporcionadas por sistemas controlados de iluminación y aire acondicionado. A pesar de que los cultivos en período de crecimiento deben ser disturbados lo menos posible, es preciso realizar monitoreos permanentes con el fin de identificar problemas y eliminar cultivos contaminados para evitar la diseminación de microbios, por lo que el diseño de esta área debe garantizar el fácil desplazamiento del personal.

2.2 Medidas de seguridad

Un laboratorio de cultivo de tejidos, además de ser un sitio diseñado para el manejo de componentes vegetales in vitro y la generación de nuevos conocimientos, es a la vez un sitio donde se encuentran depositados equipos que funcionan con altas temperaturas y altas presiones, reactivos inflamables y materiales que mal manejados representan grandes riesgos para el funcionamiento y la salud humana.

Para disminuir los riesgos de accidentes y facilitar la evacuación en caso de presentarse alguna emergencia, se deben tomar las debidas precauciones que permitan no solo un mejor flujo de las operaciones sino también una rápida evacuación por parte del personal que en él se desempeña. Para cumplir con este propósito, las áreas de trabajo y operaciones deben diseñarse de tal forma que permitan procesos continuos con el menor grado de interferencia posible.

Como medida de seguridad importante, cada área del laboratorio debe contar con al menos dos vías de salida para el personal. Las salidas de emergencia deben estar debidamente señalizadas y ser construidas en materiales que permitan su visualización aún en ausencia de luz.

Todo laboratorio debe contar con kits de primeros auxilios y extintores de incendios. Para cada equipo se debe colocar en forma escrita, y claramente visible, el protocolo de manejo, disponer de canecas de deposición de residuos en sitios estratégicos, almacenar los vidrios rotos y materiales cortantes en recipientes separados y debidamente rotulados, y realizar mantenimientos preventivos periódicos a los equipos.

En horas no laborales, se deben mantener apagadas las luces y equipos que no se encuentren en uso, y es preciso para el buen funcionamiento del laboratorio, restringir la entrada y circulación de personas ajenas a las actividades del mismo.

2.3 Equipos, utensilios y reactivos básicos necesarios

Equipos:

- Autoclave
- Horno microondas
- Estufa de secado
- Medidor de pH
- Plato giratorio
- Cámaras de flujo laminar
- Micropipetas
- Balanzas
- Termómetro
- Destilador o filtro de agua
- Microscopio
- Agitador orbital
- Medidor de humedad relativa
- Aire acondicionado

Reactivos:

- Sales minerales
- Reguladores de crecimiento
- Ácidos
- Bases
- Agentes gelatinizantes
- Vitaminas
- Azúcares
- Reguladores osmóticos
- Antibióticos
- Hormonas

Utensilios:

- Cristalería
- Pinzas quirúrgicas
- Espátulas
- Guantes
- Barras magnéticas
- Soportes
- Marcadores
- Bisturís
- Cuchillos
- Tabla de cortar
- Tijeras

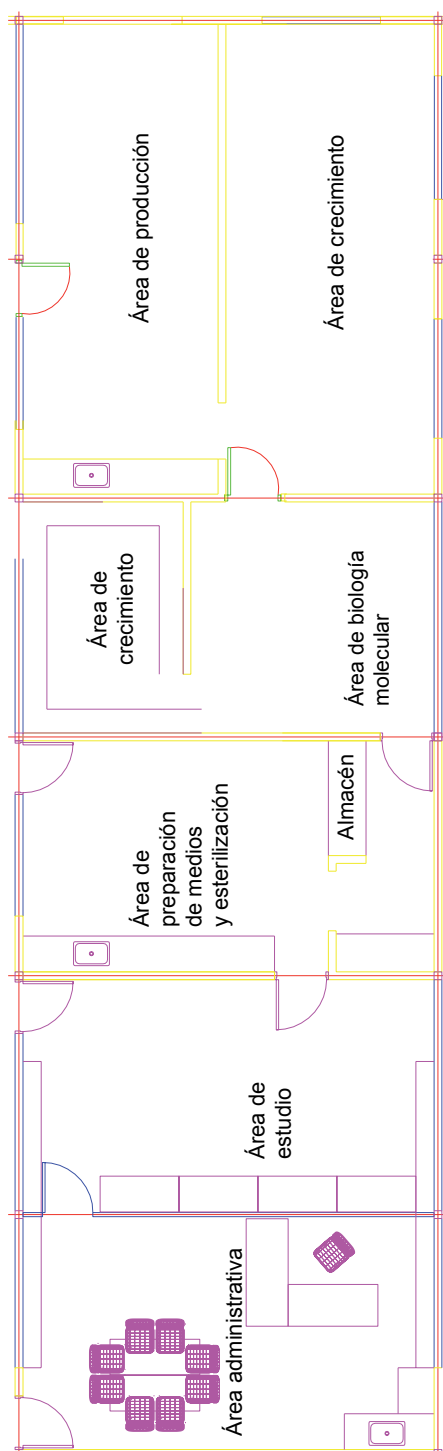


Figura 3. Plano del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Córdoba.

3. TÉCNICA ESTERIL EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

La asepsia es una condición necesaria para el éxito del establecimiento y desarrollo de los cultivos vegetales en condiciones in vitro.

Las condiciones del ambiente en el que se encuentran los cultivos, como son los altos niveles de humedad relativa dentro del recipiente, fácil disponibilidad de nutrientes en el medio, ausencia de agentes antagónicos y falta de aireación, favorecen el crecimiento rápido de cualquier inóculo microbiano; por esta razón, la presencia de una mínima cantidad de agentes contaminantes puede terminar causando la pérdida parcial o total del tejido vegetal cultivado.

Aunque las contaminaciones por microbios pueden aparecer en cualquier fase del proceso de cultivo de tejidos, estas son mas frecuentemente causadas por fallas en la manipulación durante el proceso de establecimiento de los explantes en el medio. Una contaminación en condiciones in vitro puede resultar en una colonización rápida que sea evidente en pocos días después de establecido el cultivo o puede tener una manifestación lenta que puede detectarse en varios días e incluso meses después del establecimiento del explante.

3.1 Tipos de contaminantes en el cultivo in vitro

Las plantas en su condición de crecimiento natural tienen asociadas una fauna y flora microbiana con la cual interactúan sin verse afectado su desarrollo; por el contrario, algunos microbios, dentro de los que se encuentran ciertas bacterias, actúan como agentes endofíticos benéficos asociados al sistema vascular de la planta. Sin embargo, en condiciones de cultivo in vitro, estos microbios se convierten en contaminantes o agentes facilitadores de contaminación para los explantes.

Dentro de los organismos contaminantes más comúnmente asociados con los cultivos in vitro se encuentran las bacterias, los hongos, los virus, rickettsias y fitoplasmas y algunos artrópodos (Cassels, 1991).

Bacterias

Son los más comunes entre los microbios contaminantes de tejidos vegetales en condiciones in vitro. Algunos de los géneros de bacterias vitropatógenas con mayor incidencia son *Acinbacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Xantomona* (Agris, 2005).

Los síntomas más comunes de la contaminación bacterial en los tejidos vegetales son la muerte completa del explante, crecimiento desuniforme, necrosis localizadas, bajas tasas de multiplicación en brotes axilares y baja capacidad de enraizamiento. Generalmente, la contaminación con bacterias puede identificarse por la presencia de manchas de aspecto acuoso y coloración variada en el tejido vegetal, turbidez en medios líquidos y por la presencia de colonias que crecen en forma circular sobre medios semisólidos.

Hongos

Los hongos son microorganismos que generalmente actúan como contaminantes externos de los explantes, aunque algunos se encuentran asociados con el sistema vascular.

Los géneros más comunes de hongos que actúan como contaminantes de cultivos in vitro son *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Saccharomyces*, este último conocido como levaduras. Sus contaminaciones se caracterizan por el crecimiento micelial que rápidamente cubre el explante resultando en la muerte rápida de los tejidos, aunque la presencia de levaduras puede confundirse con contaminaciones de tipo bacterial (Carlile et al., 2001) (Figura 3).

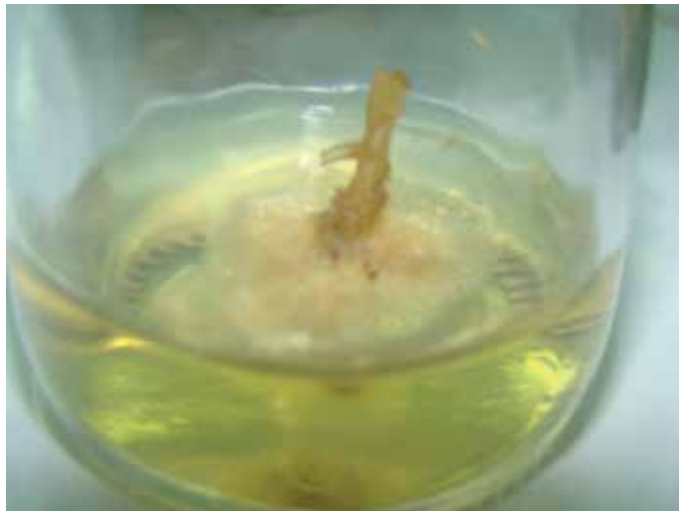


Figura 4. Crecimiento micelial de hongos en cultivo de tejidos.

Rickettsias y fitoplasmas

Las rickettsias y los fitoplasmas son tipos particulares de bacterias que pueden causar enfermedades en organismos vegetales. Las rickettsias se caracterizan por ser inmóviles, mientras que los fitoplasmas carecen de pared celular. Ambos pueden actuar como patógenos externos o sistémicos, y son generalmente inoculados en la planta por insectos vectores (Agrios, 2005).

Los síntomas de contaminación por rickettsias y fitoplasmas en tejidos vegetales in vitro son amarillamiento de las hojas, reducción del tamaño de los órganos y flacidez de los tejidos.

Virus y viroides

Los virus son nucleoproteínas fitopatógenas, mientras que los viroides son pequeñas cadenas de ARN sin proteínas asociadas que pueden causar enfermedades en las plantas. Ambos se desplazan dentro de las plantas a través de los conductos vasculares y necesitan de una célula hospedera para llevar a cabo sus funciones básicas (Suárez y Jaraba, 2004).

Las contaminaciones ocasionadas por estos microorganismos no son eliminadas con la desinfestación superficial de los explantes, y los síntomas más comunes de estas son hojas amarillentas, presencia de mosaicos en la lámina foliar, crecimiento lento y baja capacidad de enraizamiento.

Artrópodos

Varios artrópodos, como los ácaros y trips, e insectos, como las hormigas, pueden llegar a convertirse en problemas para el mantenimiento de las condiciones de asepsia en los cultivos de tejidos in vitro (Matthews, 1981).

Los ácaros son transportados por el viento y fácilmente introducidos en el laboratorio a través de los sistemas de aire acondicionado, mientras que la presencia de comida y desechos orgánicos en el laboratorio favorece la presencia de hormigas. Tanto los ácaros como las hormigas actúan como transportadores de esporas de hongos hacia el interior de los cultivos in vitro.

3.2 Fuentes de contaminación

Las fuentes de contaminación son aquellas que sirven como vehículo para que los agentes contaminantes lleguen al cultivo in vitro, siendo las más frecuentes el material vegetal, el aire y el operario.

Material vegetal

Muchos microbios e insectos se encuentran en la superficie de las plantas sin afectar su crecimiento y desarrollo, e incluso en algunos

casos favoreciendo el desempeño vegetal. Sin embargo, una vez en contacto con las condiciones in vitro se convierten en vitropatógenos.

La mayoría de los microorganismos se localizan en pequeñas cavidades de la corteza de los tallos y órganos donde se hace más difícil la penetración de las soluciones desinfectantes y consecuentemente su eliminación. Adicionalmente, algunas plantas tienen microbios asociados a su sistema vascular, que hacen aún más complicado el proceso de desinfestación.

Aire

El aire en condiciones normales mantiene suspendidas partículas de polvo, esporas de hongos, bacterias, ácaros y otros agentes que son contaminantes potenciales. Esto significa que para evitar la presencia de estos factores al interior de los cultivos, es necesario contar con un mecanismo que proporcione una buena calidad del aire para disminuir los riesgos por contaminación.

Trabajador u operario

Al igual que las superficies vegetales, la piel humana tiene una flora asociada que interactúa con las células de la epidermis y que pueden llegar a contaminar los cultivos in vitro. Adicionalmente, el proceso de renovación de la piel hace que del cuerpo humano se desprendan células muertas que pueden llevar consigo agentes externos, los cuales al entrar en contacto con el cultivo in vitro desarrollan contaminaciones.

La indebida realización de las manipulaciones es una segunda forma mediante la cual el operario puede actuar como una fuente de contaminación. Dentro de las fallas más comunes se encuentran la utilización de utensilios contaminados, vociferación durante la realización de subcultivos, indebida colocación de herramientas y tejidos dentro del área de trabajo, calentamiento insuficiente de las pinzas y bisturíes para el manejo de las muestras y el subcultivo de tejidos contaminados.

3.3 Técnica estéril

La técnica estéril consiste en la aplicación de una serie de medidas que buscan reducir la presencia de todos los factores capaces de causar contaminaciones en los cultivos en condiciones in vitro (Kyte y Klein, 2003).

Cada fuente de contaminación tiene un componente de la técnica estéril que se aplica de forma específica para evitar su posible incidencia en el proceso. La aplicación general de la técnica estéril involucra el uso de agentes químicos, procedimientos de manejo y calibración de equipos utilizados en el cultivo de tejidos vegetales.

Desinfestación superficial

Este componente de la técnica estéril está específicamente dirigido a eliminar la incidencia de agentes contaminantes presentes en la superficie de los tejidos o explantes.

La disminución de contaminantes externos se inicia previo a el aislamiento de los explantes, mediante tratamientos que se aplican a la planta madre. Este manejo constituye el estado 0 dentro del proceso de micropropagación y está conformado por estrategias como el mantenimiento de las plantas madres en locales cerrados, aplicación de controles fitosanitarios periódicos, uso de antibióticos y cosecha de explantes preferiblemente en época seca.

Inicialmente, los propágulos seleccionados deben ser enjuagados con abundante agua para remover las partículas de polvo y otros elementos antes de proceder a desinfectarlos superficialmente. La solución desinfectante se prepara con productos químicos de baja toxicidad para la planta, pero efectivos en la eliminación de microbios. Los desinfectantes más ampliamente utilizados son los iones de hipoclorito de sodio o hipoclorito de calcio, y el etanol. Los primeros deben su acción desinfectante (sobre todo bactericida) a su capacidad oxidante por el contenido de cloruro presente en sus moléculas.

El hipoclorito de sodio tiene una presentación líquida y es sensible a la luz, se utiliza en concentraciones que van desde 0.5 a 5% (vol:vol) con tiempos de exposición comprendidos entre 5 y 30 minutos dependiendo del tejido a desinfectar; mientras que, el hipoclorito de calcio es un polvo mojabable que una vez disuelto en agua debe ser filtrado y usado inmediatamente. Este se utiliza en concentraciones entre 9 a 10% con tiempos de exposición 5 a 30 minutos; sin embargo, su menor eficiencia y manejo más complicado hacen que sea menos utilizado que el hipoclorito de sodio (Avila, 2004).

El etanol es el más usado entre los alcoholes, aunque su uso individual como desinfectante no proporciona los mejores resultados. La inmersión rápida de los explantes en etanol, previo a la desinfección superficial, ayuda a remover resinas, tricomas y cutícula, contribuyendo a mejorar los efectos de la solución desinfectante a base de los iones de hipoclorito. Los alcoholes son también de gran utilidad para limpiar las superficies de trabajo y herramientas ayudando con esto a disminuir la presencia de microbios y posibles contaminantes (Singha et al., 1987).

Indexación

La indexación consiste en realizar pruebas a las plantas madres con el fin de diagnosticar la presencia o ausencia de contaminantes sistémicos asociados con sus tejidos, permitiendo con esto reducir las probabilidades de introducir material vegetal infectado en los cultivos in vitro (Klopmeier, 1996).

La indexación puede aplicarse por diferentes métodos que van a depender del tipo de planta y del microorganismo que se desea detectar. Una de las formas más efectivas consiste en tomar porciones de órganos de la planta a indexar y establecerlos en medios de cultivo cuya formulación es específica para favorecer el crecimiento de determinados microbios. Los resultados de esta prueba generalmente son rápidos y fácilmente detectables para el caso de infecciones con hongos y bacterias (Oglevee-O'Donovan, 1993).

El uso de plantas indicadoras es un método utilizado para diagnosticar la presencia de algunas enfermedades de origen viral o viroidal. Esta consiste en injertar porciones de la planta a indexar en el tallo de una planta sensible sintomáticamente a la infección. Cuando la planta indicadora muestra los síntomas típicos de la infección, el resultado es concluyente; sin embargo, la ausencia de síntomas no es definitivo para descartar la contaminación debido a que existe la posibilidad que se trate de una infección asintomática (Schnell et al., 2001).

El uso de microscopios electrónicos de alta resolución han sido igualmente utilizados en la detección de partículas virales; sin embargo, esta prueba es eficaz cuando la infección está presente en niveles relativamente altos, mientras que la observación de virus en bajas concentraciones y viroides es prácticamente imposible.

Un tercer método utilizado en la detección de agentes virales en plantas es a través del método serológico de la técnica de ELISA, la cual permite detectar la presencia de una determinada infección viral con base en la presencia de anticuerpos desarrollados específicamente para asociarse a la proteína de la cubierta del virus (Gugerli, 1992). A pesar de su lentitud, y requerir de un gran número de manipulaciones, ELISA ha sido de gran utilidad en el diagnóstico de ciertos virus vegetales; sin embargo, su aplicación es ineficaz en la detección de viroides, ya que estos no tienen cubiertas proteicas ni tampoco sintetizan proteínas (Suárez et al., 2004).

