

Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro

Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro

Margarita Perea

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Sede Bogotá

vi, 284 p. : 3 il.
ISBN 958-701-372-7
QA241.

1. Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro
Margarita Perea

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES IN VITRO, ????A. EDICIÓN.
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
Facultad de Ciencias, 2009

ISBN: 958-701-372-7
Primera reimpresión, 2010

Impresión:
Proceditor Ltda.
Bogotá, D. C.
COLOMBIA

Presentación

El *manual cultivo de tejidos vegetales in vitro* constituye el compendio de resultados de más de un cuarto de siglo de labores investigativas y experiencias generadas sobre el desarrollo de los sistemas in vitro en diferentes especies vegetales. Se presentan los protocolos inherentes a los cultivos celulares, regeneración de plantas, mejoramiento genético y metabolitos secundarios, con el fin de dar al lector mayor claridad para una interpretación lógica del desarrollo de los cultivos *in vitro* sobre los tópicos tratados.

En cada protocolo se estudian los conceptos básicos y sus aplicaciones, como la producción de plantas libres de patógenos mediante el cultivo de meristemos y la propagación rápida de nuevas variedades, el cultivo de células, protoplastos y polen, generando la posibilidad de producción de plantas superiores así como también la transferencia de genes que contribuyen al mejoramiento de nuestras especies.

Las ilustraciones constituyen parte importante de esta publicación y han sido obtenidas en el Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Incluimos, además, el glosario de términos con el propósito de presentar mayor información sobre el tema, puesto que se han producido avances de enorme importancia para la agricultura, la silvicultura y la industria.

El presente manual de prácticas cultivo de tejidos vegetales es útil a los estudiantes universitarios de carreras afines a las Ciencias Biológicas, Maestría, Doctorado y para los científicos especializados que trabajen en estas disciplinas. El enfoque de esta publicación consigna las experiencias técnico-científicas que de manera generosa contribuyen a la formación de profesionales en Colombia y Latinoamérica.

Agradecemos a las directivas del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Universidad Nacional de Colombia el haberlos permitido desarrollar las investigaciones consignadas en esta publicación. El aporte de los trabajos realizados por estudiantes de pregrado y posgrado, así como también la contribución y las valiosas interacciones con los estudiantes y profesionales durante el desarrollo de este trabajo, son bien reconocidas. Para todos ellos, nuestros sentimientos de gratitud.

ANDREA TIRADO PEREA
MARGARITA PEREA DALLOS

Índice general

Presentación	v
1. Origen, Evolución y Desarrollo de Los Sistemas <i>in vitro</i>	1
2. Cultivo de Células y Tejidos Vegetales	7
3. Sección del Explante	11
3.1. Composición y preparación del medio de cultivo	12
3.1.1. Macronutrientes	12
3.1.2. Micronutrientes	13
3.1.3. Vitaminas	14
3.1.4. Carbohidratos	15
3.1.5. Agentes gelificantes	15
3.2. Reguladores de crecimiento	16

3.2.1.	Auxinas	16
3.2.2.	Citoquininas	18
3.2.3.	Giberelinas	19
3.2.4.	Etileno	20
3.2.5.	Poliaminas	21
3.2.6.	Brasinoesteroides	21
3.2.7.	Ácido jasmónico	22
3.2.8.	Antioxidantes	22
3.3.	Sistemas de propagación clonal	23
3.4.	Cultivo de meristemos	26
3.4.1.	Tomate de árbol (<i>Solanum betacea</i>)	29
3.4.2.	Bananos y plátanos (<i>Musa spp</i>)	31
3.4.3.	Crisantemo (<i>Dendrathema morifolium</i>)	33
3.5.	Cultivo de segmentos nodales	35
3.6.	Dicotiledóneas	36
3.6.1.	Lulo (<i>Solanum quitoense</i>)	36
3.6.2.	Guanábana (<i>Annona Muricata L</i>)	38
3.6.3.	Tomate de árbol (<i>Solanum betacea</i>)	40
3.6.4.	Yuca (<i>Manihot esculenta L.</i>)	41
3.6.5.	Papa Criolla (<i>Solanum phureja</i>)	43
3.6.6.	Remolacha azucarera (<i>Beta vulgaris</i>)	45
3.7.	Monocotiledóneas	47
3.7.1.	Piña (<i>Ananas comosus</i>)	48

3.7.2. Gerbera (<i>Gerbera jamesonii</i>)	49
3.7.3. Orquídeas (<i>Catleya trianae</i>)	51
3.7.4. Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>)	53
3.7.5. Sábila (<i>Aloe Vera</i>)	55
3.7.6. Ñame (<i>Dioscorea alata</i>)	57
3.7.7. Cactus (<i>Mammillaria elongata</i>)	59
3.8. Organogénesis	61
3.9. Organogénesis directa	62
3.10. Rizogénesis	62
3.10.1. Uchuva (<i>Physalis peruviana L.</i>)	62
3.10.2. Pitahaya (<i>Hylocereus triangularis</i>)	64
3.11. Caulogénesis	66
3.11.1. Maracuyá (<i>Passiflora edulis var. flavicarpa</i>)	66
3.11.2. Violeta africana (<i>Saintpaulia ionantha</i>)	68
3.11.3. Melón (<i>Cucumis melo L.</i>)	70
3.12. Organogénesis indirecta	72
3.12.1. Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	72
3.12.2. Taco de reina (<i>Tropaeolum majus</i>)	74
3.13. Rizogénesis	76
3.13.1. Kiwi (<i>Actinidia chinensis</i>)	76
3.13.2. Maracuyá (<i>Passiflora edulis var. flavicarpa</i>)	78
3.14. Cultivo de callo	79
3.14.1. Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	80

3.14.2. Melón (<i>Cucumis melo L.</i>)	82
3.15. Embriogénesis somática	83
3.15.1. Sábila (<i>Aloe Vera</i>)	85
3.15.2. Orquídeas (<i>Epidendrum ruizianum</i>)	87
3.15.3. Mango (<i>Mangifera indica L.</i>)	88
3.16. Microtuberización	92
3.16.1. Ñame (<i>Dioscorea alata</i>)	92
3.16.2. Papa Var. Capiro (<i>Solanum Tuberosum</i>)	94
3.17. Rescate de embriones	95
3.17.1. Melón (<i>Cucumis melo L.</i>)	96
3.17.2. Papaya (<i>Carica papaya L.</i>)	97
3.17.3. Naranja (<i>Citrus sinensis L.</i>)	100
3.17.4. Orquídeas (<i>Cartleya trianae</i>)	102
3.18. Cultivo de anteras y polen	104
3.18.1. Bananos y plátanos (<i>Musa ssp</i>)	105
3.19. Cultivo de protoplastos	106
3.19.1. Rosa (<i>Rosa sp</i>)	108
3.19.2. Melón (<i>Cucumis melo L.</i>)	110
3.20. Transferencia de las plantas obtenidas <i>in vitro</i> y su adaptación a condiciones ambientales	111
3.21. Contaminación en cultivos de células y tejidos vegetales .	113
3.22. Certificación y sanidad de las plantas regeneradas a partir de meristemos	114
3.22.1. Termoterapia	114