Los métodos de indexación más efectivos para el diagnóstico de enfermedades en plantas son los que se basan en técnicas moleculares para detección de ácidos nucleicos. Estos involucran la extracción y análisis de ADN o ARN de patógenos específicos que se encuentren asociados los tejidos vegetales.

Las técnicas moleculares de indexación más utilizadas son PCR (Polymerase Chain Reaction) y RT-PCR (Transcripción Reversa de PCR), las cuales, debido a su alta sensibilidad para detectar incluso infecciones leves y facilidad de automatización, constituyen los

métodos más rápidos y de mayor eficacia para la identificación de contaminantes presentes en plantas (Suárez et al., 2005).

Cultivo de meristemos

Aunque la eliminación de contaminantes sistémicos presentes en tejidos vegetales es prácticamente imposible mediante la aplicación de técnicas convencionales de desinfestación, existen algunas estrategias que permiten en algunos casos obtener explantes libres de contaminantes a partir de plantas infectadas, o en su defecto evitar que un agente contaminante presente en un explante se salga de control y cause la muerte del explante.

Los virus y viroides se desplazan dentro de la planta preferencialmente a través de los haces vasculares, lo que posibilitaría la obtención de material libre de contaminación en zonas con ausencia de estos conductos. Con base en esta premisa, el aislamiento y cultivo de porciones de las capas más externas de los meristemos apicales ha sido una estrategia de gran utilidad para obtener y multiplicar material sano a partir de plantas contaminadas con agentes infecciosos sistémicos (Klopmeyer, 1996).

La asociación de tratamientos térmicos con el aislamiento y cultivo de zonas meristemáticas (Termoterapia), ha permitido en algunos casos incrementar la efectividad en la eliminación de contaminantes sistémicos; sin embargo, a pesar de los éxitos demostrados en muchas plantas, el cultivo de zonas meristemáticas y la termoterapia no son igualmente efectivos para toda clase de virus o viroides, al igual que varían en efectividad de acuerdo con el tipo de planta (Horst y Klopmeyer, 1993; Grondeau y Samson, 1994).

El uso de antibióticos constituye otra estrategia para disminuir la incidencia de agentes contaminantes sistémicos en tejidos vegetales. Estos son productos tóxicos sintetizados, naturalmente por microorganismos o artificialmente en el laboratorio, que causan retardo o eliminación del crecimiento de otros agentes bióticos.

Dentro de los antibióticos más comúnmente utilizados para contrarrestar la presencia de bacterias se encuentran los bactericidas, como penicilina y rifampicina, los cuales causan la muerte de bacterias, y los bacteristáticos, como el cloramfenicol y la tetraciclina, que no causan la muerte de las bacterias pero detienen su crecimiento permitiendo que el explante continúe su desarrollo.

Los antibióticos dirigidos contra los hongos se denominan fungicidas, y dentro de éstos están los protectantes como Maneb y Mancozed, que actúan de forma externa, y los sistémicos como propiconazol y benomil.

Ambiente estéril

La disminución del número de agentes contaminantes presentes en el área de trabajo se garantiza con el uso de cámaras de flujo laminar.

La cámara de flujo laminar es un equipo dotado con una turbina que toma aire del exterior, lo impulsa a través de un filtro de alta eficiencia, para posteriormente expulsarlo hacia el interior de la cámara, donde el operario lleva a cabo las manipulaciones. El filtro, a través del cual circula el aire, retiene partículas que normalmente se encuentran en suspensión, y que se convierten en contaminantes potenciales al entrar en contacto con los cultivos.

Algunas cámaras de flujo laminar se encuentran equipadas con lámparas de luz ultravioleta que, al ser encendidas por un tiempo determinado, eliminan todos los microorganismos que se encuentran en la superficie de las mismas.

Buenas prácticas de laboratorio

El uso inadecuado de herramientas y materiales, así como la falta de claridad en los protocolos de manejo son, después del material vegetal, las causas más frecuentes de la contaminación de los cultivos in vitro.

Para evitar la entrada de agentes contaminantes al interior de la zona de trabajo, los recipientes, medios de cultivo, herramientas, papeles, y demás materiales que se usen al interior de la cámara de flujo laminar, deben haber sido esterilizados y asperjados con etanol al 70% antes de colocarlos en el interior de la cámara.

Los operarios deben implementar medidas rutinarias de prevención de las contaminaciones como lavarse las manos antes de iniciar un procedimiento, vestir batas limpias, en lo posible evitar levantarse de la cámara antes de terminar el trabajo iniciado, no hablar dentro de la cámara y no sacar las herramientas, tejidos o medios descubiertos fuera de área de la cámara.

Es preciso, durante el desarrollo de los trabajos, evitar colocar las herramientas directamente sobre la superficie de la cámara, y cualquier tejido que entre en contacto con esta superficie debe ser descartado inmediatamente.

Para la limpieza de los recipientes y herramientas utilizados, y una vez han sido esterilizados en el autoclave, el procedimiento estándar consiste en desechar el medio de cultivo y el material vegetal, lavar profusamente con detergente o jabón bactericida, enjuagar dos veces con agua potable y una tercera vez con agua destilada, permitir escurrir y secar al aire, y finalmente almacenar en un sitio cerrado. Para reducir las posibilidades de proliferación de microorganismos, se recomienda esterilizar por separado recipientes y utensilios que hayan sido utilizados en cultivos donde se sospeche hay presencia de microbios sistémicos.

4. MEDIOS DE CULTIVO

El medio de cultivo es un elemento de la técnica de cultivo in vitro que funciona a la vez como sustrato y fuente energética para el desarrollo de los tejidos.

Los medios de cultivo son una combinación de diferentes componentes, los cuales varían proporcionalmente de acuerdo con las características del tejido a desarrollar (callo, porciones de hoja, células, porciones de tallo, etc.) y el proceso morfogénico que se desea seguir (cultivo de meristemos, organogénesis, embriogénesis somática, etc.) (Gamborg y Shyluk, 1981).

A pesar de que a nivel macro, las necesidades nutricionales de las plantas han sido extensamente estudiadas, permitiendo conocer que tipo de compuesto es utilizado en la mayoría de cada uno de los órganos de una planta completa, es poco lo que se conoce acerca de los requerimientos nutricionales de órganos o tejidos aislados y cual es su metabolismo una vez separados de la planta madre.

Hasta la presente se ha asumido que las necesidades nutricionales de los tejidos son comparables a los de la planta completa, por lo que el medio de cultivo debe contener todas las sustancias requeridas por una planta intacta, variando las proporciones de los componentes con el tipo de explante y la vía morfogénica que se desea seguir para el desarrollo de los tejidos (Murashige y Skoog, 1962; Gamborg et al., 1976).

4.1 Componentes de un medio

Los componentes de un medio de cultivo generalmente están constituidos por agua, minerales, compuestos orgánicos y materiales de soporte.

Agua

El agua constituye más del 95% de cualquier medio de cultivo y es el solvente de todos los solutos que componen en el medio.

Teniendo en cuenta que el agua potable corriente contiene elementos varios como disueltos orgánicos e inorgánicos, partículas sólidas de diversa naturaleza y microorganismos que pueden afectar la calidad del medio, es necesario aplicar mecanismos que permitan alcanzar un alto grado de pureza del agua corriente antes de ser utilizada para las preparaciones de medios; entre estos mecanismos se encuentran la destilación, la desionización y la osmosis reversa.

Destilación: Es el mas común y utilizado de los métodos de purificación de agua; se requiere de un equipo relativamente económico (destilador) y fácil de manejar. Algunas de las limitantes de este proceso son la reducida eficiencia bajo condiciones normales (solo el 5% del agua utilizada en el proceso es usada), no es una operación inmediata puesto que el agua debe ser destilada y almacenada para su uso posterior, y el constante mantenimiento que requiere el equipo.

Desionización: Consiste en la remoción o captura de contaminantes presentes en el agua con base en su carga eléctrica. El proceso funciona forzando el paso del agua a través de unas columnas que contienen resinas con diminutas esferas plásticas cargadas con iones de hidrógeno (H^+) e hidróxido (OH^-), los cuales son intercambiados por contaminantes catiónicos o aniónicos presentes en el agua.

A diferencia de la destilación, la desionización es un proceso continuo, es decir, no es necesario almacenar agua ya que puede

usarse de forma inmediata en la medida que se demanda. Aunque el intercambio iónico garantiza que la mayoría de los contaminantes iónicos sean removidos, este método no remueve contaminantes orgánicos, y debido al constante paso y presencia de agua en las resinas, es posible que se presente crecimiento de bacterias que se convierten en contaminantes.

Osmosis reversa: Este sistema consiste en utilizar presión para hacer pasar el agua a través de membranas semipermeables que permiten la retención de partículas y contaminantes.

En algunos casos la ósmosis reversa se combina con la desionización, y además se agrega al sistema un paso del agua a través de un filtro de carbón que permite la captura de los contaminantes orgánicos y algunas sales (cloro) que escapan a la retención por parte de las resinas iónicas. Este sistema combinado remueve un 100% de sólidos en suspensión, 99.5% de bacterias y virus y mas de 90% de contaminantes orgánicos e inorgánicos.

Minerales

Los compuestos minerales presentes en el medio de cultivo constituyen todos aquellos elementos inorgánicos que son importantes para el desarrollo de la planta (macroelementos y microelementos). A continuación se enuncian los elementos utilizados en los medios de cultivo y la forma en que estos son utilizados:

Nitrógeno (N): Es un componente de los ácidos nucleicos y aminoácidos y es un regulador del pH en el medio. Su deficiencia produce cultivos cloróticos y de tamaño reducido; se suministra al medio en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-).

Fósforo (P): Es abundante en zonas meristemáticas y es componente de las moléculas de ADN y ATP. Los tejidos deficientes en fósforo tienen tamaño reducido y coloración rojiza. Este elemento se adiciona al medio en forma de fosfato de potasio (KH_2PO_4) o fosfato de sodio (NaH_2PO_4).

Potasio (K): Promueve el crecimiento del tejido meristemático, actúa como osmoregulador y regula el pH. Se agrega al medio de cultivo en forma de fosfato de potasio (KH_2PO_4) o cloruro de potasio (KCl).

Magnesio (Mg): Es un componente de la molécula de clorofila y actúa como activador enzimático; su deficiencia se observa en la clorosis de hojas maduras. Se agrega al medio en forma de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Azufre (S): Es componente de algunas proteínas y enzimas; su deficiencia se observa en forma de hojas cloróticas. El azufre es suministrado al medio en forma de compuestos a base de sulfatos (SO_4).

Calcio (Ca): Es un componente de la pared celular y promotor de la formación de raíces; en cultivo de tejidos su deficiencia puede causar muerte de meristemas. El Ca se agrega al medio de cultivo en forma de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o como nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$).

Cloro (Cl): Este elemento actúa como un osmoregulador y componente del fotosistema II del proceso de la fotosíntesis. Es adicionado al medio en forma de compuestos a base de cloruros (Cl_2^-).

Sodio (Na): Es un elemento que actúa como osmoregulador y confiere tolerancia a la salinidad en algunos tipos de plantas; se adiciona al medio de cultivo en forma de compuestos a base de sodio (Na^+).

Manganeso (Mn): Este elemento es un componente de la membrana de los cloroplastos y su deficiencia se observa en plantas adultas en forma de moteados foliares. Es suministrado al medio en forma de sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Zinc (Zn): Tiene diversas funciones, entre ellas la de actuar como activador enzimático de la clorofila. Se suministra al medio en forma de sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Boro (B): Es un elemento que al parecer funciona en el transporte de azúcares, en la estructura de la membrana celular y en el metabolismo del ácido fenólico. Es suministrado al medio en forma de ácido bórico (H_3BO_3).

Cobre (Cu): Este microelemento interviene en la síntesis de clorofila y en la transferencia electrónica. Se adiciona al medio en forma de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Molibdeno (Mo): Se cree que interviene en la conversión del N en amonio y en la fijación del mismo. Es agregado al medio como molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Cobalto (Co): Es un elemento componente de la Vitamina B12 y de la síntesis de ácidos nucleicos. Es agregado al medio de cultivo en forma de cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Hierro (Fe): Está involucrado entre otros procesos en la síntesis de clorofila y en las reacciones de óxido/reducción que se suceden en los cloroplastos y mitocondrias. Su deficiencia se expresa en hojas con apariencia clorótica. El hierro es adicionado al medio mezclando sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) con la sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) formando el quelato de hierro.

Compuestos orgánicos

Son aquellos compuestos que están conformados por moléculas con átomos de carbono enlazados covalentemente con otro átomo de carbono o hidrógeno. Dentro de los compuestos orgánicos que se utilizan en el medio de cultivo están los carbohidratos o fuentes energéticas, las vitaminas, los reguladores de crecimiento y algunos suplementos.

Carbohidratos o fuentes energéticas: Las plantas en su estado natural producen sus propias fuentes de energía (autótrofos); sin embargo, en condiciones in vitro, por la ausencia de fotosíntesis los organismos vegetales necesitan de una fuente externa de carbohidratos para

poder crecer y desarrollarse (heterótrofos), por lo que la mayoría de los medios deben ser suplementados con compuestos que actúen como fuentes de energía. Dentro de las fuentes mas comunes de carbohidratos usadas en cultivos in vitro están:

- **Sacarosa:** Es un disacarido compuesto por fructosa y glucosa ($C_{12}H_{22}O_{12}$) usado comunmente en las preparaciones de medios de cultivo. Normalmente, se adiciona al medio en forma de azúcar común y casi siempre en una concentración del 2 al 4%.
- **D-Manitol:** Es un azúcar que se utiliza para regular el potencial osmótico del medio. Se utiliza frecuentemente cuando se aislan y cultivan protoplastos.
- **D-Sorbitol:** No es usada frecuentemente como fuente energética; sin embargo tiene la particularidad de ser transportada a través del floema.

Vitaminas: Las plantas en su estado natural suplen sus propias necesidades vitamínicas; sin embargo, los tejidos y células vegetales cultivados in vitro requieren de suplementos externos de estos compuestos para llevar a cabo sus procesos de crecimiento y desarrollo.

En las etapas iniciales del desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos in vitro, las vitaminas eran adicionadas en conjunto con otros nutrientes a partir de suplementos indefinidos tales como jugos de frutas o ciertos extractos (Caplin y Steward, 1948). En la actualidad, estos compuestos son adicionados en forma individual, siendo las más comunes las siguientes:

- **Tiamina (Vitamina B₁):** Es un cofactor que actua en el ciclo de los ácidos orgánicos de la respiración (Ciclo de Krebs) y es un componente regular de la mayoría de los medios de cultivo.

- **Acido nicotínico (Niacina o Vitamina B₃):** Es un componente de las enzimas que actúan en las reacciones activadas por la luz. Su uso es menos común que la tiamina.
- **Mio-inositol:** Es un constituyente del complejo B de vitaminas y componente regular de todos los medios de cultivo. Aunque no es estrictamente necesario para los procesos de crecimiento y desarrollo, los cultivos tienen un mejor comportamiento en presencia de éste.
- **Acido ascórbico (Vitamina C):** Es usado más frecuentemente como un antioxidante en cultivos de tejidos de especies que producen grandes cantidades de fenoles in vitro.

Reguladores de crecimiento: Son compuestos, algunos naturales (hormonas) otros sintéticos, que, a muy bajas concentraciones, afectan los procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas (Davies, 2004).

Los tejidos in vitro generalmente no producen las cantidades necesarias de reguladores para suplir las necesidades de sus procesos, por lo que se hace necesario suplementar con fuentes exógenas. Las hormonas o reguladores de crecimiento clásicos son las auxinas, citocininas, giberelinas, el ácido abscísico y el etileno (Suárez, 2011).

- **Auxinas:** Son reguladores de crecimiento que estimulan la dominancia apical, el crecimiento y la división celular, el desarrollo meristemático, la inducción de raíces adventicias y la formación de embriones somáticos.

En su estado natural la planta produce el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB), los cuales son sintetizados en los ápices foliares desde donde se desplazan en forma basipétala a la parte radical.

Entre los compuestos análogos a las auxinas, sintetizados en el laboratorio, están el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y el picloram. En el cultivo de tejidos in vitro, los mas usados son el IBA y el ANA en la micropropagación de meristemos y organogénesis. El 2,4-D y el picloram tienen efectos más fuertes, por lo que son utilizados en la inducción de tejidos embriogénicos. El AIA por su facilidad para ser degradado enzimáticamente es menos utilizado.

- **Citocininas:** Estos reguladores de crecimiento actúan en la interrupción de la dominancia apical, división celular, desarrollo de yemas axilares y retardo de la senescencia de hojas. Son sintetizadas en los ápices radicales desde donde son transportadas a las yemas apicales y axilares.

Naturalmente, la zeatina y el 2-isopentenil adenina (2iP) son sintetizadas por la planta, pero en el comercio se pueden encontrar sustitutos como la benzilaminopurina (BAP o BA), la kinetina y el tidiazuron (TDZ). De todos estos compuestos, BA es la más utilizada en cultivo in vitro, especialmente en la multiplicación de meristemos pre-existentes y organogénesis (Acosta et al., 2013; Torres et al., 2013; Polo et al., 2013; López, 2017).