3.22.2. Quimioterapia	115
3.22.3. Crioterapia	115
3.22.4. Diagnóstico y evaluación sanitaria	116
3.23. Requerimientos para establecer un laboratorio de cultivo de lejidos vegetales	119
3.23.1. Organización general	119
3.23.2. Preparación de medios	119
3.23.3. Lavado y esterilización	120
3.23.4. Área de siembra	120
3.23.5. Salas de incubación	120
3.23.6. Oficina	121
3.23.7. Equipos de laboratório	121
Glosario	125
Bibliografía	133
Anexos	140

CAPÍTULO 1

Origen, Evolución y Desarrollo de Los Sistemas *in vitro*

El concepto de cultivar células de plantas comenzó hace más de cien años cuando al dividir el bulbo de un jacinto (*Eichhorinia crassipes*) se producía una gran cantidad de células; la utopía de hacer crecer estas células y dividirlas era un difícil reto para cualquier científico (Haberlandt, 1902). Scheilden y Schwan, en 1838, lanzaron la teoría conocida como la totipotencia la cual establece que las células son autosuficientes y presentan la posibilidad de regenerar plantas completas. La idea de manipular plantas superiores con la facilidad y conveniencia de cultivar microorganismos fue observada por algunos científicos; desde entonces esta hipótesis fue el núcleo para el inicio y desarrollo de los cultivos de células y tejidos vegetales “*in vitro*”.

Los ensayos preliminares que incidieron en el establecimiento y desarrollo de los sistemas *in vitro* comienzan con los aportes de Sacks (1860) y Knops (1861) al observar que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sales inorgánicas. Posteriormente, el botánico Haberlandt (1898), en la Universidad de Graz (Austria), inició cultivos de células a

partir del mesfilo de células muy diferenciadas en *Tradescantia*, *Ornithogalum* y *Erithromium*. Algunos críticos le atribuyeron sus experimentos como fallidos, sin embargo, en 1902 publicó un trabajo y lanzó la hipótesis sobre la “totipotencia celular”, planteando como alternativa viable la obtención de nuevas plantas que, al suministrarles las condiciones apropiadas de nutrición y ambiente, ayudan a reorganizar su secuencia y desarrollo. Hanning, en 1904, logró el aislamiento de embriones inmaduros de crucíferas, más tarde Dietrich (1924) y Laibach (1925, 1929) mostraron la más importante aplicación práctica del cultivo de embriones en cruces interespecíficos, con cruzamientos de *Linum perenne* x *L. austriacum*, recuperando plantas normales. Durante el periodo 1907-1909, Harrison, Burrows y Carrel tuvieron éxito al cultivar *in vitro* tejido animal y humano.

Otro descubrimiento importante ocurrió en 1922 cuando Haberlandt y Kotte, en Alemania, cultivaron piezas de raíces de frijol y maíz; al mismo tiempo Robbins (1922), en la Universidad de Missouri en Norteamérica, logró desarrollar raíces de tomate y mantenerlas en cultivo durante varios meses. Publicó los resultados un poco antes de los trabajos de Kotte; ninguno de los dos sabía sobre sus investigaciones. Hoy en día a ambos investigadores se les reconoce como los pioneros en la obtención del desarrollo de raíces y mantenerlas en cultivo durante un tiempo prolongado.

Knudson, en 1922, estableció el medio de cultivo para la germinación asimbiótica de semillas de orquídea. El primer éxito en el cultivo de híbridos interespecíficos fue obtenido por Laibach con el cultivo de embriones producidos por cruces de *Linum perenne* y *Linum austriacum*. Gautheret, en 1934, realizó ensayos utilizando como explante el *cambium* de áboles y arbustos, sin obtener éxito, debido a que para la época aún no se habían descubierto las auxinas.

White (1939) en Estados Unidos, paralelamente con Nobcourt y Gautheret en Francia lograron el crecimiento indefinido de tejido de raíz; al mismo tiempo, observaron las callosidades en raíces de zanahoria y tabaco que, al ser aisladas a un medio de cultivo semisolido, evidenciaron el desarrollo progresivo de células sin diferenciar. Las denominaron callo (callus).

Van Oberbeek, Concklin y Blakeslee (1941) emplearon por primera vez el agua de coco para el cultivo de embriones en *Datura*. Folke Skoog, en 1944, obtiene los primeros cultivos de tabaco *in vitro* para estudiar

la formación de vástago adventicio. Ball (1946) reporta por primera vez la obtención de plantas completas a partir de pices caulinares de *Lupinus* y *Tropeaolum*.

Brown brillante científico del Instituto Rockefeller, es recordado como el pionero en los estudios de la enfermedad conocida como agallas de corona, causada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Estos trabajos allanaron la vía para transformación de plantas. En 1947, logró cultivar por primera vez tejido de agalla de corona, libre de la bacteria inductora, en un medio definido que contenía sacarosa y sales inorgánicas en ausencia de hormonas endógenas.

En 1948 La Rue cultiva gametofitos masculinos de *Zamia floridiana* demostrando que el polen podrá desarrollarse en un medio de cultivo adecuado. Ball, en 1950, obtuvo por primera vez la regeneración de órganos a partir de callos en *Sequoia sempervirens*.

Es importante esclarecer el término “meristemoide”, propuesto por Burning (1952) en Alemania como expresión inicial; no obstante Torrey, en 1966, en la Universidad de Harvard, consideró que en el inicio del desarrollo organizado: “cada clúster vegetal vivo capaz de generar estímulos puede dividirse en meristemoide potencialmente capaz y genéticamente apto para dividirse y desarrollarse como cualquier clúster y formar estructuras multicelulares”. Sin embargo, el término “meristemoide” es utilizado frecuentemente por numerosos investigadores en el contexto del cultivo de células y tejidos vegetales al referirse a la totipotencia de células o grupos de células.

En 1952, G. Morel y C. Martin demostraron que, en determinadas partes de la planta, los tejidos meristemáticos tienen la capacidad de desarrollar plantas completas en condiciones *in vitro*. La contribución más importante realizada por estos investigadores (1952–1955) fue la utilización del cultivo de meristemos en *Solanum tuberosum* y *Dahlia sp.* a partir de clones enfermos.

Tulecke, en 1953, obtuvo por primera vez callo haploide de *Ginkgo biloba* a partir de polen. En 1953 Watson, Crack y Wilkins establecieron la estructura molecular de la doble hélice del ácido desoxirribonucleico (ADN); por este trabajo, fueron galardonados con el premio Nobel en 1962. Los avances en el desarrollo de estas técnicas permitieron establecer los primeros cultivos celulares en suspensión, comparables a los logrados

en el desarrollo de microorganismos (Hildebrand y Ricker, 1954). En 1954 Muir et al. utilizaron por primera vez cultivos nodrizos de células aisladas para la regeneración de plantas.

F. Skoog (1955) identificó la kinetina (6-furfuril aminopurina) como sustancia reguladora de la división celular; este descubrimiento constituyó un nuevo impulso para el desarrollo de los sistemas *in vitro*. Desde entonces los reguladores de crecimiento se convirtieron en herramienta esencial; los investigadores aplicaron al medio de cultivo sustancias químicas conocidas que estimulan la división celular. Al manipular los niveles exógenos de citoquininas y auxinas se promueve el desarrollo de raíces y yemas, lo cual ha generado especial interés para los trabajos experimentales relacionados con los de morfogénesis y crecimiento.

Skoog y Miller (1957) reportaron el control de la formación de brotes y raíces en tabaco utilizando diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas. La demostración de los cultivos celulares iniciados a partir de raíces de *Daucus carota* en 1958 por J. Reinert, F.C. Steward, M.O. Mapes y M. Mears fue la ratificación del concepto de la totipotencia celular: las células vivientes contienen toda la información genética.

Mahewari y Rangaswamy, en 1958, obtuvieron la regeneración *in vitro* de embriones somáticos a partir de nucelas y vilos de *Citrus spp.* Cocking (1960) utilizó la enzima celulasa, obtenida del hongo *Myrothecium verrucaria*, para realizar la degradación de la pared celular, logrando el aislamiento de protoplastos. Morel (1960) logró la propagación vegetativa en orquídeas utilizando el cultivo de meristemos. Bergmann, en 1960, desarrolló el proceso de filtración de suspensiones celulares y aislamiento de células mediante plaqueo. Kartha et al. (1962) reportaron por primera vez la fertilización *in vitro* de vilos en *Papaver somniferum*. Mathews, en 1964, logró la regeneración de tallos y vástago a partir de callo en *Populus tremuloides*. Kitto y Janick (1966) reportaron la producción de las primeras "semillas artificiales" de zanahoria (*Daucus carota*). Guha y Maheshwari (1966) obtuvieron las primeras plantas haploides a partir del cultivo de anteras de *Datura innoxia*. Murashige, en 1970, se dirigió a sus estudiantes en la Universidad de California para señalarles que "algún día los embriones somáticos podrán ser encapsulados, convirtiéndolos así en "semillas artificiales". Kao, Keller y Miller, en 1970, observaron la división de protoplastos de soja obtenidos a partir de cultivos celulares.

Whitters y Cocking (1972) estudiaron los mecanismos presentes en la

función espontánea; al ser degradada la pared celular, las conexiones plasmodesmales en las células alargadas eventualmente se expanden permitiendo el paso de organelos a células contiguas. Carlson, Smith y Dearing, en 1972, reportaron la primera hibridación interespecífica de dos especies de *Nicotina* mediante la fusión de protoplastos. Zaenen y Larebeke (1974) descubren que el plasmido Ti de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* es el responsable de la inducción de tumores. Kao y su grupo (1974), y Wallin y colaboradores (1974) utilizaron por primera vez polietilenenglicol (PEG) como potente agente de difusión, el cual ha resultado exitoso para fusionar protoplastos de diferentes especies vegetales.

Binding (1974) obtuvo la regeneración de plantas haploides de *Petunia hybrida* a partir de protoplastos.

Gengenbach y Green (1975) obtuvieron la selección positiva de cultivos celulares (callo) de maíz resistentes a *Helminthosporium maydis*. Power y colaboradores (1976) reportaron la hibridación somática interespecífica mediante la fusión de protoplastos de *Petunia hybrida* y *Petunia parodi*. Chilton y su grupo de investigación (1977) lograron la integración del ADN del plasmido-Ti en *Agrobacterium tumefaciens*. En 1978 Melchers, Sacristán y Holder obtuvieron los primeros híbridos somáticos de tomate (*Lycopersicum esculentum*) y papa (*Solanum tuberosum*), logrando la regeneración de plantas entre ambas especies. El híbrido se denominó POMATO.

En 1980 Alfermann y Reinhard estudiaron la inmovilización de células en *Digitalis lanata* para transformar la digitoxina en digoxina. Larkin y Scowcroft (1981) observaron algunas variaciones resultantes de los cultivos *in vitro* en caña de azúcar; a estos cambios los denominaron variaciones somacloniales. Zimmernan y su grupo de investigación, en 1982, obtuvieron por primera vez la fusión de protoplastos mediante electroporación. En 1983 Pelletier y colaboradores lograron la hibridación citoplasmática en rábano (*Raphanus sativus*) y colza (*Brassica campestris*). Horsh y colaboradores lograron, en 1985, la infección y transformación de discos de hoja de *Nicotiana tabacum* utilizando *Agrobacterium tumefaciens*; igualmente, obtuvieron la regeneración de plantas transformadas.

El grupo *Arabidopsis* del Biological Resource Center de la Universidad de Ohio concluyó, en 2000, los estudios relacionados con la conformación del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Los científicos I. Potrykus y P. Beber (2000) desarrollaron en Suiza el arroz dorado al insertar dos

genes del narciso y un gen bacteriano de *Erwinia uredovora*, realizando las cuatro etapas necesarias para la producción de betacaroteno. Cinco años después el grupo Syngenta, en Inglaterra, continuó las investigaciones desarrollando un arroz que contiene 20 veces más de betacarotenos, lo que permitió reducir la deficiencia de vitamina A y disminuir la ceguera infantil. Para la celebración de los cincuenta años del descubrimiento del ADN, Biovision Nobel Day organizó en abril 8 de 2003 en Lyon-Francia un evento único con la participación de nueve premios Nobel, además de James Watson, premio Nobel de Medicina.

En 2004, International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC) finaliza y consolida las investigaciones del genoma humano que facilitar la comprensión y la evolución de enfermedades. El Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) en Valencia, España, (2006) logró desarrollar el tomate transgénico azul, con fines terapéuticos, que proporciona una terapia inmunológica (pasiva oral) buscando aumentar las defensas para prevenir enfermedades. En 2007 el consorcio franco-italiano reportó la conclusión de los estudios del genoma de la vid (*Vitis vinifera*).

Desde 1990 a 2008 se presenta una cascada de eventos y hallazgos en ingeniería genética y biología molecular que marcan la nueva revolución verde del siglo XXI. Entre 1990 y 2008 el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) reporta la obtención de más de 3.500 variedades en cereales, leguminosas, hortalizas y frutales mediante la inducción de mutaciones físicas y químicas.

CAPÍTULO 2

Cultivo de Células y Tejidos Vegetales

El desarrollo de las diferentes vías del cultivo de tejidos se basa en la capacidad de las células vegetales para regenerar una planta completa idéntica a la original. Esto permite obtener numerosos cambios fisiológicos, genéticos y morfológicos con el empleo de reguladores de crecimiento, como auxinas, citoquininas, giberelinas y poliaminas, los cuales originan una serie de reacciones en las células vegetales que alteran procesos metabólicos y posibilitan obtener resultados de interés en el área de la biotecnología vegetal.

Los sistemas in vitro agrupan básicamente cinco etapas que consisten en: 1-selección de la especie, 2-establecimiento del medio de cultivo, 3-desarrollo del tejido, 4-enraizamiento y 5-acondicionamiento, aclimatación. Cada una de estas etapas son importantes dependiendo del objetivo que el investigador se proponga realizar.