- **Giberelinas:** Son compuestos que promueven el alargamiento de los entrenudos de la planta mediante la inducción de la división y elongación celular. La síntesis en plantas completas ocurre principalmente en las hojas jóvenes.

Aunque existen más de 90 compuestos similares, la giberelina más comúnmente utilizada en cultivo in vitro es el ácido giberélico (GA_3), el cual es adicionado al medio de cultivo para promover la elongación de tallos micropropagados y conversión de embriones somáticos en plantas. Se ha observado cierto efecto inhibitorio en formación de nuevos tallos y raíces y la inducción de tejidos embriogénicos, por lo que es inconveniente su uso en los eventos de multiplicación de brotes y emisión de raíces.

GA₃ es alterado en su estructura por el calor, por lo que es mejor esterilizar a través de filtración.

- **Acido abscísico:** Este regulador de crecimiento es el encargado de controlar la apertura y cierre de estomas, inhibir la elongación y división celular, promover cierto grado de abscisión foliar e inducir la dormancia de las semillas. Su sitio de origen son las raíces y las hojas adultas desde donde se desplaza a sus sitios de acción.

En condiciones in vitro inhibe la formación de callo y es utilizado para inducir la maduración de embriones somáticos y la formación de órganos de almacenamiento y dormancia como cormos y microtubérculos. No es soluble en agua por lo que debe ser diluido en etanol (Suárez y Otero, 2016; Suárez et al., 2017; Carmona, 2017).

- **Etileno:** Es un gas que es sintetizado a partir del aminoácido metionina y se produce en la mayoría de los tejidos vegetales. En plantas induce la senescencia y abscisión de hojas y flores, la formación de raíces adventicias y elimina la dormancia de semillas y yemas. Su presencia se torna inconveniente en condiciones in vitro, por lo que algunas veces la ventilación de los tejidos es necesario para evitar su acumulación.

Mecanismo de soporte

Existen dos estados para la consistencia del medio de cultivo, y éstos dependen de la presencia o ausencia de un medio de soporte. Los medios líquidos generalmente están conformados unicamente por la formulación del medio disuelta en agua sin ningún tipo de medio de soporte; de forma inversa, los medios en estado semi sólido adquieren cierta dureza proporcionada por agentes gelatinizantes.

Agar: Es el agente gelatinizante mas usado debido a su grado de dureza que permite sostener los cultivos en su sitio y su inactividad iónica que permite el flujo de nutrientes del medio hacia los tejidos.

Estructuralmente, el agar es una mezcla compleja de polisacáridos extraídos de algas rojas que se disuelven a 100 °C y solidifican a 45 °C, no es digerido por las enzimas vegetales y no reacciona con los componentes del medio.

En el comercio existen diferentes tipos de agar, por lo que es conveniente usar uno con alto grado de pureza y que esté manufacturado para cultivo de tejidos (TC-Agar); igualmente, se debe tener en cuenta que los pH bajos (<4.0) afectan la dureza del mismo. Generalmente una concentración de 0,6 a 0,8% (6 a 8 g L⁻¹) es suficiente para lograr una dureza adecuada del medio de cultivo (Singha, 1984).

Phytigel: Es un polímero derivado de la fermentación de la bacteria "*Pseudomonas elodea*". De forma natural contiene cantidades significativas de potasio, sodio, calcio y magnesio, aunque no perjudiciales y generalmente es mas puro que el agar. Se utilizan proporciones de 0.2% a 0.4% (2 a 4 g L⁻¹).

Una tercera alternativa a la formulación del medio de cultivo es el doble fase. En este medio, se coloca una fase sólida y sobre esta una fase líquida; la sólida brinda la estabilidad para mantener en su sitio a los explantes, y la líquida le permite renovar el suministro de nutrientes sin realizar subcultivos del material vegetal permitiendo el crecimiento de los tejidos en el mismo recipiente; adicionalmente, la adición de nutrientes disueltos en una fase líquida permite una asimilación más rápida de los nutrientes (López 2017; Díaz, 2017).

4.2 Formulación y preparación de medios de cultivo

La mayoría de las formulaciones de medios de cultivo que se conocen en la actualidad fueron desarrolladas en la década de los 60's y 70's del siglo XX, y difieren básicamente en la concentración de las sales que utilizan. La formulación del medio de Murashige y Skoog (1962) es la mas utilizada a nivel mundial en el cultivo de plantas o tejidos vegetales in vitro y se caracteriza por tener un contenido

alto de sales. Otras formulaciones ampliamente utilizadas son la B5 (Gamborg et al., 1968) utilizada preferiblemente en el cultivo de callo y células, Nitsch para el cultivo de anteras (Nitsch y Nitsch, 1969) y Woody Plant Medium (WPM) para plantas leñosas (Lloyd y McCown, 1980) (Tabla 1).

La selección de un determinado medio de cultivo es consecuencia de la experimentación de varios de éstos y los resultados que arrojen en términos de desarrollo de los explantes.

Tabla 1. Formulación de macro y micronutrientes de cuatro medios de cultivos.

Componente (mg L ⁻¹)	MS	White	B5	WPM
NH ₄ NO ₃	1650.000			400.000
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O		300.000		556.000
KNO ₃	1900.000	80.000	2500.000	
KCl		65.000		
(NH ₄) ₂ SO ₄			134.000	
K ₂ SO ₄				990.000
KH ₂ PO ₄				170.000
CaCl ₂ 2H ₂ O	333.000		150.000	96.000
MgSO ₄ 7H ₂ O	181.000	720.000	250.000	370.000
KH ₂ PO ₄	170.000			
FeNaEDTA	36.700			
H ₃ BO ₃	6.200	1.500	3.000	6.200
MnSO ₄ H ₂ O	16.900	7.000	10.000	22.300
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.600	3.000	2.000	8.600
KI	0.830	0.750	0.750	
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.250		0.250	0.250
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025		0.025	0.250
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025		0.025	
FeSO ₄ 7H ₂ O			27.800	27.800
Na ₂ EDTA			37.300	37.300
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O		200.000	150.000	
Fe ₂ (SO ₄) ₃		2.500		

Existen tres formas diferentes de realizar la preparación de los medios de cultivo: La primera es pesando todos los componentes de forma individual al momento de preparar la formulación; éste método es complicado sobre todo con relación a los componentes que se utilizan en pequeñas cantidades (microelementos), las cuales resultan de difícil manejo. Un segundo método consiste en la preparación de soluciones madres o stock, y el tercero es la dilución de formulaciones premezcladas comercialmente y que vienen en cantidades específicas para determinada cantidad de agua. Estas últimas son bastante convenientes por la facilidad de preparación pero por el alto costo no son utilizadas regularmente.

Preparación de soluciones madres o stock

Las soluciones madres consisten en medios de cultivos preparados a concentraciones muy altas, lo cual permite tomar una determinada cantidad de éstas y diluirlas en agua para completar el volumen total de medio a la concentración requerida.

Generalmente las soluciones stock se preparan a una concentración 10 a 100 veces (10x a 100X) mayor a la concentración final del medio, de tal forma que la dilución de 10 ml o 100 ml de ésta, respectivamente, en un litro de agua terminará en la concentración adecuada del medio.

La preparación de soluciones stock es relativamente fácil, disminuye costos, facilita el pesaje de componentes que se agregan en pequeñas cantidades y permite modificar las concentraciones de los ingredientes. Para mayor facilidad de manejo, normalmente las sales con los elementos que se agregan en cantidades milimolares (mM), tales como N, P, K, Na, S, Cl y Ca, se preparan en un stock separado a una concentración 10X; mientras que los elementos que se agregan en cantidades trazas o micromolares (μM), Mn, B, Cu, Mo, Co y Fe, se preparan a una concentración 100X.

Cálculo de cantidades

La mayoría de los medios de cultivo expresan las cantidades de sus componentes en unidades de masa. Esto en muchos casos no refleja la diferencia que puede existir entre compuestos análogos que difieren en sus estructuras moleculares. Puesto que el efecto de una sustancia es el resultado de la acción del número de moléculas presentes en el medio y no de su peso, las cantidades adicionadas se convierten en factores críticos, especialmente cuando se comparan los efectos de reguladores de crecimiento (Gamborg et al., 1976).

Las cantidades de los componentes del medio deben calcularse preferiblemente en unidades molares; por ejemplo, al agregar 1 mg L^{-1} de ANA (peso molecular = 186.2) y calcular en número de micromoles que se adiciona ($1000/186.2$) es de $5.37 \text{ } \mu\text{M}$. Si agregamos el mismo peso de AIB, otra auxina, (peso molecular = 203.2) tenemos que el número de micromoles que se adiciona ($1000/203.2$) es de $4.92 \text{ } \mu\text{M}$, es decir, se estaría agregando una mayor cantidad real de ANA que de AIB. Si esto no se tiene en cuenta, es posible que las evaluaciones de un experimento puedan conducir a expresar conclusiones erróneas.

Las fórmulas necesarias para realizar la conversión de unidades de masa a unidades molares y viceversa son:

Molar (M) = $\text{g L}^{-1} / \text{Peso Molecular}$

Minimolar (mM) = $\text{mg L}^{-1} / \text{Peso Molecular}$

Micromolar (μM) = $\mu\text{g L}^{-1} / \text{Peso Molecular}$

Preparación del medio de cultivo

El proceso de preparación de un medio de cultivo se efectúa en una serie de pasos, que deben terminar en la obtención de una formulación con los componentes en la proporción adecuada, el pH óptimo, la consistencia deseada, estéril y distribuido en las cantidades requeridas. Los pasos a seguir para la preparación de un litro de medio de cultivo son los siguientes:

- 1. Adición de los componentes:** Diluir en una cantidad de agua pura (500 ml para 1 L de medio) las soluciones stock, el azúcar, el mio-inositol, la tiamina y los reguladores de crecimiento de acuerdo con lo requerido; luego adicionar agua pura hasta completar 900 ml. Esto debe realizarse con la ayuda de una barra magnética en un plato giratorio, con el fin de lograr la completa dilución de todos los componentes.
- 2. Medición y ajuste de pH:** El pH del medio es determinante para la solubilidad de las sales, asimilación de los reguladores de crecimiento y la dureza del medio. La medición y ajuste de pH debe realizarse antes de la esterilización del medio, y se efectúa adicionando HCl o KOH para disminuir o aumentar su valor, respectivamente. Aunque el pH del medio puede tener un rango de 4,5 a 6,0, éste se ajusta a un valor de 5.7 con el fin de que al ser esterizado disminuya a su valor óptimo para la toma de nutrientes por los tejidos vegetales.
- 3. Adición de agar:** Al preparar medios de consistencia semi sólida, el agar debe ser agregado y mezclado después de la medición del pH, ya que su adición previa puede dañar el potenciómetro.
- 4. Esterilización:** Generalmente, el medio con todos sus componentes es esterilizado en un autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1,05 kg cm⁻², mientras que el tiempo de esterilización, depende de la cantidad de medio que se tenga en el recipiente (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempos de esterilización en autoclave de acuerdo con la cantidad de medio en el recipiente.

Volumen de medio (ml)	Tiempo mínimo de esterilización (min)
20-50	15
75	20
250-500	25
1000	30
1500	35
2000	40

Un método alternativo de esterilización de medios líquidos es por filtración, utilizando membranas con poros diminutos ($0.22\ \mu\text{m}$) que evitan el paso de bacterias, hongos y la mayoría de virus; sin embargo, debido a sus costos y funcionalidad, éste método se utiliza sólo para esterilizar aquellos compuestos que cambian su naturaleza con el calor (ácido ascórbico, ácido giberélico, etc.).

- 5. Distribución:** De acuerdo con las características de los recipientes o contenedores a utilizar, el medio es distribuido antes o después de la esterilización.

Generalmente cuando el medio es líquido y se utilizan erlenmeyers de vidrio, las cantidades de medio son distribuidas previo a la esterilización en cada uno de los recipientes; de forma inversa cuando el medio es semi sólido, la distribución puede hacerse antes de la esterilización cuando se utilizan recipientes de vidrio (tubos de ensayo y frascos), aunque en este caso el agar debe ser disuelto calentando el medio antes de la distribución.

Al utilizar recipientes plásticos (cajas de Petri desechables, etc.) que no resisten la temperatura de esterilización, la distribución de las cantidades del medio debe hacerse posterior a su esterilización.

5. MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS

La micropropagación de plantas es una técnica de propagación asexual que consiste en la producción de vegetales en condiciones ambientales controladas, completa asepsia y usando medios de cultivos artificiales como sustrato, contenidos en recipientes de plástico o vidrio (Kane, 1996).

La micropropagación ha sido una de las tecnologías que ha mostrado la mayor aplicación práctica y de apoyo para el avance investigativo dentro de la biotecnología vegetal, ofreciendo la posibilidad de recuperar plantas a partir de células individuales, comprender el efecto de reguladores de crecimiento en los procesos de crecimiento y desarrollo, permitir la obtención de plantas por métodos alternativos de embriogénesis y su posterior conversión en semillas sintéticas, y producir masivamente plantas para vivero a partir de meristemas cultivados en condiciones in vitro.

5.1 Generalidades de la micropropagación

La propagación convencional de plantas es una operación fundamental que busca perpetuar un genotipo vegetal y se caracteriza porque puede desarrollarse en condiciones ambientales poco controladas, sin requerimientos de equipos avanzados y personal técnico poco calificado.

La operación de propagación de plantas en condiciones in vitro tiene algunas particularidades que la hacen más compleja que la propagación convencional de plantas, e incluso difícil de ejecutar sin el cumplimiento estricto de algunas condiciones. Las principales características de la micropropagación de plantas son el estricto control de las condiciones ambientales, los propágulos utilizados son de tamaño reducido (explantes), las plantas crecen heterotróficamente y se requiere de una infraestructura compleja que implica costos iniciales altos y mano de obra altamente calificada.

Ventajas

La micropropagación, como una técnica de propagación de plantas, proporciona ciertas ventajas comparativas sobre las técnicas tradicionales de propagación a nivel macro, tales como mayores tasas de multiplicación en períodos de tiempo y espacios más eficientes, obtención de plantas con altos grados de uniformidad genética y fenotípica, regeneración de plantas completas a partir células, tejidos u órganos, rápido desarrollo y liberación de cultivares mejorados o genéticamente modificados, posibilidad de obtener plantas sanas a partir de material contaminado con patógenos de tipo sistémico, reducción de costos y riesgos de pérdidas en el almacenamiento de germoplasma, y adicionar un valor agregado a las plantas producidas.

Límites

Apesar de las grandes posibilidades que brinda, la micropropagación de plantas tiene ciertas limitantes que impiden su uso generalizado en todas las especies vegetales. Algunas de estas limitantes son

la deficiente disponibilidad, o ausencia total, de protocolos para ciertas especies, denominadas recalcitrantes por su dificultad de manejo en condiciones in vitro, la ocurrencia de altos niveles de variación somaclonal en ciertos tipos de plantas y los altos costos de producción que implica la producción in vitro.

5.2 Métodos de micropropagación de plantas

Existen tres métodos de micropropagación de plantas que son aplicables de acuerdo con la especie y los objetivos de la operación: la micropropagación a partir del cultivo de explantes con meristemos pre existentes, la organogénesis y la embriogénesis somática.

Micropropagación a partir de explantes con meristemos pre-existentes

La micropropagación a partir de meristemos pre-existentes consiste en la producción de nuevos tallos a partir de los meristemos terminales y axilares seguido por su enraizamiento individual.

Los meristemos son órganos diferenciados y determinados, formados por grupos de células capaces de llevar a cabo división celular y diferenciación en tejidos permanentes y especializados tales como ramas y raíces (Chawla, 2003).

A diferencia de los otros métodos de micropropagación, donde el inicio de vía morfogénica es de origen unicelular, la micropropagación a partir de explantes con meristemos pre-existentes favorece la perpetuación de quimeras periclinales, debido a su conformación por varias capas de células, las cuales son de gran valor estético en especies ornamentales (Marcotrigiano y Gouing, 1984).

La micropropagación a partir de meristemos pre-existentes, se desarrolla a partir de la inducción del crecimiento repetido de las yemas axilares presentes en el explante. El crecimiento repetido se debe a la eliminación de la dominancia apical del explante por la presencia de cantidades relativamente altas de citocininas en el medio de cultivo (Wickson y Thimann, 1958).

La producción de plantas mediante el cultivo de explantes con meristemos pre-existentes es el método de micropropagación más utilizado en la producción comercial de plantas in vitro, debido a la gran estabilidad genética y consistencia en la tasa de multiplicación en la mayoría de las especies vegetales.

Estados de la micropropagación a través del cultivo de explantes con meristemos preexistentes

Inicialmente solo tres estados o etapas fueron consideradas como esenciales para la producción y recuperación de plantas micropropagadas: el establecimiento in vitro de un cultivo estéril, la multiplicación del propágulo establecido, y el pretransplante, o enraizamiento, in vitro de los tallos multiplicados (Murashige, 1974). Consideraciones posteriores permitieron establecer que dos estados adicionales, tácitamente incluidos en el proceso inicialmente descrito, afectaban de manera significativa toda la operación convirtiéndola en un proceso de cinco estados (Figura 4).

El primero de esos estados o fases no se ubica exactamente dentro de los antes descritos, sino que consiste en un preacondicionamiento fisiológico y sanitario que se aplica a las plantas madres con el fin de obtener una mejor respuesta de los explantes una vez transferidos a condiciones in vitro; este se denominó estado 0, o de preacondicionamiento de plantas madres. El segundo estado, no considerado inicialmente, comprende la parte final del proceso, y consiste en propiciar una adaptación gradual de las plantas producidas in vitro a las condiciones ambientales normales; este se denominó estado IV, o de adaptación ex vitro (Debergh y Maene, 1981).