1. *Selección de la especie:* esta primera etapa del proceso requiere especial atención puesto que se convierte en el inicio de la cadena de la investigación. Las plantas seleccionadas deben presentar características importantes durante el proceso. Se recomienda disponer

de plantas sanas, vigorosas, con estabilidad climática, con el fin de no modificar los niveles de carbohidratos, proteínas y reguladores hormonales endógenos sin alterar los procesos *in vitro*.

2. *Establecimiento del medio de cultivo:* la adecuada selección de los medios de cultivo es fundamental para el éxito en el cultivo de los tejidos vegetales. El medio básico utilizado no puede suplir el desarrollo de todas las células; es necesario realizar cambios para obtener las respuestas requeridas en el crecimiento de un explante. Generalmente; los medios de cultivo contienen sales inorgánicas, reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas, carbohidratos y un agente gelificante, aunque no siempre este último es indispensable. Se pueden agregar otros compuestos, como aminoácidos, antioxidantes, retardantes, complejos naturales, entre otros, dependiendo del tipo de explante y del propósito del trabajo.

Después de seleccionar el medio de cultivo y el explante, continúa el proceso de desinfección del material vegetal. Se utilizan algunos detergentes y desinfectantes que penetren en el tejido y eliminen cualquier tipo de agente contaminante. Es importante tener en cuenta que no todos los explantes requieren el mismo proceso de desinfección, ya que la morfología y el tejido varían, así como las condiciones ambientales a las que se encuentran expuestos.

3. *Desarrollo del tejido:* el empleo de los sistemas *in vitro* varía dependiendo de la composición del medio de cultivo y del explante seleccionado. Usualmente, la multiplicación ocurre a través de la embriogénesis somática, propagación clonal y formación de brotes adventicios.

La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones sin requerimiento de la fusión de gametos, es decir, se obtienen estructuras bipolares a partir de células de diferentes tejidos de la planta. Esta alternativa de propagación presenta enormes ventajas, debido a que cada célula contiene la información necesaria para dar origen a una planta completa. Por tanto, la existencia de numerosas células en el explante o inoculo abre la posibilidad de generar miles de plantas a partir de un pequeño fragmento de tejido.

La propagación clonal es la forma más común de multiplicación en la mayoría de las especies vegetales, la cual puede generar la proliferación de brotes dependiendo del medio de cultivo y de la

planta. Se utilizan bajas concentraciones de citoquininas para estimular la formación de múltiples brotes a partir de una sola yema axilar o apical.

En referencia a la formación de brotes adventicios u organogénesis, puede presentarse de manera directa o indirecta. Se entiende por organogénesis directa la formación de los brotes a partir de cualquier tejido de la planta, es decir, segmentos de hoja, tallo, pecíolo, pétalo etc. La organogénesis indirecta ocurre cuando la formación de los brotes se genera a partir del desarrollo de un callo previamente formado en el explante.

Es importante resaltar que cada uno de los procesos de propagación vegetal requiere un equilibrio hormonal para lograr los resultados deseados sin producir alteraciones fisiológicas que puedan afectar el óptimo desarrollo de los explantes.

4. *Enraizamiento y acondicionamiento:* dependiendo de la especie, en ocasiones los brotes generan la formación de raíces durante la etapa de multiplicación; sin embargo, resulta más exitoso el comportamiento ex vitro si se realiza un diseño exclusivo para la etapa de enraizamiento y acondicionamiento. Las condiciones en las que se encuentran las plántulas en el laboratorio son muy diferentes a las condiciones de exterior y se requiere de un proceso especial. Generalmente, se utilizan ácido 3- indol acético (**AIA**), ácido 2-(1-naftalén acético), (**ANA**) y ácido indol butírico (**AIB**) en concentraciones comprendidas entre (0,1 - 5,0 mg/L). En ocasiones es aconsejable reducir la concentración de macro y micronutrientes y suplementar los medios con aminoácidos y vitaminas debido a que contribuyen al enraizamiento de las plántulas (Kamada y Harada, 1979).

El acondicionamiento de las plántulas en el laboratorio implica el monitoreo de la intensidad lumínica, la temperatura y las respuestas fisiológicas. Normalmente, para la etapa de enraizamiento, las plántulas deben ser sometidas a prolongados períodos de oscuridad; sin embargo, esto no se aplica a todas las especies. La temperatura óptima se encuentra entre 25 y 28 °C (Hammerschlag, 1982).

5. *Adaptación de las plántulas:* las plántulas desarrolladas *in vitro* son transferidas a condiciones de exterior; necesitan un proceso de

adaptación con el fin de proporcionar estabilidad en campo. Las plántulas se trasplantan en sustratos estériles y son monitoreadas bajo invernadero, con estricta atención en los procesos fisiológicos que requieren.

CAPÍTULO 3

Sección del Explante

El cultivo de tejidos se inicia con el empleo de pequeñas porciones u órganos de la planta denominados explantes, los cuales son capaces de originar la planta completa con la misma información genética de la planta madre. Los explantes deben ser desinfectados y, posteriormente, cultivados en medios sólidos o líquidos con diferentes requerimientos nutricionales y hormonales, dependiendo del objetivo de la investigación.

Todas las estructuras pasan por un proceso de desdiferenciación y rediferenciación, y toman diferentes rutas para la formación de callos, órganos, embriones somáticos entre otros, los cuales a su vez pueden originar la plántula completa (Cañas, 1993).

Las respuestas in vitro dependen de la interacción genoma-medio de cultivo, aunque no se pueden descartar las condiciones de crecimiento y ambientales en el laboratorio: fotoperiodo, intensidad lumínica, temperatura, humedad y otras.

3.1. Composición y preparación del medio de cultivo

Uno de los factores que gobiernan el crecimiento y la morfogénesis de los tejidos en condiciones *in vitro*, es la composición del medio de cultivo. Los nutrientes básicos requeridos por las células vegetales son similares a los nutrientes que aporta el suelo para el desarrollo de las plantas. La composición de los medios de cultivo ha sido estudiada por diferentes científicos, quienes de acuerdo con sus investigaciones han sido formulados. El medio debe estar conformado principalmente por los siguientes componentes: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares y gelificantes; sin embargo, la composición puede variar dependiendo del genotipo de la planta y el objetivo de la investigación.

3.1.1. Macronutrientes

Los seis elementos mayores: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S) conforman los macronutrientes requeridos por las células vegetales para alcanzar un crecimiento adecuado estructuralmente. Dependiendo del medio de cultivo varían las dosis de estos elementos. Las concentraciones de nitrógeno son elevadas en la mayoría de los medios nutritivos; sin embargo, en algunas especies, el exceso contribuye a desórdenes fisiológicos como la vitrificación de los tejidos.

El nitrógeno es el elemento más importante en el desarrollo de las plantas debido a su carácter constructivo de las principales biomoléculas; generalmente, es suministrado en forma de nitrato (NO_3^-) o de amonio (NH_4^+). En algunas especies, el nitrógeno puede causar vitrificación en las plántulas. En ocasiones, se recomienda reducir las dosis.

El fósforo es considerado elemento indispensable en la fotosíntesis, la respiración y en todo el metabolismo energético de las células vegetales, pues forma parte de la molécula de ATP (adenosintrifosfato); además, es parte estructural en muchas moléculas y estructuras celulares, como en el caso de los enlaces diéster presentes en los ácidos nucleicos y en los fosfolípidos, los cuales son fundamentales en las membranas.

El potasio es el elemento más abundante en las vacuolas. Desempeña un papel muy significativo en el mecanismo de apertura y cierre estomático; consiguientes interviene en la osmorregulación. Además, es activador de sistemas enzimáticos, entre los que se encuentran oxidoreductasas, deshidrogenasas, transferasas, sintetasas y quinasas.

El calcio estimula el desarrollo de raíces y hojas. Forma compuestos que son parte de las paredes celulares; se encuentra en una concentración muy baja en el citosol, debido a que activa algunas enzimas. Puede inhibir otras enzimas al utilizar concentraciones mayores de $1\mu M$ (Hanson, 1984).

El magnesio se encuentra principalmente en los cloroplastos, aunque 20 % se presenta en las moléculas de clorofila. Es importante en la activación de moléculas como rubisco, fosfoenol-piruvato carboxilasa y glutamato sintasa (Clark, 1982).

Los compuestos biológicos donde se involucra el azufre son diversos en tipo y complejidad; desde moléculas pequeñas a medianas. Es conocido que un amplio grupo de enzimas depende, para su actividad catalítica, la presencia de grupos sulfidrilo (SH). Además forma parte estructural de la cisteína, aminoácido esencial en el metabolismo del azufre.

3.1.2. Micronutrientes

Son conocidos también como oligoelementos y considerados importantes para el desarrollo de las plantas. Su nombre hace referencia a la baja concentración que requieren los vegetales para su crecimiento. En los medios de cultivo establecidos por algunos investigadores, los más utilizados son: hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B) y molibdeno (Mo).

De los micronutrientes, el hierro se requiere en mayor cantidad. Forma parte de los grupos catalíticos de muchas enzimas redox; además, se encuentra unido a grupos tiólicos de la cisteína en otras proteínas: hierro-azufre y sulfoferro proteínas. Estas son clave en la fotosíntesis, como es el caso de la ferredoxina.

El manganeso forma el complejo manganeso-proteína que transporta los electrones desde el agua al fotosistema II; además, es activador de

muchas enzimas respiratorias del ciclo de Krebs.

La movilidad del zinc es escasa, razón por la cual se encuentra concentrado en la raíz. Participa en enzimas que contienen Zn (estructural), deshidrogenasas como alcohol, lactato, malato y glutamato deshidrogenasa. Interviene en la síntesis y la conservación de auxinas.

El cobre interviene en numerosos procesos de oxidación-reducción. Por ejemplo, actúa en el sistema enzimático ascórbico oxidasa, causante de la oxidación del ácido ascórbico (vitamina C) a dehidroascórbico. Portanto esta vitamina ejerce efecto protector sobre la oxidación.

El boro facilita el transporte de los azúcares a través de la pared celular en el interior de la planta. Fisiológicamente está involucrado en la división y el crecimiento celular, la germinación y regulación hormonal.

El molibdeno forma parte de una enzima clave en la asimilación del nitrato: la nitrato reductasa, responsable de la reducción de nitratos a nitritos. Además, está implicado en la degradación de bases púricas como la adenina y guanina, y parece estar implicado en la formación del ácido absícico, al ser parte estructural de la enzima que lo genera.

3.1.3. Vitaminas

Las plantas superiores sintetizan las vitaminas esenciales que contribuyen a su crecimiento y desarrollo, pues estas se insertan en las células vegetales para contribuir a su normal progreso y además, pueden cumplir funciones catalizadoras durante las reacciones enzimáticas.

La tiamina o vitamina B1 es la más utilizada, su importancia radica en que forma parte de la coenzima tiamina pirofosfato, necesaria en la conversión del ácido pirúvico a acetil CoA, que interactúa en el ciclo de Krebs.

Otras vitaminas como el ácido nicotínico es considerado un componente importante de la coenzima NAD (nicotinamida adenina dinucleótido), y de la síntesis del ADN.

La piridoxina o vitamina B6 está relacionada con la transformación de moléculas alimenticias en moléculas que suministran energía a la célu-

la y participa en los procesos respiratorios.

El ácido pantoténico es fundamental en los procesos biológicos por formar parte de la coenzima A (CoA). La biotina resalta su importancia en el transporte de CO_2 y el ácido fólico en el transporte de unidades mono-carbonadas.

El myo-inositol o meso-inositol suele estar unido al grupo fosfato de los fosfolípidos, estructuras fundamentales de las membranas biológicas.

3.1.4. Carbohidratos

Los monosacáridos y disacáridos son las fuentes de carbono más importantes en los cultivos *in vitro*; por consiguiente, las condiciones de crecimiento deben ser estimuladas con el empleo de los carbohidratos para promover el proceso de la fotosíntesis. El azúcar más utilizado es la sacarosa, la cual es hidrolizada extracelularmente a glucosa antes de ser utilizada por las plantas como fuente de energía. La glucosa provee energía de manera mas rápida a las células vegetales. Además, se utilizan maltosa, lactosa, manosa y galactosa en los procesos bioquímicos vegetales.

3.1.5. Agentes gelificantes

El medio de cultivo puede o no llevar agentes gelificantes, dependiendo del objetivo y de los requerimientos de los explantes. El cultivo de células en suspensión, por ejemplo, es un medio rico en nutrientes y reguladores; carece de estos compuestos, debido a que requiere un movimiento continuo para la producción constante de oxígeno, necesario en el crecimiento celular.

En otros casos el empleo de un compuesto gelificante es importante para brindar a la planta un soporte; en estos casos se utiliza una serie de compuestos. Los más conocidos son agar-agar y el phytagel o gelrite.

Se han establecido algunos medios de cultivo básicos para la realización de los diferentes procesos que comprenden los sistemas *in vitro*, los cuales pueden variar dependiendo de los requerimientos de las plantas

(anexos, tablas 1-6).

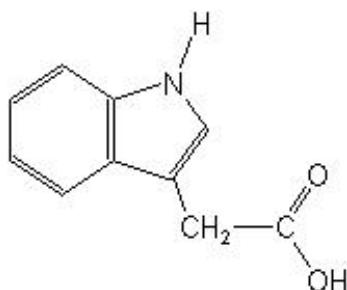
3.2. Reguladores de crecimiento

Se conocen también como hormonas vegetales, son sustancias sintetizadas en determinado lugar de la planta y se desplazan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, y desarrollo y metabolismo del vegetal. El término “regulador de crecimiento” es más general y abarca las sustancias de origen natural y las sintetizadas en laboratorio, que determinan respuestas en la planta.