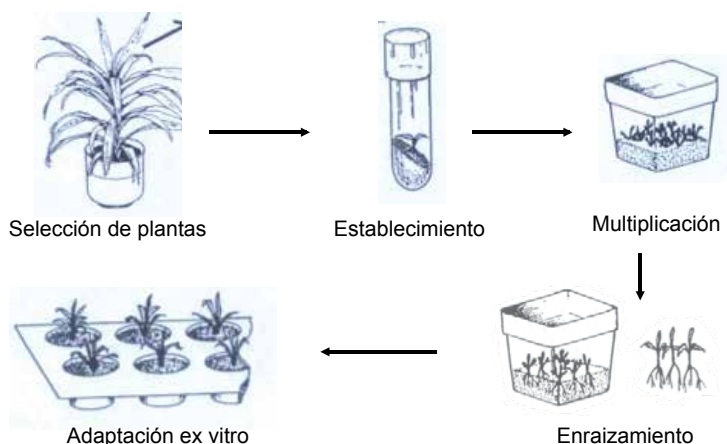


Figura 5. Esquema del proceso de micropropagación.

Estado 0 (Preacondicionamiento de plantas madres): Durante este estado se realiza la selección de las plantas donadoras de los explantes con base en las características agronómicas, que le confieren la virtud de ser propagada, y su acondicionamiento.

Las plantas seleccionadas deben ser aisladas en un local limpio, aireado y con excelente control de patógenos, con el fin de disminuir las fuentes y cantidades de inóculo existentes en condiciones normales. Para garantizar la sanidad de los individuos que proveen los explantes es conveniente realizar indexaciones periódicas que permitan monitorear la presencia de parásitos sistémicos, y aplicaciones de fungicidas.

Además de garantizar un estado fitosanitario óptimo, la modificación de las condiciones fisiológicas de la planta son indispensables para una mejor adaptación del explante una vez transferido a condiciones in vitro. Dentro de las prácticas utilizadas para favorecer el desempeño fisiológico del explante, se encuentran las podas para estimular el crecimiento de yemas axilares, las aspersiones foliares con citocininas para promover la ramificación lateral, la cobertura con elementos reductores de la intensidad lumínica natural y una buena desinfestación superficial.

El estado I (Establecimiento de un cultivo estéril): La colocación de un explante desinfectado en condiciones in vitro es el inicio de una serie de situaciones que van a determinar la supervivencia o muerte del explante (Suárez et al., 2006).

El concepto de establecimiento en condiciones in vitro, hace referencia a el grado de adaptación que permite a los cultivos sobrevivir y crecer de forma proporcional a las condiciones brindadas. Este consiste de un proceso gradual que involucra varias etapas que se suceden en períodos variables de tiempo dependiendo de la especie y la condición fisiológica de la planta madre.

La primera fase que experimenta un explante in vitro se denomina etapa de aislamiento, y se caracteriza por los altos niveles de estrés que sufre el explante ocasionado por las heridas sufridas al ser separado y la alteración de su sistema metabólico. Como una respuesta a estas condiciones, en ciertas especies los explantes pueden presentar una alta emisión de fenoles y un crecimiento rápido con órganos de gran tamaño que equivocadamente puede interpretarse como una respuesta favorable a las condiciones in vitro (Villalobos y Thorpe, 1993).

La segunda fase del establecimiento se conoce como etapa de estabilización, y se caracteriza por un crecimiento variable e impredecible de los nuevos brotes. Los órganos aunque disminuyen sus dimensiones, no tienen aun un tamaño proporcional con las condiciones espaciales en las cuales se encuentran confinados y puede persistir en menor grado la emisión de fenoles.

La tercera, y última, etapa del proceso de establecimiento se denomina etapa de producción, y corresponde a la respuesta fisiológicamente proporcionada de un cultivo adaptado al reducido espacio y a los suplementos del medio. El cultivo establecido se caracteriza por tener órganos pequeños, entrenudos cortos, poca o ninguna emisión de fenoles y un crecimiento que responde a los estímulos proporcionados.

Estado II (Multiplicación de propágulo): En este estado, los explantes son cultivados en medios con niveles relativamente altos de citocininas con el fin de interrumpir la dominancia apical y favorecer el crecimiento de las yemas laterales (Suárez et al., 2006; Suárez y Quintero 2014).

Existen diferentes tipos de citocininas entre las que se encuentran las naturales (kinetina, zeatina, 2iP) y los compuestos sintéticos (BAP, thidiazuron) que tienen efectos parecidos. La selección del tipo de citocinina a utilizar va a depender de la tasa de multiplicación que se alcance, la longitud de los tallos producidos, las posibilidades de generar variabilidad genética, el efecto que esta pueda tener posteriormente en el enraizamiento y la supervivencia de las plantas micropropagadas.

Con el fin de aumentar las tasas de multiplicación o mejorar las características de los tallos, en algunas especies se adicionan simultáneamente con las citocininas, cantidades moderadas de auxinas; sin embargo, esto debe realizarse con base en una evaluación cuidadosa para evitar la producción de callos y la regeneración de tallos adventicios, lo que puede aumentar las probabilidades de inducir variabilidad genética (Murashige, 1974; Suárez et al., 2009; López 2017).

Los subcultivos para la multiplicación de los tallos deben realizarse cada cuatro a seis semanas, transfiriendo los tallos, o clústeres de los mismos, a un medio fresco de la misma formulación. El número de subcultivos que se haga a partir de un explante individual estará relacionado con el genotipo, la consistencia en la tasa de multiplicación, la formación de crecimientos adventicios y los riesgos de variabilidad genética (Pastrana y Suárez, 2009; Acosta et al., 2011; Torres 2011; Polo 2011).

Estado III (Pretransplante o enraizamiento): La realización de este estado busca desarrollar en la planta los mecanismos necesarios para que ésta pueda sobrevivir a las condiciones ex vitro sin un suplemento adicional de carbohidratos.

En algunas especies, antes de realizar la transferencia al medio de enraizamiento, los tallos son transferidos a un medio de elongación suplido con ácido giberélico; esto se hace con el fin de aumentar su tamaño y promover una mayor acumulación de reservas en sus tejidos. Sin embargo, es necesario anotar que la presencia de giberelinas, así como de citocininas en el medio, afectan de forma negativa el proceso de enraizamiento (Suárez y Quintero, 2011).

La formación de raíces adventicias normalmente ocurre cuando los tallos son transferidos a medios de cultivo suplementado con cantidades relativamente altas de auxinas, las cuales pueden ser de origen natural (AIA, AIB) o sintético (ANA; 2,4-D; picloram; 2,4,5-T). La selección del tipo de auxina a utilizar va a depender de la especie de planta, el porcentaje de enraizamiento que se alcance, el tamaño y grosor de las raíces producidas y el efecto secundario que la auxina seleccionada pueda tener sobre el desarrollo y la supervivencia de las plantas una vez transplantadas a condiciones *ex vitro*.

El estado III, o de enraizamiento, es el más costoso de todos los estados del proceso de micropropagación, debido a los costos de las auxinas, mano de obra y tiempo de cultivo. Debido a estos aspectos, en algunas especies los tallos micropropagados son transferidos directamente del estado de multiplicación a el de adaptación en condiciones *ex vitro* sin ser sometidos a un estado previo de enraizamiento. No obstante, para algunos tipos de plantas, el enraizamiento *in vitro* es necesario para obtener adecuados porcentajes de recuperación durante la adaptación *ex vitro*, como ocurre en las especies leñosas perennes (Quintero et al., 2003; Suárez et al., 2006; Suárez et al., 2009).

Estado IV (Transplante a condiciones *ex vitro*): El principal objetivo de todo el proceso de micropropagación es el de obtener el mayor número de plantas de buena calidad adaptadas a las condiciones ambientales normales.

Las plantas producidas en condiciones in vitro son altamente ineficientes en la síntesis de carbohidratos y en el control de la deshidratación. La baja competencia fotosintética se deriva de la nutrición heterotrófica por el suministro de fuentes externas de carbohidratos, que resulta en un pobre desarrollo de los cloroplastos y una baja capacidad para fijar CO_2 . Mientras que, los altos porcentajes de humedad relativa presentes en el interior del recipiente, evitan que las hojas desarrollen estructuras como la acumulación de una cutícula cerosa e impermeable, y estomas con un funcionamiento adecuado para responder de acuerdo con el estado de hidratación de la planta. Esta estructura foliar poco diferenciada asociada con un sistema radical ineficiente o ausente, hacen que las plantas micropropagadas mueran por falta de alimentos y rápida deshidratación si son transferidas directamente a las condiciones ambientales normales (Kane, 1996).

Para contrarrestar la poca eficiencia fotosintética, es necesario transferir plantas de un tamaño tal que contengan en su estructura y tejidos reservas de carbohidratos suficientes para utilizarlos hasta que la planta produzca nuevas hojas, y su aparato fotosintético funcione de manera normal. De manera simultánea, para evitar una deshidratación severa y rápida, las plantas, o tallos micropropagados, deben ser transferidos inicialmente bajo unas condiciones de alta humedad relativa lo más parecidas posibles al ambiente in vitro, las cuales deben reducirse de forma gradual en un período de varias semanas, con el fin de propiciar el desarrollo de los mecanismos que permitan un control autónomo de la pérdida de humedad en la planta.

Cultivo de nudos

Existen algunas especies vegetales que presentan cierta insensibilidad al efecto de las citocininas y, como resultado de esto, al colocarlas en un medio suplementado con altas cantidades de este regulador de crecimiento no eliminan su dominancia apical y por ende la proliferación de varios tallos a partir de las yemas axilares es escasa o nula. En estas especies se aplica una técnica alternativa de micropropagación a partir de meristemos pre-existentes, donde

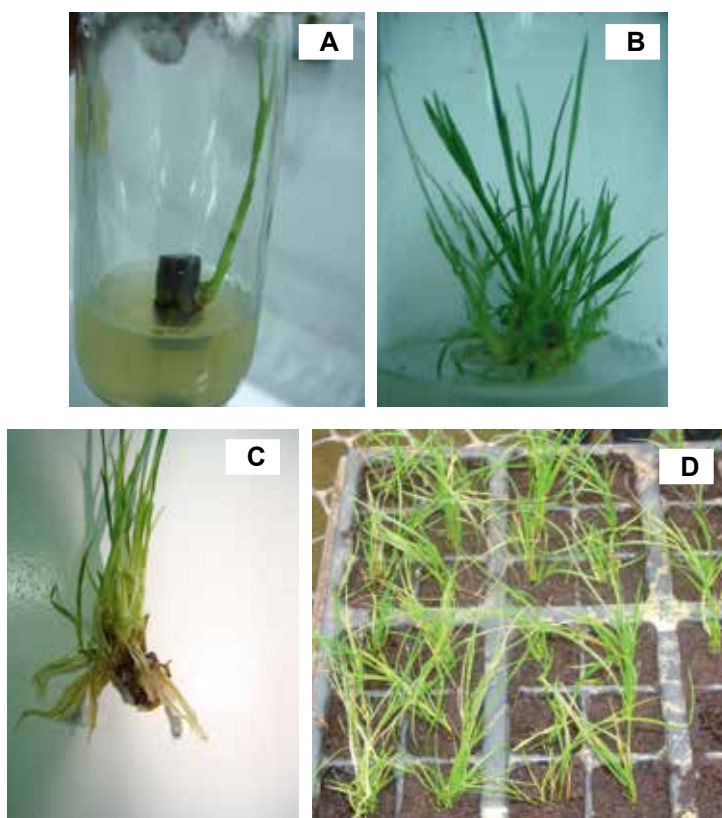


Figura 6. Estados de establecimiento (A), multiplicación (B), enraizamiento (C) y adaptación ex vitro (D) en la micropropagación de plantas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.).

los nuevos tallos se forman mediante la elongación de yemas individuales, formando tallos solitarios sin ramificación.

En el cultivo de nudos los explantes se establecen de forma horizontal sobre el medio permitiendo el crecimiento vertical de las yemas presentes en este. Una vez los tallos crecen, cada nuevo tallo elongado puede ser utilizado como fuente de nuevos explantes, o ser transferido para promover el desarrollo de raíces como un paso previo para su adaptación final a condiciones ex vitro.

Una ventaja comparativa del cultivo de nudos es que, debido a la poca producción de tallos adventicios, las probabilidades de

ocurrencia de plantas variantes se reducen. De forma inversa, la poca uniformidad en el tamaño de los nuevos tallos producidos, los nuevos tallos producidos hacia la base del explante tienen mayor crecimiento, y las bajas tasas de multiplicación se convierten en las principales desventajas de esta técnica alternativa.

Para los estados de adaptación, establecimiento, enraizamiento y adaptación ex vitro, las plantas producidas por el cultivo de nudos siguen los mismos procedimientos que aquellas producidas a partir de explantes normales con meristemos preexistentes.

Organogénesis

La organogénesis consiste en la formación in vitro de nuevos tallos de origen adventicio a partir de explantes sin meristemos preexistentes. También es conocida con el nombre de caulogénesis.

La organogénesis puede ocurrir de dos formas diferentes de acuerdo con el proceso morfogénético que da origen a los nuevos tallos, y que a su vez depende del grado de competencia y determinación presente en las células que conforman el explante (Schwarz y Beaty, 1996).

La competencia se define como la condición en la cual las células han retenido o adquirido la capacidad de diferenciación u



Figura 7. Organogénesis de plantas de tabaco.

organogénesis celular para formar nuevas estructuras, mientras que la determinación se entiende como el grado de compromiso que tiene la célula en su programación biológica para seguir un proceso morfológico controlado genéticamente sin verse afectadas por los estímulos externos (Christianson y Warnik, 1983).

Caulogénesis directa: Esta vía morfogenética ocurre cuando los nuevos brotes se originan a partir de meristemos caulinares que se han desarrollado directamente de células presentes en el explante sin el crecimiento intermedio de una capa de células de callo.

La serie de eventos jerárquicos que se suceden en la vía morfogenética de la organogénesis o caulogénesis directa son el establecimiento del explante, la producción de un meristemoide, el crecimiento de una yema (meristemo caulinar) y la elongación del tallo (Christianson y Warnik, 1988).

Los explantes que dan origen a tallos mediante organogénesis directa, normalmente son aquellos con alto grado de juvenilidad y que contienen células con bajos niveles de diferenciación (alta competencia y baja determinación). Estas, al entrar en contacto con el medio de cultivo, que normalmente tiene un suplemento moderado a alto de citocininas para promover la formación de tallos, responden iniciando la vía morfogenética caulinar formando meristemos de los cuales crecen los nuevos tallos adventicios.

La fase o etapa de multiplicación de los propágulos en la organogénesis directa puede ocurrir de dos formas diferentes. Una de ellas consiste en producir de forma seriada los tallos necesarios directamente a partir de los explantes originalmente establecidos. Alternativamente, los explantes sin meristemos pre-existentes se utilizan para inducir la formación de los tallos iniciales, los cuales son utilizados como explantes para producir nuevos tallos a partir de los meristemos axilares pre-existentes presentes en ellos.

Los estados previos, adaptación de plantas madres y establecimiento, y subsecuentes, enraizamiento y adaptación ex vitro, se desarrollan de forma similar a lo expuesto para el método de micropropagación a partir de meristemos pre-existentes independientemente de cual de las dos formas se utilice para la multiplicación de los tallos.

El método de micropropagación a través de organogénesis directa presenta algunas ventajas como son la posibilidad de llevar a cabo los estados I (establecimiento) y II (multiplicación) de forma simultánea sin la necesidad de implementar subcultivos intermedios; además, al ser la organogénesis un evento de origen unicelular, muchas de las células presentes en el explante tienen el potencial de ser inducidas a dividirse y formar meristemos y posteriormente nuevos brotes, lo que representa unas altas tasas potenciales de multiplicación.

Una de las desventajas de la micropropagación a través de organogénesis consiste en los mayores riesgos de variación genética en las plantas resultantes como resultado de variaciones celulares que pueden estar presentes en un mismo explante; adicionalmente, el origen unicelular de los nuevos brotes conlleva a la segregación de tipos de células lo cual impide el mantenimiento del fenotipo cuando se utilizan explantes provenientes de plantas quimeras (Broetjes y Keen, 1980).

Caulogénesis indirecta: Este tipo de organogénesis ocurre cuando los meristemos caulinares de los cuales crecen los nuevos brotes tienen su origen en células provenientes de una capa de callo que crece a partir del explante (Suárez y Salgado, 2008).

En el desarrollo de la organogénesis indirecta, una vez los explantes son colocados en contacto con el medio de cultivo, las células llevan a cabo una dediferenciación que conduce a la readquisición de competencia y ocurrencia de cambios interiores que promueven una redeterminación de sus funciones y propiedades.

Los tallos producidos en la organogénesis indirecta crecen a partir de nudos meristemáticos, conocidos como meristemoides, que se encuentran inmersos en el tejido calloso; esta formación está estrechamente relacionada con el tipo de explante y la clase de planta a micropropagar. En plantas dicotiledóneas, el rango de explantes que se pueden inducir a formar células de callo es mayor e incluye hojas, tallos, segmentos radicales, tejidos de almacenamiento (túberos, cormos), meristemos apicales, embriones, plántulas, etc; mientras que, para el caso de las monocotiledóneas, las alternativas son mas reducidas y los mejores resultados se han obtenido con el uso de embriones, hojas jóvenes, segmentos nodales e inflorescencias inmaduras (Chawla, 2003).