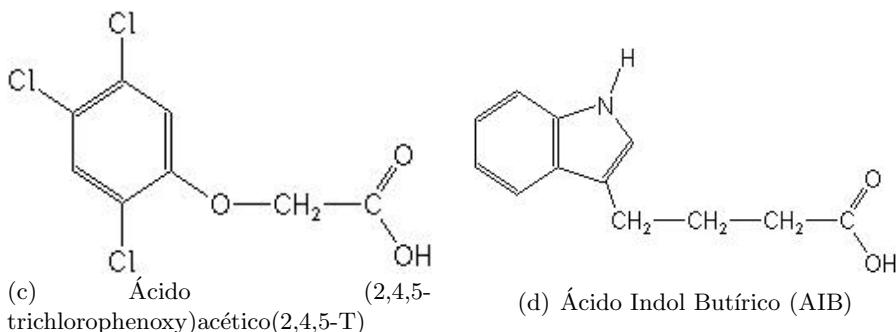
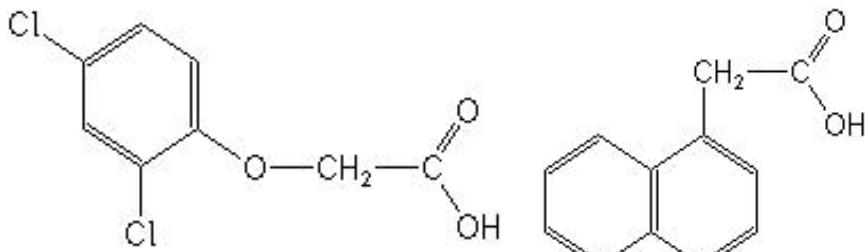
Dependiendo del objetivo de las investigaciones, de la especie en estudio y del tipo de explante seleccionado, se utilizan los siguientes reguladores de crecimiento, adicionados a los diferentes medios de cultivo en concentraciones muy bajas:

3.2.1. Auxinas

El AIA (ácido 3-indolacético) es la auxina natural por excelencia. Se sintetiza a partir del aminoácido triptófano en primordiofoliar, semillas en desarrollo y hojas jóvenes. Su transporte se efectúa de célula a célula, vía floema, de manera unidireccional (basipétalo en tallos y acropétalo en raíces).



Entre las auxinas sintéticas más utilizadas en los cultivos de tejidos vegetales se encuentran:



Tambien se emplean algunos herbicidas en concentraciones muy bajas, que actúan como auxinas; han sido utilizados en la regeneración de plantas de algunas especies vegetales: dicamba (3,6 dicloro-o-ácido anisico) y picloram (ácido 4 amino 3, 5,6-tricloro picolínico).

Estas auxinas deben ser utilizadas en concentraciones muy bajas con el fin de no causar efectos inhibitorios ni atrofias en células y tejidos. Los efectos más destacables son:

- Alargamiento celular
- División celular
- Diferenciación del floema y del xilema

- Participación en respuestas trópicas (gravitropismo y fototropismo)
- Promoción la formación de raíces adventicias en pequeñas cantidades
- Promoción la dominancia apical
- Regulación la formación floral

3.2.2. Citoquininas

Las citoquininas son hormonas vegetales naturales que derivan de adeninas y promueven la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente, fueron llamadas cinetinas, sin embargo, debido al uso anterior del nombre en un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adaptó el término citoquinina (citocinesis o división celular).

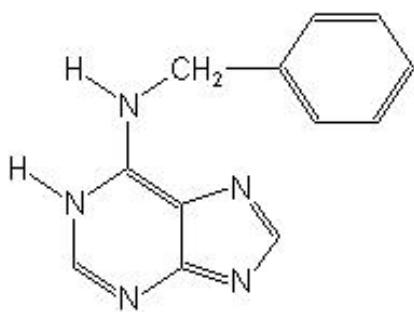
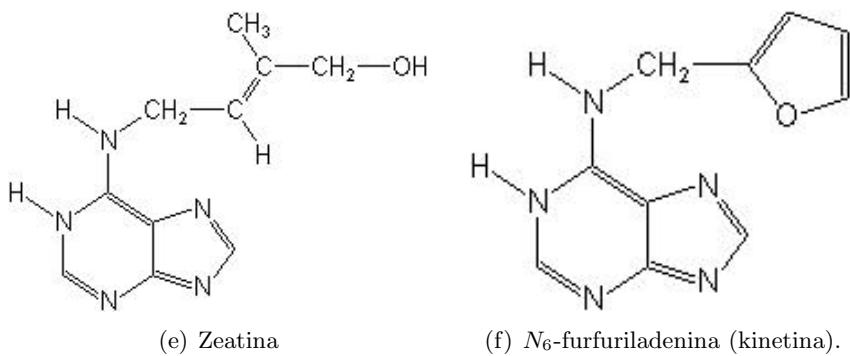
Son producidas a partir de órganos en crecimiento y en el meristemo de la raíz. Se sintetizan a partir del isopentenil adenosina fosfato (derivado de la ruta del ácido mevalónico) que por pérdida de un fosfato, eliminación hidrolítica de la ribosa y oxidación de un protón origina la zeatina, una citoquinina natural que se encuentra en el maíz (*Zea mays L.*). De allí su nombre.

Existen además, las citoquininas sintéticas, utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales y en cultivos bajo invernadero y campo. Las principales son: 6 bencilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), (N^6 -furfuriladenina) kinetina, N^6 - benciladenina (BA), N^6 (2-isopentil) adenina (2-iP).

Entre los efectos fisiológicos que causa este grupo de hormonas se encuentran:

- División celular y formación de órganos
- Retardo de la senescencia (debido a su propiedad de generar alta división celular)
- Desarrollo de yemas laterales o caulogénesis

- Inducen partenocarpia



(g) *N*₆-benciladenina (BA).

3.2.3. Giberelinas

Las giberelinas son terpenos. Su síntesis se produce en todos los tejidos de los diferentes órganos y puede estar afectada por procesos internos de retroalimentación negativa o por factores externos como la luz, que según su duración lleva a la producción de giberelinas o de inhibidores del crecimiento. Su transporte ocurre vía xilema y vía floema.

Las giberelinas promueven la división celular al reducir la interfase del ciclo celular e inducir las células en fase G1 a sintetizar ADN. También promueven la elongación celular al incrementar la plasticidad de la pared y aumentar el contenido de glucosa y fructosa, provocando la

disminución del potencial hídrico, lo cual permite el ingreso de agua en la célula y produce su expansión.

Entre los efectos fisiológicos que causan estas fitohormonas se destacan:

- Control del crecimiento y elongación de los tallos
- Crecimiento y desarrollo de frutos
- Rompimiento de dormancia en semillas de algunas especies

3.2.4. Etileno

Hasta hace poco tiempo, fue reconocido como una hormona vegetal; se deriva de los C3 y C4 de la metionina. Afecta el crecimiento, el desarrollo, la maduración y el envejecimiento de las plantas. Normalmente es producido en pequeñas cantidades por la mayoría de frutas y vegetales, y por algunos otros órganos de las plantas.