Para mejorar la respuesta de formación de tallos, el tejido de callo inducido y el explante adjunto, deben ser transferidos de forma conjunta al menos en una oportunidad antes de proceder a subcultivar el tejido de callo de manera independiente. Una vez separado, el callo debe transferirse a un medio con bajo nivel de auxinas y concentraciones relativamente altas de citocininas, con el fin de inducir la diferenciación de las células en puntos meristemáticos (meristemoides) que se convertirán eventualmente en yemas desarrolladas, de las cuales se elongarán los nuevos tallos (Christianson y Warnik, 1985).

La multiplicación de los tejidos en la micropropagación a través de organogénesis indirecta, puede realizarse de dos formas diferentes. La primera forma es mediante el cultivo y la proliferación del tejido de callo para aumentar el número potencial de células que llevarán a cabo organogénesis. Esta multiplicación puede efectuarse mediante el subcultivo del material en medio semi sólido o en medio líquido a través de suspensiones celulares. La segunda forma de multiplicación es similar a la explicada para la organogénesis directa, y consiste en que una vez los nuevos tallos se han formado y elongado, éstos son utilizados como fuente de explantes para una multiplicación a partir de los meristemos pre-existentes presentes en los nuevos tallos (González, 2012).

Totipotencialmente, cualquier célula de callo que se desarrolle a partir del explante tiene capacidad para llevar a cabo organogénesis; con la posibilidad de establecer suspensiones celulares con las células de callo para incrementar el número de estas, la micropropagación a través de organogénesis indirecta presenta un potencial de producción de nuevas plantas mucho más alto que los métodos de micropropagación a través del cultivo de explantes con meristemos pre-existentes y organogénesis directa, la cual representa la mayor ventaja comparativa de esta forma de micropropagación.

La micropropagación indirecta presenta ciertas limitantes que reducen las posibilidades de su uso como un método comercial de micropropagación. Entre estas limitantes tenemos: la producción de células de callo aumenta de manera significativa las probabilidades de generar variación genética en las plantas regeneradas, el potencial morfogénico o grado de competencia de los callos producidos varía de manera sustancial entre ellos, se hace necesario el uso de interacciones complejas y costosas de reguladores de crecimiento, y la disminución de la capacidad morfogénica de los callos disminuye a medida que se suceden los subcultivos (Schwarz y Beaty, 1996).

Los estados de enraizamiento y adaptación final a condiciones ex vitro de las plantas recuperadas mediante organogénesis (tanto directa como indirecta) suceden de forma similar a lo indicado para la micropropagación a través del cultivo de explantes con meristemos pre-existentes.

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática consiste en la producción de embriones originados de células diferentes al cigoto a los cuales se les denomina embriones somáticos (Gray, 1996).

El proceso de la embriogénesis cigótica en angiospermas se inicia con la fusión de la ovocelula (gameto femenino) con un núcleo generativo (gameto masculino) dentro del saco embrionario. Esta unión es

proseguida de una serie de divisiones y diferenciaciones celulares que terminan con la formación del embrión completo protegido por las cubiertas de la semilla. Similarmente, la embriogénesis somática en condiciones in vitro, se inicia a partir de una célula somática que lleva a cabo el proceso de embriogénesis, donde al final el embrión desarrollado no termina envuelto por cubiertas seminales (Dodeman et al., 1997).

A pesar de originarse en un ambiente diferente al saco embrionario, los embriones somáticos producidos en condiciones in vitro comparten características comunes con los embriones zigóticos. Son bipolares, carecen de conexiones vasculares con el tejido materno y siguen la misma secuencia morfológicamente jerárquica que se sucede en los embriones originados por métodos sexuales, es decir forman los estados de proembrión, globular, corazón, torpedo y cotiledonar durante su proceso de embriogénesis (Haccius, 1978; Zimmerman, 1993).

Hasta la presente, la formación de embriones somáticos ha sido reportada en un gran número de especies mono y dicotiledóneas, lo cual permite considerar que este fenómeno, propio de los organismos vegetales, es factible de ocurrir en cualquier especie vegetal dado que se seleccione el explante adecuado y se suministren las condiciones óptimas de medio de cultivo (Feher et al., 2003).

Estados de la micropropagación a través de embriogénesis somática: La producción de plantas mediante el cultivo de embriones somáticos ocurre a través de cuatro estados, son estos: inducción y multiplicación de tejidos embriogénicos, desarrollo de embriones somáticos, maduración y conversión en plantas.

- **Inducción:** La inducción de tejido embriogénico puede producirse de forma directa o indirecta.

Inducción directa. También se le denomina permisiva, y ocurre cuando en el explante hay presentes células que conservan un alto potencial embriogénico como los tejidos nucelares,

embriones inmaduros e hipocotilos. Este potencial es expresado una vez las células entran en contacto con el medio de cultivo, resultando en la formación directa de embriones somáticos de diferentes estados de desarrollo.

Las células que pueden llevar a cabo la inducción directa se les denomina células embriónicamente predeterminadas (CEPD), y generalmente sólo requieren del establecimiento en un medio de cultivo simple para expresar su potencial embriogénico (Litz y Gray, 1992).

Inducción indirecta. La inducción indirecta también se conoce como dirigida, y ocurre cuando los embriones somáticos desarrollan a partir de células presentes en un tejido que crece sobre el explante, al cual se le denomina masas proembriogénicas (MPEs) (Guevara et al., 2012).

La inducción indirecta resulta cuando las células presentes en el explante tienen altos grados de diferenciación y determinación por lo que es necesario que readquieran la competencia y que posteriormente se determinen a seguir la vía embriogénica. Con el fin de inducir esta readquisición de competencia y ganancia de potencial embriogénico, el explante se establece en un medio de cultivo suplido con auxinas de efectos fuertes como 2,4-D o picloram, las cuales inducen la proliferación de nuevas células, causan una eliminación de la polaridad celular y promueven una reorganización del material genético asociado con cambios en la expresión genética (Suárez et al., 2004; Polanco, 2017).

Las células del tejido producido por efecto de las auxinas que adquieren la capacidad para formar embriones somáticos se les denomina células embriónicamente inducidas (CEI), y se caracterizan por tener un tamaño reducido, forma isodiamétrica, un citoplasma denso con un núcleo de gran tamaño y nucleolos bastante desarrollados (Ammirato, 1974).

Como resultado del efecto de despolarización celular que ejercen las auxinas, mientras las MPEs se encuentren bajo el efecto de estas, no continuarán el proceso de desarrollo morfológico para convertirse en embriones individuales, lo cual permite la formación repetitiva de nuevas células embriogénicas a partir de las que se encuentran presentes en el tejido recién formado (Litz y Gray, 1995).

- **Multiplicación:** La multiplicación, o mantenimiento, del material embriogénico inducido se puede llevar a cabo en medio líquido o en medio semi sólido. Independientemente del material inducido, ya sea embriones o MPEs, el medio de multiplicación debe estar suplementado con dosis relativamente altas de auxinas con el fin de prevenir que las estructuras avancen en el desarrollo del estado morfológico a medida que se induce la multiplicación del material (Litz y Gray, 1992).

El subcultivo del material embriogénico en medio semi sólido se realiza mediante la transferencia de una porción (100 - 200 mg) del tejido inducido hacia un medio de cultivo fresco de similar formulación y el subsecuente almacenamiento en ausencia de luz para evitar la diferenciación de las células. La frecuencia con la cual se realicen los subcultivos va a depender de la tasa de crecimiento de los tejidos, el genotipo y la cantidad de auxinas (Witjaksono y Litz, 1999a).

La multiplicación de material embriogénico en medio líquido se realiza mediante la inoculación del medio con una cantidad de inóculo similar a la utilizada para la transferencia a medio semi sólido (100 a 200 mg). Los cultivos son colocados en un agitador orbital (90 - 120 rpm) bajo poca intensidad lumínica u oscuridad total, donde los cultivos siguen un patrón de desarrollo similar al de cualquier suspensión celular.

- **Desarrollo de embriones somáticos:** La transferencia de la MPEs a un medio de cultivo sin la presencia de auxinas es

necesaria para favorecer el desarrollo de estas en embriones somáticos (Suárez et al., 2011).

La eliminación del efecto causado por las auxinas ocasiona que la polaridad de las células sea restablecida y ocurra la expresión de algunos genes silenciados por la acción de estas. El restablecimiento de la polaridad celular, activa la orientación estructural y promueve la determinación y diferenciación de las células precursoras de los meristemos apical y radical; simultáneamente, la expresión genética diferencial resultará en la síntesis de diversos productos necesarios para lograr el desarrollo embrionario, iniciándose con esto la formación del embrión (Zimmerman, 1993).

- **Maduración:** En la embriogénesis zigótica, una vez el desarrollo morfológico va llegando a su final, los embriones entran en un proceso fisiológico de gran actividad metabólica denominado fase de maduración. En este período se produce una serie de cambios que conllevan a la formación completa del axis polar y la producción de ciertas proteínas indispensables para resistir las condiciones ambientales que debe enfrentar la semilla una vez se libere del fruto y se disponga llevar a cabo el proceso de germinación (Bewley y Black, 1994).

En algunas especies se ha observado que para obtener mayores porcentajes de conversión y plantas de mejor calidad a partir

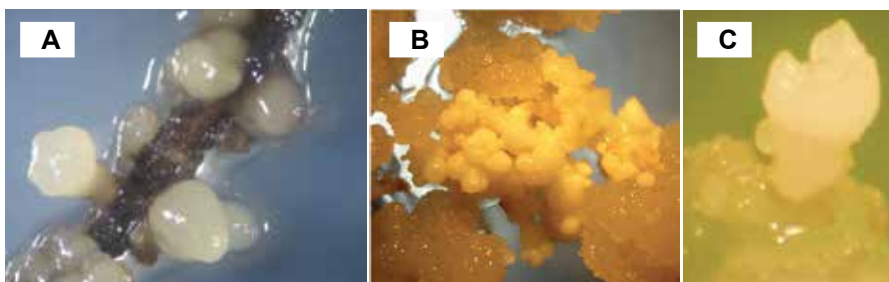


Figura 8. Inducción (A), multiplicación de tejidos embriogénicos (B) y desarrollo de embriones somáticos de ñame (C) *Dioscorea* sp.

de los embriones somáticos desarrollados, es conveniente el tránsito a través de un estado de maduración, el cual busca producir cambios similares a los que ocurren en los embriones zigóticos durante la fase de desarrollo fisiológico posterior a la embriogénesis y previa a la liberación de la semilla (Witjaksono y Litz, 1999b).

En el estado de maduración, los embriones somáticos son transferidos a un medio de cultivo semi sólido con una formulación tal que genere un cierto grado de estrés favoreciendo de este modo la acumulación de proteínas de resistencia y de transformación de reservas nutricionales. Los compuestos mas comunmente utilizados para lograr estas condiciones son el ácido abscísico (ABA) y los agentes reguladores del potencial osmótico del medio de cultivo (sorbitol, altos niveles de sacarosa, D-mannitol) (Ammirato, 1974; Zimmerman, 1993).

- **Conversión:** La conversión se define como el porceso por medio del cual un embrión somático da origen a una planta y coincide con el suministro de las condiciones que simulan el proceso de germinación de semillas.



Figura 9. Recuperación de una planta de aguacate (*Persea americana*) a partir de un embrión somático.

Para promover la conversión, el medio de cultivo es suplementado con cantidades relativamente altas de ácido giberélico (GA_3), el cual se ha observado aumenta significativamente su contenido en la etapa previa al proceso de germinación de semillas e induce el crecimiento de la radícula y la plúmula a partir de los meristemos radical y apical, respectivamente, presentes en los embriones somáticos (Witjaksono y Litz, 1999b).

El proceso de desarrollo estructural de los embriones somáticos puede presentar fallas que algunas veces resultan frecuentes. Ciertos embriones somáticos producen solamente ápices caulinares o raíces, e incluso en algunos casos carecen de ambos órganos; cuando la producción de meristemos apicales falla, las posibilidades de recuperación de plantas son prácticamente nulas, mientras que cuando hay formación de yemas y elongación caulinar sin formación de raíces, los tallos producidos pueden ser utilizados como explantes para realizar micropropagación a partir de meristemos pre-existentes. Igualmente, la formación de ápices caulinares permite la utilización de microinjertación en plántulas recién germinadas (Raharjo y Litz, 2008).

Cuando el embrión produce ambos meristemos y se logra recuperar una planta con sus partes aérea y radical completa, la adaptación de ésta se realizará de acuerdo con lo descrito en el estado IV (adaptación a condiciones ex vitro) del proceso de micropropagación a partir de explantes con meristemos pre-existentes.

La micropropagación a través de la embriogénesis somática tiene algunas ventajas al compararse con los otros métodos de micropropagación vegetal. El uso de bioreactores para multiplicar embriones somáticos y posteriormente convertirlos en plantas puede hacer posible la producción de grandes cantidades de nuevos individuos en períodos de tiempo más cortos y espacios bastante reducidos, la presencia de ambos meristemos, apical y radical, en una misma estructura permite obviar el estado III

de la micropropagación (enraizamiento), y el almacenamiento de germoplasma en forma de cultivos embriogénicos es una técnica que ahorra grandes esfuerzos y aumenta las cantidades almacenables de recursos genéticos. Adicionalmente, la producción de embriones somáticos es una herramienta biológica de gran aplicación en trabajos de investigación en las áreas de genética celular, fisiología, botánica y en la producción de plantas genéticamente modificadas (Litz y Gray, 1995).

A pesar de sus bondades, la embriogénesis somática no es un método común de producción comercial de plantas debido a la presencia de algunos aspectos limitantes. Los porcentajes de conversión de embriones somáticos en plantas son bajos (<50%) comparados con los estándares mínimos de semillas sexuales (>90%), lo cual incrementa considerablemente el costo de la unidad de producción. La formación de embriones deformes y con variabilidad de tamaño afecta la homogeneidad de las plantas producidas, y los tejidos embriogénicos pierden rápidamente el potencial para desarrollar embriones; adicionalmente, el manejo de los embriones somáticos por la falta de cubiertas protectoras, los hacen altamente susceptibles a los daños mecánicos y la pérdida rápida de humedad. Finalmente, la embriogénesis somática es uno de los métodos de propagación que induce mayores niveles de variación genética en las plantas recuperadas.

6. SUSPENSIONES CELULARES

Una suspensión celular es la proliferación de agregados celulares que crecen dispersos en un medio líquido en constante movimiento por la acción de un agitador orbital, y que son iniciadas mediante la inoculación de porciones de callo friable o tejidos embriogénicos.

El cultivo de células en suspensiones celulares ha permitido no solo alcanzar altas tasas de proliferación, sino encontrar una nueva perspectiva de uso a los sistemas vegetales. Un ejemplo de esta aplicación es el uso de cultivos celulares como biofábricas para la producción de metabolitos secundarios, productos medicinales y polímeros industriales (Sauerweine et al., 1992).

6.1 Material vegetal

Los tejidos utilizados para iniciar las suspensiones celulares son inducidos a partir de explantes cultivados inicialmente en medios de cultivo semisólidos suplementados con cantidades variables de reguladores de crecimiento, dependiendo del tejido de callo o embriogénico que se desea obtener. El medio de cultivo utilizado para la multiplicación inicial del material debe estar formulado para promover la multiplicación celular evitando el desarrollo completo de organogénesis o embriogénesis.

La cantidad de inóculo para iniciar una suspensión celular depende de la capacidad del recipiente y la cantidad de medio utilizado. El medio inoculado es inmediatamente colocado en un agitador orbital a una velocidad que permita mantener a los tejidos celulares en suspensión sin decantarse (30 - 150 rpm y 4 a 8 cm de radio en movimiento orbital). Este mecanismo permite alcanzar altas tasas de multiplicación, debido al choque permanente entre los agregados y de estos contra las paredes del recipiente. Una vez separados, los nuevos agregados se convierten en origen de nuevos cúmulos de células que actúan como reacciones en cadena para mantener una proliferación celular continua.

El movimiento orbital, y la fuerza centrífuga que este genera, permite la introducción permanente de aire en el medio, el cual es necesario para la supervivencia de las células y aumentar las tasas de multiplicación, al tiempo que permite un contacto más uniforme de todas las células con el medio propiciando un crecimiento más sincronizado de las mismas.

6.2 Fases de un cultivo en suspensión celular

Al igual que toda población celular, los agregados cultivados en una suspensión incrementan en número y tamaño como una consecuencia de la división y elongación en función de la asimilación de nutrientes presentes en el medio de cultivo. En la medida en que

los nutrientes del medio comienzan a agotarse, o dejan de estar disponibles, y el espacio entre las células se hace mas restringido, el ritmo de crecimiento del cultivo se reduce y la división celular se hace más lenta hasta que este se detiene por completo y los tejidos mueren (Szabados et al., 1993).

La sucesión de fases que se suceden en el cultivo de una suspensión celular deben caracterizarse con el fin de evitar que los tejidos alcancen la senescencia y promover la multiplicación cíclica de los tejidos para incrementar las tasas de proliferación celular (Salgado y Suárez, 2012).

Fase de reposo

También conocida con el nombre de fase de retraso, sucede cuando las células, independientemente de provenir de un explante recién inducido o de un cultivo previo en suspensión, son transferidas a un medio de cultivo fresco para iniciar el crecimiento.

El medio de cultivo fresco se caracteriza porque posee una alta disponibilidad de nutrientes, tiene un pH relativamente bajo y no contiene compuestos liberados por las células. Estos factores interactúan con una baja población de células recién transferidas que muestran su falta de adaptación a las nuevas condiciones ambientales, entrando en una condición de letargo o multiplicación celular muy lenta parecida a un estado de reposo.

Fase exponencial

Una vez las células se han adaptado a las condiciones del medio, aprovechan todas las condiciones ambientales favorables (medio con alta disponibilidad de nutrientes y amplio espacio físico) para llevar a cabo procesos acelerados de división celular alcanzando un ritmo exponencial de multiplicación que se convierte en la mayor velocidad de proliferación en todo el ciclo.

Fase lineal

Debido a las condiciones aun favorables de nutrición y espacio en el

medio, la división celular continúa de forma rápida aunque la velocidad de esta se reduce con respecto a la de la fase exponencial. Como resultado de la asimilación de los nutrientes presentes en el medio, las células multiplicadas aumentan de tamaño provocando una reducción en el espacio y disminución en la disponibilidad de nutrientes.

Fase de desaceleración

En esta fase disminuye la velocidad de crecimiento y multiplicación como resultado de la reducción en la disponibilidad de nutrientes del medio y el aumento de la población celular. La expansión y el aumento de tamaño individual de las células también se reducen y las células comienzan a mostrar signos de estrés.

Fase estacionaria

Tras sufrir una disminución significativa en su velocidad, como resultado de la poca disponibilidad de nutrientes y la superpoblación de células en el medio, la división celular se detiene completamente; de forma adicional, las células reducen su volumen celular y los altos niveles de estrés propician la liberación de compuestos fenólicos que causan incluso la muerte de otras células con lo cual se inicia la senescencia del cultivo.

La sucesión de las fases de un cultivo en suspensión puede darse de forma variable con relación al tiempo dependiendo de la especie, e incluso del genotipo. La figura 8, muestra las diferentes etapas que se suceden con respecto al aumento de volumen de un cultivo en suspensión consistente de tejidos embriogénicos de cuatro cultivares de aguacate en un medio líquido. La figura muestra que aunque hay una diferencia del volumen celular, las fases ocurren de forma más o menos simultánea en el tiempo. La etapa de reposo abarcando los primeros cuatro días, las fases de crecimiento exponencial y lineal extendiéndose desde el final de la primera semana y transcurriendo hasta el final de la segunda semana, mientras que la fase final o estacionaria ocurre entre la tercera y cuarta semana.

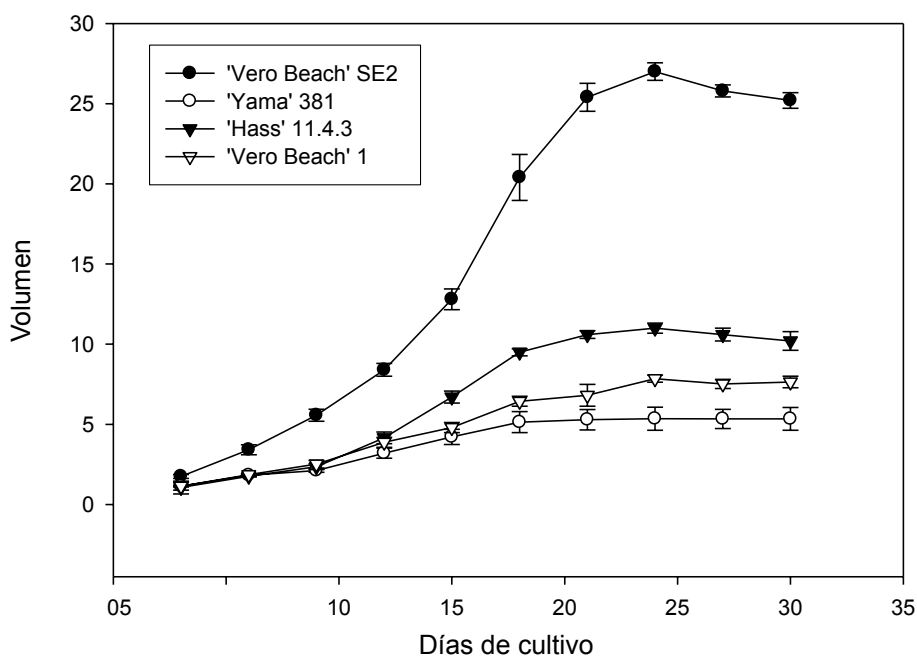


Figura 10. Gráfica del crecimiento de suspensiones celulares de cuatro líneas embriogénicas de aguacate (Suárez, 2003).

El cultivo de tejidos mediante el uso de suspensiones celulares busca aumentar de forma significativa las tasas de proliferación celular; sin embargo, si se permite que el cultivo transite a lo largo de las cuatro fases de crecimiento, al llegar a la etapa estacionaria las células estarán muertas o en condiciones desfavorables para iniciar nuevamente una proliferación de una manera acelerada. Por lo tanto, para mantener altos niveles de multiplicación, es preciso, transferir los cultivos a un medio fresco al final de la fase exponencial o inicio de la fase lineal para alcanzar un rápido crecimiento, uniformidad del cultivo y viabilidad de la mayoría de las células (Street, 1977; Nover et al., 1982).

Otro aspecto crítico para obtener altas tasas de proliferación en ciclos continuos de cultivo de suspensiones celulares es el tamaño del inóculo. Cuando la fuente del inóculo es una suspensión que

se encuentra en la fase exponencial, se debe utilizar una dilución 1:4 (v/v), mientras que cuando el inóculo es tomado a partir de una suspensión en fase lineal (aproximadamente una semana después de la fase exponencial) la dilución debe ser 1:10 para no sobresaturar la suspensión (Chawla, 2003).

6.3 Medición del crecimiento en suspensiones celulares

El crecimiento de las células en el medio líquido es una variable de gran importancia cuando se busca ajustar protocolos para el uso de las suspensiones celulares como una herramienta para la micropropagación, adaptación de especies a condiciones in vitro, selección de variantes in vitro u otro estudio a nivel celular.

Algunas de las variables que se pueden utilizar como indicadores de la variación del crecimiento en una suspensión celular son el incremento en el número de células por milímetro cuadrado (mm^2), el aumento del peso fresco de los tejidos proliferados o el incremento en el volumen de precipitados celulares. Para cada una de las medidas anteriores es necesario registrar un valor inicial contra el cual se va a comparar el aumento de los tejidos en el medio de cultivo (Suárez, 2003).

El incremento del número de células se registra utilizando un microscopio y la tinción de las células con azul de metileno. Una muestra del cultivo celular (ya sea completo o diluido), es colocada en el objetivo de un microscopio con un fondo milimetrado. El dato se obtiene contando el número de células que se encuentren por milímetro cuadrado.

El aumento del peso fresco se determina registrando el valor de la masa fresca de tejidos presentes en cada unidad de muestreo. Antes del pesaje, los tejidos deben ser separados del medio a través de un papel filtro, enjuagados con agua destilada y aireados en el interior de la cámara para eliminar la humedad.

El incremento del volumen de precipitados celulares es uno de los

métodos mas usados para determinar el crecimiento celular. El contenido total del cultivo (medio más tejidos) es depositado en un cilindro graduado permitiendo que se decanten las células. Si la suspensión es tan densa que no permite la decantación espontanea, el uso de una centrífuga a muy bajas revoluciones ayuda a separar las fases sin deteriorar las células. El dato final se obtiene registrando el valor en mililitros del contenido de células decantadas.

Las suspensiones celulares son un método práctico de mantener tejidos vegetales al nivel celular, y un protocolo de cultivo de tejidos de gran importancia en ciertas áreas como la propagación clonal masiva de plantas, la transformación genética, la conservación de germoplasma in vitro, modelo para estudios de genética celular, fisiología, biología molecular, etc. y últimamente en la producción de metabolitos secundarios.

7. CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA IN VITRO

La búsqueda de fuentes de variación, ya sean mejoradas o silvestres, para llevar a cabo programas de mejoramiento genético vegetal es una actividad costosa y, una vez obtenidas, estas fuentes deben ser conservadas en colecciones denominadas bancos de germoplasma (Roca et al., 1993).

El objetivo principal de los bancos de germoplasma es el de garantizar la disponibilidad de recursos genéticos al momento que estos se necesiten para siembra o generar variabilidad en una determinada especie. En aquellas especies donde el principal método de propagación es de tipo sexual mediante la siembra de semillas ortodoxas, la forma más conveniente de almacenar germoplasma es a través del almacenamiento de semilla deshidratada (5 - 8% de humedad) a bajas temperaturas (<10 °C) y baja humedad relativa (Bewley y Black, 1994).

Existe un grupo de especies, en las cuales la conservación de germoplasma mediante el almacenamiento de semilla no es posible debido a que, entre otros factores, algunas no producen semilla viable, las semillas que producen son recalcitrantes, la reproducción sexual genera altos niveles de variabilidad genética y algunas producen semillas con cotiledones carnosos que se deterioran rápidamente debido a los ataques de patógenos. Por estas, y muchas otras razones, estas especies se propagan exclusivamente a través de métodos vegetativos, lo que trae como consecuencia que el almacenamiento del germoplasma se realice mediante el establecimiento de colecciones in vivo (Malice y Baudoin, 2009).

El almacenamiento de germoplasma in vivo presenta ciertos inconvenientes entre los que se cuentan el uso de terrenos costosos y extensos, las plantas almacenadas requieren de un manejo agronómico óptimo, están expuestas al ataque de insectos plagas, enfermedades y desastres naturales, tienden a deteriorarse en la medida que aumenta la edad y algunas deben ser transplantadas periódicamente como consecuencia de su ciclo de vida anual o bianual.

Para especies vegetales cuyo material genético debe conservarse in vivo, el almacenamiento en condiciones in vitro surge como una alternativa para superar las limitantes anteriormente descritas. En condiciones in vitro, el almacenamiento se realiza a pequeña escala, lo cual evita los gastos del terreno, se pueden conservar especies que están en peligro de extinción y por medio de la micropropagación sacarlas de este estado, es posible propagar plantas que no se pueden reproducir por vía sexual, se reduce la velocidad de crecimiento, las plantas se mantienen libres del ataque de plagas y patógenos, y los cultivos no son tan vulnerables a riesgos por catástrofes ambientales (Engelmann, 1998).

El almacenamiento en condiciones in vitro, se puede realizar de dos formas: mediante el cultivo en crecimiento lento o mediante la crioconservación.

7.1 Almacenamiento por crecimiento lento

Consiste en cultivar in vitro el material vegetal bajo condiciones que reducen su crecimiento y proliferación sin afectar la supervivencia del mismo. La conservación puede realizarse en diversos tejidos y órganos como células de callo, cultivos embriogénicos, meristemos, tejidos diferenciados e incluso plantas micropropagadas.

Las condiciones de cultivo para los tejidos bajo el método de crecimiento lento se caracterizan por medios con baja concentración de sales, alto potencial osmótico y temperaturas relativamente bajas ($<10\text{ }^{\circ}\text{C}$), que ayudan a reducir la disponibilidad de nutrientes y disminuyen la velocidad de las reacciones internas de los tejidos vegetales, lo cual conduce a los tejidos a un estado cercano al reposo total (Suárez, 2008; Suárez et al., 2012).

Las condiciones para el almacenamiento in vitro mediante cultivo lento, deben conducir a subcultivar el material vegetal en rangos de tiempo de seis meses a un año sin afectar la viabilidad de los tejidos ni las tasas de crecimiento y desarrollo del material una vez transferido a condiciones ideales de cultivo.

7.2 Crioconservación

Esta técnica se refiere al almacenamiento de tejidos en presencia de ultra bajas temperaturas que se obtienen con la ayuda materiales y equipos como el dióxido de carbono sólido ($-79\text{ }^{\circ}\text{C}$), ultracongeladores ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), vapor de nitrógeno ($-150\text{ }^{\circ}\text{C}$) o nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) que someten a los tejidos vegetales a un estado vivo de completa inactividad (González-Benito et al., 2004).

El propósito de la crioconservación es la de conseguir la solidificación del líquido celular, el cual se congela por debajo de $-68\text{ }^{\circ}\text{C}$, y el mantenimiento de la viabilidad de los tejidos después de ser extraídos de las condiciones de conservación. Esta última va a depender de la capacidad que posea el genotipo a conservar para

soportar las bajas temperaturas; y esta a su vez está asociada con la facilidad de las células del mismo mismo para formar cristales en el protoplasma que dañan las membranas de los organelos.

Para ejecutar un proceso de crioconservación, se debe tomar en consideración variables como el tejido que se va a crioconservar y su preparación, la aplicación de un tratamiento para resistir las bajas temperaturas (crioprotección), el método de congelación, la forma de descongelarlo y la evaluación de la viabilidad después de la crioconservación.

Selección del tejido

El tejido que se desea crioconservar puede ser tomado de cualquier órgano de la planta; sin embargo, se debe tener en cuenta que éste va a tener marcada influencia en la eficiencia del proceso.

Los mejores tejidos para crioconservación son meristemos y embriones en estados tempranos de desarrollo; ambos constituyen estructuras desarrolladas que contienen puntos de crecimiento organizados, los cuales favorecen la tolerancia a las bajas temperaturas y facilitan reasumir el crecimiento al momento de ser retirados del estado de congelación.

La crioconservación de tejidos compuestos por células friables (callo y tejido embriogénico) no es recomendable; sin embargo, de ser necesaria su realización, es conveniente tomar los tejidos de callo o masas proembriogénicas de crecimiento reciente en medios semi sólidos, o a partir de suspensiones celulares en la fase estacionaria o exponencial temprana. En ambos casos se deben evitar los tejidos provenientes de suspensiones en estados avanzados, con tonalidades marrón producto de la emisión de fenoles y estructuras altamente hidratadas, ya que estos tienen una menor capacidad de soportar las bajas temperaturas (Efendi y Litz, 2003).

Preparación del material vegetal

Los dos aspectos que causan daños severos e irreparables a las células durante el congelamiento son la formación de cristales de hielo, que rompen las membranas de los organelos y la estructura de la célula en general, y las altas concentraciones intracelulares de solutos, que alcanzan niveles tóxicos debido a la deshidratación celular. Por esta razón, es conveniente que una vez se haya obtenido el tejido que se va a crioconservar, debe ser tratado con el fin de inducir cierto grado de tolerancia para soportar las bajas temperaturas presentes durante el almacenamiento. De los tratamientos que se recomiendan se pueden mencionar el uso de medios de cultivo con reducción en la concentración de nutrientes, almacenamiento de los tejidos a temperaturas entre 4 °C y 7 °C por una semana y disminución de la hidratación de los tejidos mediante modificación del potencial osmótico del medio.

Pasado el período de preacondicionamiento, la protección de los tejidos contra las bajas temperaturas se logra mediante la adición de sustancias denominadas crioprotectores, los cuales tienen como función evitar la formación de cristales y disminuir los niveles de deshidratación intracelular. Algunos de los productos crioprotectores usados con mayor frecuencia en el almacenamiento de germoplasma vegetal son el glicerol, el sulfóxido de dimetilo (DMSO), las acetamidas, la sacarosa, la manosa, la polyvinilpyrrolidona (PVP) y la prolina.

La protección se efectúa generalmente colocando las estructuras vegetales dentro de un tubo diseñado para soportar bajas temperaturas (criotubo), el cual es adicionado con la solución de crioprotector garantizando que el tejido quede completamente inmerso en la solución crioprotectora.

Almacenamiento

Las temperaturas a emplear en el almacenamiento pueden ir de -80 °C (congeladores) a -196 °C (nitrógeno líquido) dependiendo de la disponibilidad de recursos y equipos. Aunque lo ideal es que las temperaturas de almacenamiento se mantengan entre

-150 °C a -196 °C, los cambios bruscos de temperatura pueden resultar catastróficos, razón por la cual la estabilidad del grado de temperatura es tan importante como la temperatura misma (Varghese et al., 2008).

Una vez se ha adicionado el crioprotector, los tejidos pueden ser almacenados a la temperatura deseada de forma lenta, rápida o combinando un período lento con uno rápido. El método de congelamiento lento, implica que los tejidos son sometidos a una disminución de temperatura de forma gradual desde la temperatura ambiente hasta alcanzar los -100 °C, para posteriormente proceder a colocar los tubos con el material dentro del nitrógeno líquido. Este método es aplicado cuando se cuenta con sistemas automatizados para controlar la disminución de temperatura.

El método lento de congelación favorece una mayor deshidratación intracelular, lo que ayuda a disminuir la posibilidad de formación de cristales dentro de la célula. Se ha utilizado en la conservación de meristemos apicales de arvejas, fresas, papa y yuca (Sarkar y Naik, 1998).

El método rápido de congelación consiste en colocar los tubos con el material de forma directa en nitrógeno líquido ocasionando un congelamiento inmediato. Esta forma de congelación reduce considerablemente la formación de cristales y permite la utilización de otras fuentes de bajas temperaturas como el hielo seco (CO₂) en lugar de nitrógeno líquido.

El método combinado de congelación se aplica realizando una disminución lenta de la temperatura desde la temperatura ambiente hasta los -40 °C, seguida por la introducción de los tubos con los tejidos en nitrógeno líquido.

Descongelamiento

Una vez extraídos de la congelación, los tubos deben ser colocados inmediatamente en agua a una temperatura de 35 - 45 °C con agitación permanente hasta que el hielo del interior se descógele

completamente. Al desaparecer el hielo, los tubos deben ser colocados en agua a una temperatura de 20 - 25 °C por varios minutos para enfriar sus paredes y evitar daños en los tejidos.

Los tejidos deben ser removidos de la solución crioprotectora y enjuagados con agua estéril o medio de cultivo antes de colocarlos en el medio de cultivo para reanudar su crecimiento.