El etileno es activo en concentraciones muy bajas, del orden de 1 ppm (parte por millón). Las plantas pueden oxidar fácilmente al etileno hasta CO_2 ; debido a su alta volatilidad, la regulación de su concentración se lleva a cabo en la síntesis, mediante el control de la ACC sintasa (1-aminociclopropano-1-carboxílico) y la ACC oxidasa. La actividad de la ACC sintasa es estimulada por:

- Maduración del fruto
- Senescencia foliar
- Auxinas
- Lesión física
- Lesión por congelación
- Estrés hídrico

La ACC oxidasa también presenta una fuerte regulación. Esta enzima se inhibe a altas concentraciones de CO_2 , en condiciones anaeróbicas o a temperaturas por encima de los 35°C. Es estimulada durante la maduración del fruto (Kende, 1993).

3.2.5. Poliaminas

Las poliaminas son compuestos nitrogenados alifáticos que actualmente se consideran reguladores de crecimiento y desarrollo de plantas por su efecto demostrado sobre el crecimiento, la división y la diferenciación celular en bajas concentraciones. Por su carácter poliacidónico, pueden unirse a moléculas cargadas negativamente, como ácidos nucleicos, proteínas o fosfolípidos, alterando la expresión génica y la actividad de algunas enzimas. También varía la fluidez y la permeabilidad de las membranas biológicas. En determinados casos, las poliaminas actúan como reserva de nitrógeno, constituyendo su única fuente.¹

Entre los efectos fisiológicos que causan estos compuestos se encuentran:

- Diferenciación vascular
- Capacidad antioxidante y estabilizadora de las membranas
- Diferenciación de embrioides

3.2.6. Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides son compuestos naturales que se encuentran en pequeñísimas cantidades en los órganos de las plantas, preferentemente en los tejidos y órganos más jóvenes. Son polihidroxifenoles. En ese grupo se hallan alrededor de sesenta estructuras. El brasinólido es el más activo y fue el primero en ser aislado a partir de *Brassica napus* en 1979. Son considerados reguladores de crecimiento; posiblemente, su sitio de síntesis es el estroma de los plastidios. Son almacenados en los gránulos de almidón. Para su extracción se emplearon semillas, frutos,

¹<http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores.htm>

tallos, hojas y brotes jóvenes. Fisiológicamente estimulan la elongación y división celular en segmentos de tallos, inhiben el crecimiento radicular, estimulan el gravitropismo, inducen diferenciación del xilema, aumentan la abscisión de las hojas y promueven resistencia en condiciones adversas.²

3.2.7. Ácido jasmónico

Arias (2009) reporta que el ácido jasmónico (AJ) es una molécula de señal en estrés biótico. Los jasmonatos aplicados exógenamente a las plantas ejercen varios efectos de inhibición o de promoción, con cambios morfológicos o fisiológicos. Así, los jasmonatos inducen expresión genética conducente a la síntesis de muchas proteínas, algunas de las cuales están asociadas probablemente a las respuestas de defensa de las plantas. Los jasmonatos han sido asociados ahora a la acumulación de metabolitos secundarios, que también son parte de la respuesta de defensa de las plantas.

3.2.8. Antioxidantes

La oxidación es el proceso mediante el cual algunos átomos traspasan electrones a otras moléculas (radicales libres, fenoles, etc.) o sustancias químicas (aminoácidos, carbohidratos, grasas, proteínas o ADN), causando su oxidación.

Los antioxidantes son compuestos sintéticos o naturales cuya principal función es estabilizar o reducir las reacciones de oxidación. Algunas especies vegetales poseen un buen número de fenoles, los cuales producen la fenolización del medio de cultivo y, en ocasiones, causan la muerte del tejido.

El proceso de oxidación es un evento continuo que, una vez iniciado, se acelera hasta presentar la oxidación total de las sustancias sensibles. Como consecuencia, las moléculas que han perdido electrones presentan un cambio importante en sus características físicas, reflejo de los cambios generados a nivel químico.

²<http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores.htm>

Para contrarrestar estos fenómenos, se utilizan compuestos generados, como el carbón activado, L-cisteina, fluoroglucinol, ácido cítrico y ácido ascórbico, que al adicionar al medio de cultivo favorece y estabiliza estos problemas de intoxicación.

El polivinil pirrolidona (PVP), polímero sintético de la vinilpirrolidona, que actúa como surfactante no iónico, es utilizado para reducir la oxidación.

La L-cisteina es un aminoácido azufrado, no esencial, que se sintetiza a partir de la metionina y es requerido por la célula para la formación de proteínas. Se oxida fácilmente originando cistina, por lo cual es ampliamente utilizado para evitar la fenolización.

El ácido ascórbico es una cetolactona de seis carbonos que se relaciona estructuralmente con las hexosas y se oxida de manera reversible produciendo ácido deshidroascórbico. Su propiedad química más importante es la oxidación por la transferencia de uno o dos electrones, lo cual ayuda a prevenir la oxidación de las moléculas solubles en agua; por tanto, es reconocido como antioxidante.

El carbón activado es un polvo negro, inodoro, insípido y libre de gránulos, obtenido de material vegetal como aserrín, turba, madera, cáscaras de nueces o cáscara de coco. Estos materiales se procesan a temperaturas de 800 a 1000°C en ausencia de oxígeno (proceso de carbonización) y posteriormente son purificados para remover las impurezas presentes (Pierik, 1987).

3.3. Sistemas de propagación clonal

Los procesos de propagación clonal en el cultivo de tejidos vegetales se caracterizan por obtener un gran número de plantas genéticamente idénticas a partir de pequeños segmentos de una planta donante, acorde con el sistema del cultivo y su mantenimiento. Sin embargo, el tipo de explante y su estado fisiológico, la composición del medio de cultivo y las características de la especie, son factores que influyen en la respuesta organogenética del tejido.

El código oficial de la nomenclatura de las plantas cultivadas define

la palabra “clon” como un conjunto genéticamente uniforme de individuos que pueden ser de naturaleza química, originalmente derivados de un solo individuo mediante propagación asexual: estacas, divisiones, injertos (Hudson et al. 1997). Además, a medida que han ido avanzando las técnicas para el cultivo de células de organismos superiores, ya no está implícita la uniformidad o identidad genotípica, pues se ha revelado que durante el cultivo aséptico, las células pueden cambiar en forma dramática su genotipo o su complemento cromosómico.

Existen algunas ventajas en la propagación vegetativa:

- En plantas de semillas con períodos de dormancia prolongada, la propagación vegetativa puede ser más rápida que por semillas.
- La indeseable fase juvenil asociada a plantas provenientes de semilla, en algunos cultivos, no aparece en plantas propagadas vegetativamente a partir de material adulto.

Entre las diferentes vías de importancia para realizar la multiplicación clonal se consideran:

- Cultivo de meristemos
- Cultivo de segmentos nodales, multiplicación de brotes, yemas apicales, axilares o laterales, este método es utilizado para obtener la multiplicación clonal rápida y es aplicado actualmente a una gran variedad de especies.
- Organogénesis
- Embriogénesis somática
- Cultivo de callos
- Microtuberización
- Rescate de Embiones

Las técnicas de cultivo de tejidos se han estandarizado como alternativa para la propagación vegetal. La ventaja más significativa ofrecida

por los métodos asépticos de propagación clonal, conocida también como “micropropagación”, es la obtención de gran número de plantas pertenecientes a un individuo.