Determinación de la viabilidad y regeneración de plantas

El propósito principal de la crioconservación es mantener la viabilidad de los tejidos después del período de almacenamiento a bajas temperaturas, por lo que es necesario verificar la supervivencia de los tejidos y las células una vez finalizado.

El mas común de los métodos de medición de la viabilidad de células vegetales consiste en la tinción con tetrazolio (2,3,5-trifeniltetrazolio). Las células viables mantienen niveles de respiración por la actividad mitocondrial; al ser tratadas con tetrazolio, estas adquieren una coloración roja debido a la reducción que hacen del producto las enzimas deshidrogenadas (presentes en las mitocondrias) convirtiendo el producto en fenilformazán, consistiendo la tinción en un indicativo de la actividad respiratoria y por lo tanto de viabilidad celular.

Una vez se ha determinado que los tejidos son viables, estos deben ser inoculados en medios cultivo con la formulación óptima para reactivar el crecimiento y la recuperación de las plantas (Efendi, 2003).

8. CULTIVO DE PROTOPLASTOS

La pared celular proporciona protección y soporte estructural a la célula, convirtiéndose en una barrera que impide la transferencia física de moléculas y otros componentes desde el exterior hacia el citoplasma.

El término protoplasto fue adoptado por Hanstein en 1980 para designar la materia viva rodeada de una membrana celular vegetal. Por lo tanto, un protoplasto se refiere a todo el contenido presente en una célula vegetal sin incluir su pared celular.

*La remoción de la pared celular para obtener protoplastos fue obtenida por primera vez por Klercker (1982) a través de métodos microquirúrgicos en células plasmolizadas con rendimientos muy bajos (poco número de células sanas). Posteriormente, con el aislamiento de la enzima celulasa, que actúa sobre la celulosa, del hongo *Myrothecium verrucaria*, se inició el uso de enzimas para reomover la pared celular, la cual se convirtió en la forma más utilizada para llevar a cabo la obtención de protoplastos.*

Los protoplastos han sido de gran utilidad en estudios de cultivo de tejidos así como también en la aplicación de técnicas de fusión para producir híbridos somáticos, inserción de ADN foraneo en células, estudios de genomas satélites e interacción con fitopatógenos.

8.1 Aislamiento y multiplicación de los protoplastos

Tejido vegetal

A pesar de haberse aislado de una gran variedad de células provenientes de tejidos de hojas, pecíolos, meristemos apicales, raíces, frutos, coleóptilos, tallos, embriones, microsporas, callo y suspensiones celulares de un gran número de especies; las evaluaciones realizadas permiten afirmar que el mejor tejido para la extracción de protoplastos lo constituye el mesófilo de hojas expandidas de plantas jóvenes y cultivos in vitro compuestos por células friables, ya que en estos las células no se encuentran fusionadas, permitiendo una mayor penetración y funcionamiento de las enzimas.

Las hojas seleccionadas para extraer los protoplastos deben ser esterilizadas superficialmente, la sección abaxial (envés) de la epidermis debe ser removida y posteriormente la lamina foliar debe seccionarse en pequeñas laminas. Cuando se utilizan callos o cultivos embriogénicos se deben seleccionar tejidos jóvenes, friables y sin alto contenido de humedad, lo que ha demostrado favorecer mejores rendimientos (Rahmani et al., 2016).

Remoción de la pared celular

La pared celular está constituida por celulosa, hemicelulosa y pectinas. De acuerdo con esta composición, existen dos tipos de enzimas que son utilizadas para obtener los protoplastos; la celulasa, aislada comercialmente de los hongos *Trichoderma reesei* y *T. viride*, la cual se encarga de digerir las capas de celulosa y hemicelulosa, y la pectinasa, aislada de hongos del género *Rhizopus*, que específicamente actúa degradando las pectinas (Litz et al., 2007).

Durante el proceso de digestión enzimática, las pectinasas y celulasas pueden aplicarse de forma individual para digerir primero la lámina media (pectinas) y posteriormente degradar la pared celular (celulasa), respectivamente. Sin embargo, usualmente ambas

enzimas se aplican de forma simultanea, lo cual reduce el tiempo, el número de manipulaciones y los riesgos de contaminación.

Potencial osmótico

Además de actuar como una barrera física, la pared celular funciona también como una cubierta que mantiene el protoplasma celular confinado en un determinado espacio. Los protoplastos separados de su pared celular pueden aumentar su tamaño causando la ruptura de la membrana celular y la pérdida del contenido citoplasmático. Para contrarrestar esta situación, la presión ejercida por la pared celular debe ser reemplazada con una adecuada presión osmótica en el medio.

La disminución del potencial osmótico del medio puede obtenerse mediante la adición de diferentes compuestos, entre los que se incluyen los carbohidratos tales como manitol, sorbitol, glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa; sales como cloruro de potasio, cloruro de calcio y sulfato de magnesio. El uso de uno u otro regulador del potencial osmótico va a depender de las evaluaciones previas, observándose que en algunas especies el manitol y el sorbitol son los más utilizados en la etapa de aislamiento. En la etapa de multiplicación se dice que es conveniente utilizar una combinación de compuestos metabólicamente inactivos (manitol) con aquellos activos como la sacarosa, debido a que esta última puede ayudar a un mejor crecimiento y adaptación de las células (Chawla, 2003).

Separación de los protoplastos

Para proceder a la separación los protoplastos del resto de los componentes del tejido vegetal, se debe preparar una solución compuesta por sales (CaCl_2 , KH_2PO_4 , MgCl_2), las enzimas diluidas de acuerdo con las especificaciones del fabricante, un regulador de pH, el medio de cultivo donde se van a cultivar los protoplastos y el regulador del potencial osmótico.

Una porción del tejido vegetal (aproximadamente 100 mg) se coloca en un recipiente (caja de Petri 50 x 12 mm) conteniendo 10 ml de la

solución enzimática. La mezcla debe almacenarse en la oscuridad con agitación lenta (50 rpm) por un tiempo variable (3 - 20 horas) que va a depender de la especie y el tejido utilizado. Una vez transcurrido el tiempo de digestión de la pared celular, la mezcla debe someterse a varios ciclos continuos enjuague, centrifugación y decantación, utilizando la misma solución, sin la presencia de las enzimas, para separarlos de los residuos de los tejidos.

Densidad y cultivo

La densidad de población de los protoplastos en el medio afecta de forma directa la supervivencia y capacidad de multiplicación de las células. Las evaluaciones realizadas han calculado que las densidades ideales deben estar entre 5×10^3 y 5×10^6 protoplastos ml^{-1} (Szabados, 1986; Chawla, 2003).

Los protoplastos pueden cultivarse en medios líquidos o semi sólidos. En algunos casos se puede alternar la consistencia del medio, utilizando un medio líquido para permitir el desarrollo de la pared celular y la posterior transferencia a un medio semisólido para la proliferación de las células. Cuando se utiliza medio líquido, lo más adecuado es colocar gotas (50 a 250 μL) de la suspensión en cajas de Petri; estas pueden ser colocadas sobre una fina capa de medio semi sólido. Para el cultivo en medio semi sólido es conveniente mezclar la suspensión de protoplastos con capas de medio de cultivo que no hayan alcanzado a solidificar completamente. Tanto en medio líquido como en medio semisólido, los cultivos deben ser colocados en condiciones de completa oscuridad, ya que la incidencia de luz ocasiona la muerte de los protoplastos.

Formación de la pared celular y recuperación de plantas

Una vez aislados, el proceso de regeneración de la pared celular es relativamente rápido. La pared celular primaria comienza a formarse en los protoplastos después de las primeras 8 a 24 horas de cultivo, y se completa en un período de varios días, ocurriendo de forma simultánea un aumento del volumen celular.

La división celular se inicia en la primera semana de cultivo y entre la primera y tercera semana comienzan a observarse a simple vista las primeras colonias de células. Tan pronto como las primeras colonias se hacen visibles, el medio debe ser modificado eliminando el regulador osmótico, a lo que los protoplastos responden con un crecimiento acelerado.

La vía morfogénica a seguir, organogénesis o embriogénesis somática, va a depender del tejido calloso o embriogénico que se forme, el cual a su vez depende de las condiciones que se suministren en el medio de cultivo.

8.2. Aplicaciones del aislamiento y cultivo de protoplastos

El aislamiento y cultivo de protoplastos no es utilizado como una técnica de producción masiva de plantas debido a su baja eficiencia numérica y riesgos de variación somaclonal en las plantas recuperadas; esto se debe a que necesariamente deben ser regeneradas mediante organogénesis indirecta o embriogénesis somática indirecta, procesos morfogénicos que implican altas probabilidades de variación genética.

Sin embargo, el aislamiento y cultivo de protoplastos facilita la producción de híbridos somáticos, los cuales pueden resultar de la fusión de protoplastos aislados de dos plantas diferentes y el posterior desarrollo de esta fusión en forma de una planta híbrida. La ventaja de la técnica de hibridación somática es la posibilidad de eliminar las barreras taxonómicas que impiden la hibridación sexual de plantas sistemáticamente distanciadas, actuando como un método de manipulación genética al nivel celular (Aleza et al., 2016).

Adicionalmente, los protoplastos favorecen la aplicación de técnicas de mejoramiento genético alternativo, tales como la inserción de ADN foraneo a través de la membrana celular. Uno de estos procedimientos consiste en provocar la formación de poros

reversibles en la mebrana celular con la aplicación de shocks eléctricos conocido como electroporación. Otra forma es mediante el tratamiento con sustancias químicas que permiten un relajamiento de la membrana celular para facilitar la introducción de agentes externos. Ambas técnicas han sido utilizadas en la producción de plantas genéticamente modificadas (Zhao et al., 2016; Giri y Praveena, 2015).

9. SELECCIÓN IN VITRO

En muchas especies vegetales los procesos de mejoramiento genético se fundamentan en la selección de nuevos genotipos a partir de una población de plantas variantes originada mediante procesos de polinización y fertilización entre individuos de una misma especie o compatibles genéticamente. Otras especies vegetales tienen características especiales, como por ejemplo largos ciclos para producir semillas, altos niveles de variabilidad genética o sencillamente ausencia de producción de semilla viable, que dificulta la aplicación de las técnicas tradicionales de mejoramiento y obliga a la búsqueda de métodos no convencionales para generar variabilidad genética.

Una fuente alterna de variación genética es la denominada variación somaclonal, la cual corresponde a los cambios que se observan en plantas que han sido regeneradas a partir de tejidos somáticos cultivados en condiciones in vitro, y que son atribuidas a la interacción de las condiciones ambientales del cultivo in vitro con el genotipo (Bairu et al., 2011).

9.1 Selección in vitro de variantes somaclonales

Aunque la aparición de variantes somaclonales es considerada una desventaja en la micropropagación comercial debido a la pérdida de fidelidad en el proceso, dentro de los procesos de mejoramiento genético por métodos no convencionales ha sido de gran utilidad para la generación de variabilidad genética y posteriores procesos de selección.

La frecuencia de aparición de variantes en plantas cultivadas en condiciones in vitro puede cambiar de acuerdo con el explante o tejido que se utilice, el genotipo, las condiciones del medio y la vía morfogénica que se aplique para la regeneración de las plantas.

Las variaciones somaclonales pueden ser de dos tipos: epigenéticas y genéticas. En las primeras, los cambios que ocurren en el material vegetal son el resultado del ajuste morfológico de las células y tejidos a las condiciones ambientales del cultivo in vitro sin afectar la constitución genética y por tanto la heredabilidad de la característica alterada; en estos casos los cambios son de poca utilidad debido a que una vez cambian las condiciones del cultivo in vitro o cuando las plantas son colocadas en condiciones normales de campo, la alteración observada desaparece y la condición de la planta regresa a su estado original (Us-Camas et al., 2014).

Las variables somaclonales de tipo genético son aquellas cuyas causas se encuentran en cambios en la constitución genética de las células que dan origen a las nuevas plantas y en consecuencia los mismos se fijan en el genotipo y son heredables, por tanto son los de mayor interés y aplicabilidad en los procesos de mejoramiento genético. Dentro de los cambios que pueden alterar la estructura genética original de las células están los cambios en el cariotipo, alteraciones de la estructura cromosomal, mutaciones en uno o varios nucleótidos de la secuencia de un gen y cambios en los genomas satélites de la célula como las mitocondrias y los cloroplastos (Naik et al., 2017; Begheyne et al., 2017; Halim et al., 2018).

Selección in vitro permisiva

La selección de variantes somaclonales por medio de este método tiene lugar cuando de los procesos normales de micropropagación resultan plantas con alteraciones fácilmente detectables en su fenotipo.

La ocurrencia de variaciones es un riesgo presente en cualquiera de los métodos de micropropagación vegetal; sin embargo, la micropropagación a partir de organogénesis y embriogénesis somática, por la vía indirecta, tienen mayores probabilidades de producir variantes somaclonales, debido al uso de reguladores de crecimiento que han sido correlacionado con alteraciones en el ADN y la multiplicación celular acelerada que los caracteriza (Gao et al., 2009; Carloni et al., 2017).

La inducción de formación de callo y la posterior regeneración de plantas, al igual que la recuperación de plantas a partir de embriones desarrollados del cultivo de masas proembriogénicas, constituyen mecanismos que pueden ser utilizados como posibles técnicas de generación y selección de plantas variantes. Posteriormente a la selección, las plantas recuperadas deben ser evaluadas para determinar la presencia de alguna variación y los posibles efectos de esta de acuerdo con la condición dominante o recesiva del gen que controla una determinada característica (Shen et al., 2007).

La principal limitante del método permisivo de selección in vitro es que requiere de un largo período para observar la posible variación generada, se debe completar todo el proceso antes de realizar cualquier evaluación y no se garantiza ningún resultado.

Selección dirigida

Por medio de este método de selección in vitro se procede con la inducción de tejido de callo o masas proembriogénicas que se utilizan para iniciar suspensiones celulares; sobre estas se ejerce una determinada presión mediante el cocultivo con un agente o en presencia de una condición específica. Este agente, o condición, permitirá efectuar una selección entre aquellas células que tengan la capacidad de adaptarse y proliferar en el ambiente modificado y aquellas que no lo toleran.

De acuerdo con el agente de selección que se utilice, la selección in vitro puede direccionarse para generar tolerancia o resistencia a estreses bióticos o abióticos. Los agentes de selección más comunes son antibióticos, aminoácidos, patotoxinas, filtrados de agentes infecciosos, herbicidas y condiciones ambientales alteradas. Independientemente del tipo de agente, las evaluaciones previas para la aplicación del proceso deben permitir determinar las dosis o niveles letales medios (LD_{50}) de las células a seleccionar; una vez determinada, se procede a ejercer la presión sobre la población celular por varios ciclos de cultivo, hasta que aquellas que sobrevivan desarrollen una curva de crecimiento típica de un cultivo en suspensión celular (Salgado, 2011).

Las células o tejidos adaptados son inducidos a continuar el proceso morfogénico de regeneración de plantas. Si la condición observada in vitro persiste en las plantas regeneradas, estas son seleccionadas para ser micropropagadas o para ser introducidas en un programa de mejoramiento genético.

La ventaja de la selección de variantes somaclonales por el método dirigido es que debido a la presión previa, al llegar al final del proceso ya se tienen plantas que han sido preseleccionadas con respecto a una característica específica; sin embargo, por esta vía el proceso tiende a ser más demorado y el mayor número de ciclos de cultivo en condiciones in vitro tiende a disminuir la capacidad de regenerar plantas a partir de los tejidos cultivados.

Algunas características agronómicas que han sido mejoradas mediante la selección de variantes en condiciones in vitro son resistencia a antracnosis causada por *Botrytis cinerea* en uva (*Vitis vinífera* L.) (Jayansakar et al., 2000), resistencia de genotipos de trigo a bajas temperaturas (Lazar et al., 1988), tolerancia a estrés salino y altos niveles de aluminio en arroz, alfalfa, zanahoria, sorgo, tomate y tabaco (Mandal et al., 1999), resistencia a estrés por sequía en pastos (Lu et al., 2009).

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta C. 2011. Propagación in vitro de árboles superiores de melina (*Gmelina arbórea* Robx.). Tesis M. Sc. Universidad de Córdoba, Montería.
- Acosta C, Suárez I y Gatti K. 2013. In vitro multiplication of *Gmelina arbórea* Robx. Adult trees. *UDCA Actualidad y Divulgación Científica* 16(1):97-102
- Agrios G. 2005. Plant Pathology. Elsevier, New York, p618-620, p689-690.
- Aleza P, Garcia-Lor A, Juárez J y Navarro L. 2016. Recovery of citrus cybrid plants with diverse mitochondrial and chloroplastic genome combinations by protoplast fusion followed by in vitro shoot, root, or embryo micrografting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 126: 205-217.
- Ammirato P. 1974. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). *Botanical Gazette* 135:328-337.
- Arditi J. 2008. Micropropagation of Orchids. Blackwell Publishing, Malden, p10-11.
- Ávila, M. 2004. Eficiencia del hipoclorito de sodio como desinfectante superficial en segmentos nodales de roble (*Tabebuia rosea*), cedro (*Cedrela odorata*) y abarco (*Cariniana pyriformis*) a nivel in vitro. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Córdoba, Montería.
- Bairu M, Aremu A y Van Staden J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63(2):147-173.
- Ball E. 1946. Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. *American Journal of Botany* 33:301-318.
- Begheyn R, Roulund N, Vangsgaard K, Kopecký D y Studer B. 2017. Inheritance patterns of the response to in vitro doubled haploid induction in perennial ryegrass

- (*Lolium perenne* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 130: 667-679.
- Bewley J y Black M. 1994. *Seeds Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York, p35-110; 377-416.
- Broetjes C y Keen A. 1980. Adventitious shoots: Do they develop from one cell?. *Euphytica* 29:13-87.
- Caplin S y Steward F. 1948. Effect of coconut milk on the growth explants from carrot root. *Science* 108:655.
- Carlile M, Watkinson S y Gooday G. 2001. *The Fungi*. Academic Press, Londres, 565p.
- Carloni E, Tommasino E, López C, Ribotta A, Quiroga M, Griffa S y Grumberg K. 2017. In vitro selection and characterization of buffelgrass somaclones with different responses to water stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 130: 265-277.
- Carmona O. 2017. Microtuberización en la especie *Dioscorea rotundata* cultivar botón. Tesis M. Sc. Biotecnología, Universidad de Córdoba, 70p.
- Cassells A. 1991. Problems in tissue culture contaminants. En: Debergh P y Zimmermann R (Ed) *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic, Dordrecht, p31-45.
- Chawla H. 2003. *Introduction to Plant Biotechnology*. Science Publisher, Enfield, p1-134, 87-109.
- Christianson M y Warnik D. 1988. Organogénesis in vitro as a developmental process. *HortScience* 23:215.
- Christianson M y Warnik D. 1983. Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. *Developmental Biology* 95:288-293.
- Christianson M y Warnik D. 1985. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis in vitro. *Developmental Biology* 112:494.
- Davies P. The plant hormones: Their nature, occurrence and function. En: Davis J. (ED) *Plant Hormones, Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Springer, Dordrecht, p1-15.

- Debergh P y Maene L. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* 14:335-345.
- Díaz L. 2017. Micropropagación de ñame espino (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivar Botón en sistema de cultivo doble fase. Tesis M. Sc. Biotecnología, Universidad de Córdoba, Departamento de Química, Montería.
- Dodeman V, Ducreux G y Kreis M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48(313):1493-1509.
- Efendi D y Litz R. 2003. Cryopreservation of avocado. *Proceedings V World Avocado Congress*, Valencia, España.
- Efendi D. 2003. Transformation and cryopreservation of embryogenic avocado (*Persea americana* Mill.) cultures. Tesis Ph.D., University of Florida, Gainesville.
- Engelmann F. 1998. In vitro germplasm conservation. *Acta Horticulturae* 461:41-48.
- Feher A, Pasternak T y Dudits D. 2003. Transition of somatic cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:201-228.
- Gamborg O y Shyluk J. 1981. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. En: Thorpe T (Ed): *Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, New York, p21-44.
- Gamborg O, Miller R y Ojima K. 1968. Plant cell cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Gamborg O, Murashige T, Thorpe T y Vasil I. 1976. Plant tissue culture media. *In Vitro* 12(7):473-478.
- Gao D, Vallejo V, He B, Gai Y y Sun L. 2009. Detection of DNA changes in somaclonal mutants of rice using SSR markers and transposon display. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98:187-196.
- Gautheret R. 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de Carotte. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* 208:118-130.

- Gautheret R. 1985. History of plant tissue culture: A personal account. En: Vasil I (Ed) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press, New York, p18-35.
- González-Benito M, Clavero-Ramírez I y López-Aranda J. 2004. Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2(3):341-351.
- Giri C y Praveena M. 2015. In vitro regeneration, somatic hybridization and genetic transformation studies: an appraisal on biotechnological interventions in grasses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 843-860.
- González F. 2012. Embriogénesis somática y organogénesis en caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) Tesis M. Sc. Biotecnología, Universidad de Córdoba, Departamento de Química, Montería.
- Guevara Y, Suárez I y Salgado J. 2012. Inducción y proliferación in vitro de tejidos celulares de bata (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) en medio con 2,4-D. *Temas Agrarios* 17(2):9-17.
- Gray D. 1996. Nonzygotic embryogenesis. En: Gray D y Trigiano R (Ed) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Ratón, p133-147.
- Grondeau C y Samson R. 1994. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, specially seed from bacteria. *Critical Review of Plant Science* 13:57-75.
- Gugerli P. 1992. Commercialization of serological tests for plant viruses. En: Duncan J y Torrance L (Ed) *Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens*. Blackwell Scientific, Boston. 269p.
- Haberlandt G. 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitz. Akad. Wiss. Wien* 111:69-92.
- Haccius B. 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28(1):74-81.
- Halim N, Tan B, Midin R, Madon M y Khalid N. 2018. Absciscic acid and salinity stress induced somaclonal variation and increased histone deacetylase

(HDAC) activity in *Ananas comosus* var. MD2. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 133:123-35.

Horts R y Klopmeier M. 1993. Controlling viral diseases. En: White J (Ed) *Geraniums* IV. Ball Publishing, Geneve, p289-292.

Jayasankar S, Zhijian L y Gray D. 2000. In vitro selection of *Vitis vinifera* "Chardonnay" with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. *Planta* 211:200-208.

Kane M. 1996. Micropropagation from pre-existing meristems, En: Gray D y Trigiano R (Ed) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Ratón, p75-86.

Klercker J. 1982. Eine methode zur isolierung lebender protoplasten. *Ofvers Vetensk-Akad Förh Stokh* 9:463-475.

Klopmeier M. 1996. Indexing for plant pathogens. En: Trigiano R y Gray D (Ed) *Plant Tissue Cultures Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Raton, p341-349.

Kotte W. 1922. Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen. *Beitrage zur Allgemeinen Botanik* 2: 413-434.

Kyte L y Kleyn J. 2003. *Plants from Test Tubes. An Introduction to Micropropagation*. Timber Press Portland, p90-100.

Lazar M, Chen T, Gusta L y Kartha K. 1998. Somaclonal variation for freezing tolerance in a population derived from norstar winter wheat . *Theoretical and Applied Genetics* 75:480-484.

Litz R y Gray D. 1992. Organogénesis and somatic embryogenesis. En: Hamerschlag F y Litz R (Ed) *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. CAB International, Wallingford, p3-34.

Litz R y Gray D. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:416-425.

Litz R, Raharjo S y Gómez-Lim M. 2007. Avocado. En: Nagata T, Lorz H y Widholm J (Ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 60 Transgenic Crops V. Springer-Verlag, Berlin, p170-189.

- Lloyd G y MaCown B. 1980 Commercially feasible micropropagation of mountain laural (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of International Societies* 30:421-427.
- López C. 2017. Micropropagación de tres variedades de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). Tesis M. Sc. Biotecnología, Universidad de Córdoba, Departamento de Química, Montería.
- Lu S, Chen Ch, Wang Z, Guo Z y Li H. 2009. Physiological responses of somaclonal variants of triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* × *Cynodon dactylon*) to drought stress. *Plant Cell Reports* 28(3):517-526.
- Maheshwari P y Rangaswamy N. 1958. Polyembryony and in vitro culture of *Citrus* and *Mangifera*. *Indian Journal of Horticulture* 15:275-282.
- Malice M y Baudoin J. 2009. Genetic diversity and germplasm conservation of three minor Andean tuber crop species. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 13(3):441-448.
- Mandal A, Pramanik S, Chowdhury B y Bandyopadhyay A. 1999. Salt-tolerant Pokkali somaclones: performance under normal and saline soils in Bay Islands. *Field Crops Research* 61(1):13-21.
- Marcotrigiano M y Gouin F. 1984. Experimentally synthesized plant chimeras 1. In vitro recovery of *Nicotiana tabacum* L. chimeras from mixed callus culture. *Annals of Botany* 54:503-511.
- Matthews R. 1981. Plant Virology. Academic Press, New York, 916p.
- Miller C, Skoog F, von Saltza M y Strong, M. 1995. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of American Chemical Society* 77:1329-1334.
- Miller C. 1961. A kinetin-like compound in maize. *Proceedings National Academy of Sciences* 47:170-174.
- Morel G. 1963. La culture in vitro du méristème apical de certaines Orchidées. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 256:4955-4957.

- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25:135-166.
- Naik N, Rout P, Umakanta N, Verma R, Katara J, Sahoo K O y Samantaray S. 2017. Development of doubled haploids from an elite indica rice hybrid (BS6444G) using anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128:679-689.
- Nitsch J y Nitsch C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87.
- Nobecourt P. 1938. Sur les proliférations spontanées de fragments de tubercules de Carotte et leur culture sur milieu synthétique. *Bulletin de la Société Botanique de France* 85:1-7.
- Nover L, Kranz E y Scharcf K. 1982. Growth cycle of suspension cultures of *Lycopersicum sculentum* and *L. peruvianum*. *Biochemistry and Physiology Pflanzen* 177:483-499.
- Ogleeve-O'Donovan W. 1993. Culture indexing for vascular wilts and viruses. En: White J (Ed) *Geraniums IV*. Ball Publishing, Geneve, p227-286.
- Pastrana I y Suárez I. 2009. Producción de plantas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) "Criolla" a través de micropropagación. *Temas Agrarios* 14:5-13.
- Petit A, Delhay S, Tempe' J y Morel G. 1970. Reserches sur les guanidines des tisues de crown gall. Mise en evidence d'une relation biochemique specifique entre les souches d'*Ágrobacterium tumefaciens* et les tumores quélles induisent. *Physiology Vegetable* 8:205-213.
- Polanco H. 2017. Inducción de embriones somáticos en la especie *Dioscorea rotundata* Poir. Cultivares alemán y Botón. Tesis M. Sc. Biotecnología, Departamento de Química, Montería.
- Polo J. 2011. Micropropagación de teca (*Tectona grandis*) a partir de meristemos pre-existentes. Tesis M. Sc. Universidad de Córdoba, Montería.
- Polo J, Suárez I y Gatti K. 2013. Micropropagación de *Tectona grandis* L. F. a partir de meristemos pre-existentes. *Temas Agrarios* 18(2):83-93

- Quintero I, Polo J, Jarma A y Espitia A. 2003. Enraizamiento in vitro de *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5(2):41-51.
- Raharjo S y Litz R. 2008. Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. *In Vitro and Cellular Development Biology-Plant* 44:254-262.
- Rahmani M, Pijut P y Shabanian, N. 2016. Protoplast isolation and genetically true-to-type plant regeneration from leaf- and callus-derived protoplasts of *Albizia julibrissin*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127:475-488.
- Robbins W. 1922. Cultivation of excised root-tips and stem tips under sterile conditions. *Botanical Gazette* 73: 376-390.
- Roca W, Arias D y Chávez R. 1993. Métodos de conservación in vitro de germoplasma En: Roca W y Mroginski L (Ed) Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, 697-714.
- Salgado J. 2011. Estudio in vitro de tejidos embriogénicos de ñame (*Dioscorea alata* var. Pico botella) en presencia de filtrado del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Tesis M. Sc. Biotecnología, Universidad de Córdoba, Montería.
- Salgado J y Suárez I. 2012. Respuesta de tejidos embriogénicos de ñame (*Dioscorea alata* Var Pico Botella) A *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Temas Agrarios* 17(1):9-19
- Sarkar D y Naik P. 1998. Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) clones by vitrification. *Annals of Botany* 82(4): 455-461.
- Sauerweine M, Yoshimatsu K y Shimomoura K. 1992. Further approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue culture. *Plant Tissue Cultures Letters* 9(1):1-9.
- Schleiden M. 1838. Beitrage zur Phytogenesis. *Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medicin*:137-176.
- Schnell R, Kuhn D, Olano C y Quintanilla W. 2001. Sequence diversity among avocado sunblotch viroids isolated from single avocado trees. *Phytoparasitica* 29: 451-460.

- Schwann T. 1839. Mikroskopische Untersuchungen fiber die tJbereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen. Nr. 170: Oswalds Berlin.
- Schwarz O y Beaty R. 1996. Propagation from nonmeristematic tissues-organogenesis. En: Gray D y Trigiano R (Ed) Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press, Boca Ratón, p95-104.
- Shen X, Chen J, Kane M y Henny R. 2007. Assessment of somaclonal variation in *Dieffenbachia* plants regenerated through indirect shoot organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91:21-27.
- Singha S, Bissonette G y Double M. 1987. Methods for sterilizing instruments contaminated with *Bacillus* sp. from plant tissue cultures. *HortScience* 22:659.
- Singha S. 1984. Influence of two commercial agars on in vitro shoot proliferation of 'Almey' crabapple and 'Seckel' pear. *HortScience* 19(2):227-228.
- Skoog F y Miller C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposium Society Experimental Biology No. 11. The Biological Action of Growth Substances* 118-131.
- Skoog F y Tsui C. 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. *American Journal of Botany* 35:782-787.
- Stevenson F. 1956. The behavior of *Citrus* tissues and embryos in vitro. Ph. D. Dissertation, University of Michigan, Ann Arbor.
- Steward F, Mapes M y Mears K. 1958. Growth and development of cultured cells 2. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* 45:702-708.
- Street H. 1977. Applications of cell suspension cultures. En: Reinert J y Bajaj P (Ed) Applied and Fundamentals Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin, p649-667.
- Suárez I. 2003. Avocado sunblotch viroid (ASBvd) in cell and tissue cultures of avocado (*Persea americana* Mill.). Tesis Ph. D., University of Florida, Gainesville.

- Suárez I y Jaraba J. 2004. Viroides: El otro tipo de fitopatógenos. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica* 7(2):33-41.
- Suárez I, Litz R y Jaraba J. 2004. Embriogénesis somática en tres cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.). *Temas Agrarios* 9(2):32-41.
- Suárez I, Schnell R, Khun D y Litz R. 2005. Micrografting of ASBVd-infected avocado plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80:179-185.
- Suárez I, Espitia M y Pertuz I. 2006. Efecto de auxinas y citocininas en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Fitotecnia Colombiana* 6(2):1-8.
- Suárez I, Jarma A y Avila M. 2006. Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (*Tabebuia rosea*). *Temas Agrarios* 11(2):46-52.
- Suárez I, Schnell R, Khun D y Litz R. 2006. Recovery and indexing of avocado plants (*Persea americana*) from embryogenic nucellar cultures of an avocado sunblotch viroid-infected tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84:27-37.
- Suárez I y Salgado J. 2008. Propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* Bert. (Asteraceae-Eupatoriae) a través de organogénesis. *Temas Agrarios* 13(1):33-40.
- Suárez I. 2008. Caracterización molecular, propagación y conservación in vitro de la caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) del Caribe colombiano. División de Investigación, Universidad de Córdoba, Montería, 45p.
- Suárez I, Araméndiz H y Pastrana I. 2009. Micropropagación de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín* 62(2):5135-5143.
- Suárez I y Quintero I. 2011. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural. *VIII Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal*, Ciego de Ávila, Cuba.
- Suárez I, Torres L y Litz R. 2011. Somatic embryogenesis in yam (*Dioscorea rotundata*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín* 64(2):6037-6042.

- Suárez I. 2011. Reguladores de Crecimiento Vegetal en el Cultivo de Tejidos In Vitro. *XLI Congreso Anual COMALFI*, Ibagué 21-23 septiembre, p91-94.
- Suárez I, Rivera H y Pastrana I. 2012. Biotecnología aplicada a la caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) . Fondo Editorial Universidad de Córdoba, Montería.
- Suárez I y Quintero I. 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural, a través de explantes con meristemos pre-existentes. *Revista Colombiana de Biotecnología* 16(1):29-33.
- Suárez I y Otero R. 2016. Ácido abscísico y sacarosa afectan la producción in vitro de túberos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Temas Agrarios* 21(1):9-17
- Suárez I, Ortiz O y López C. 2017. Arrow cane (*Gynerium sagittatum* Aubl.) in vitro rhizome formation and plantlet recovery. *Temas Agrarios* 22(1):9-18
- Szabados L, Mroginski L y Roca W. 1993. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicación. En: Roca W y Mroginski L (Ed) Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, p173-210.
- Szabados L y Roca W. 1986. Plant regeneration from isolated mesophyll and cell suspension protoplasts of *Stylosanthes guianensis*. *Plant Cell Reports* 5: 174177
- Torres L. 2011. Micropropagación de acacia (*Acacia mangium* Willd.). Tesis M. Sc. Biotecnología, Universidad de Córdoba, Montería.
- Torres L, Suárez I y Gatti K. 2013. Propagación in vitro de *Acacia mangium* Willd. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 11(1):78-85
- Us-Camas R, Rivera-Solís G, Duarte-Aké F y De La Peña C. 2014. In vitro culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118:187-201.
- Varghese D, Berjak P y Pammenter N. 2008. Alternate explants for germplasm cryopreservation of recalcitrant-seeded species: Problems and perspectives. *South African Journal of Botany* 74(2):391-392.
- Vasil I y Hildebrandt C. 1965. Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in microcultures. *Science* 150:889-890.

- Villalobos V y Thorpe T. 1993. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados, En: Roca W Mroginski L (Ed) Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, p127-142.
- White P. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root-tips in a liquid medium. *Plant Physiology* 9:585-600.
- White P. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. *American Journal of Botany* 26: 59-64.
- Wickson M y Thimann K. 1958. The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. *Physiologia Plantarum* 11:62-74.
- Witjaksono y Litz R. 1999a. Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59:19-29.
- Witjaksono, Litz R. 1999b. Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58:141-148.
- Zhao F, Li Y, Hu Y, Gao Y, Zang X, Ding Q, Wang Y y Wen Y. 2016. A highly efficient grapevine mesophyll protoplast system for transient gene expression and the study of disease resistance proteins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 125:43-57
- Zimmerman L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411-1423.