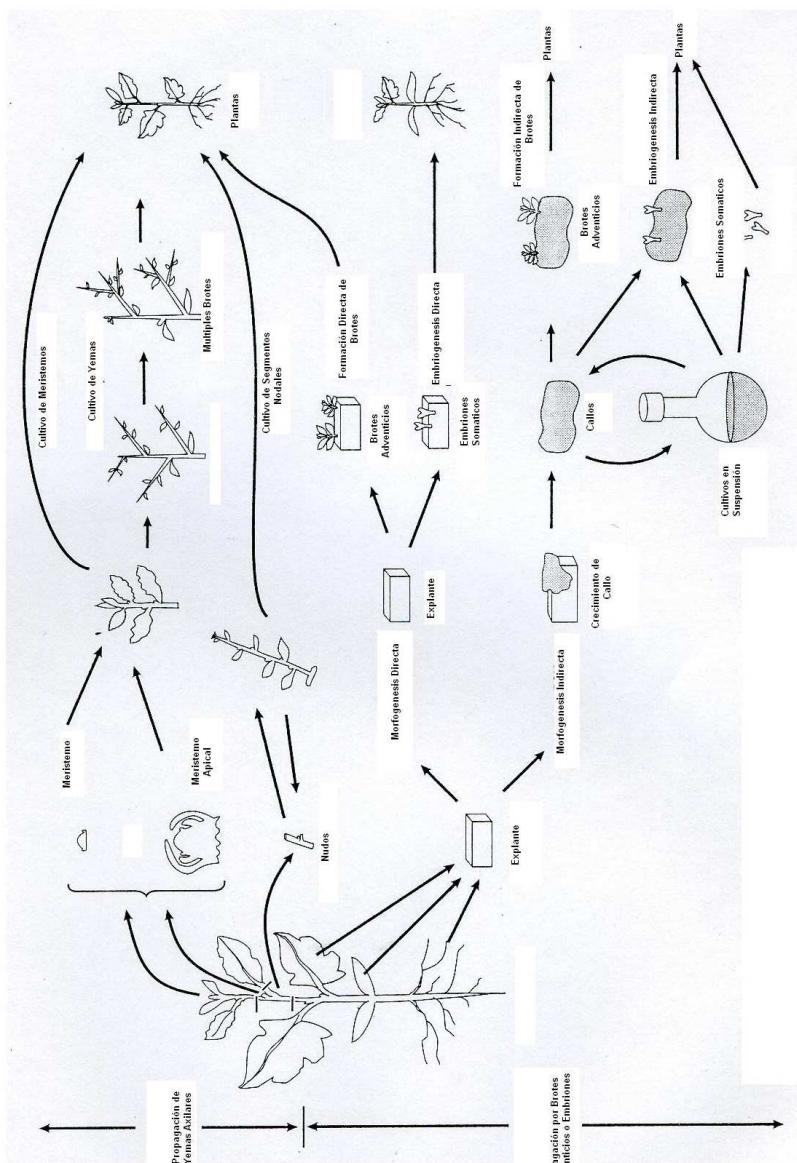


Figura 3.1. Principales métodos de micropropagación (George, 1993).

3.4. Cultivo de meristemos

Los meristemas son grupos de células en estado juvenil con capacidad para dividirse constantemente, los cuales son utilizados esencialmente para la producción de plantas libres de patógenos. La carencia de vías de conducción para virus y viroides en estos tejidos permite lograr la sanidad de las plántulas. La técnica del cultivo de meristemas consiste en la disección e incubación del meristemo apical de una planta en condiciones de asepsia. Se considera meristemo en sentido estricto al domo meristemático del ápice o bien el domo meristemático con uno o dos primordios foliares. Debido a la dificultad de aislar el meristemo, se aconseja extirparlo y cultivarlo con los primordios foliares, en este caso también se obtienen buenos resultados. (figura 3.2).

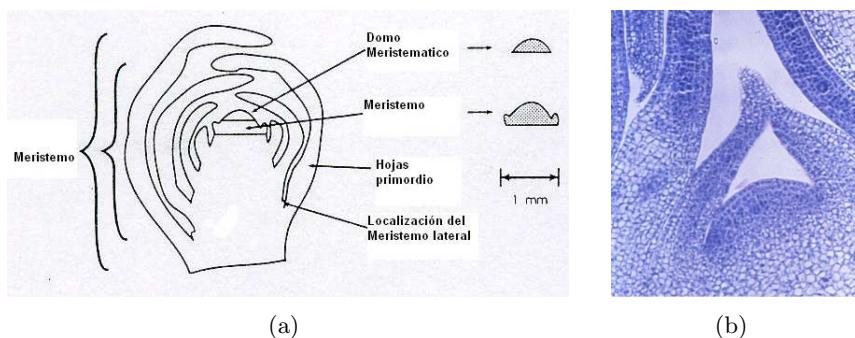


Figura 3.2. A. Diagrama de las zonas que conforman el meristemo apical (George,1993). B. Corte histológico del meristemo de banano (*Musa AAA*). Obsérvense el domo apical y las hojas primordias circundantes.

La idea del cultivo de meristemas surgió hacia 1934, cuando White observó que un virus del tabaco se distribuía desigualmente en toda la planta. Más tarde, Limasset y Cornuet (1949) propusieron que el meristemo podría estar libre del virus. Fue entonces cuando Morel y Martin, en 1952, lograron cultivar meristemas de dalias infestadas por virus y obtener plantas libres de virus. Después de este trabajo, siendo muy claras las aplicaciones de este método en horticultura y fruticultura, se realizaron muchos esfuerzos en este campo y hoy día es un sistema de aplicación práctica en numerosas especies cultivadas.

Luego surgieron los interrogantes sobre el porqué de la distribución

diferencial del virus en la planta y su ausencia en el meristemo. La primera hipótesis explicó la ausencia del virus en el meristemo por considerar que son patógenos sistémicos, de manera que al moverse por el sistema vascular de la planta, como estos no llegan al meristemo, el virus no podría alcanzarlo. Incluso si el virus fuera capaz de invadir o moverse de célula a célula, la velocidad de avance de los virus sería inferior al desarrollo de las células que conforman el meristemo e impediría su invasión. Otras hipótesis proponen una inhibición de la replicación de los virus en la zona meristemática debido a la alta tasa metabólica de las células que conforman el meristemo y a la elevada concentración de reguladores en esta zona. Aunque la ausencia de virus en el meristemo no está totalmente esclarecida, estas hipótesis o su conjunción parecen ser correctas (Morel y Martin, 1952).

El tamaño del meristemo, quizá sea el factor más crítico para su cultivo, y el éxito en el saneamiento es mayor cuanto más pequeño es el explante (0.05mm - 0.2mm de diámetro).

Es preciso indicar que los requerimientos de los medios de cultivo no son muy rigorosos excepto cuando se cultiva el domo meristemático sin primordios foliares. Solo es necesario efectuar los habituales ajustes en el medio para cada especie. Otros factores que influyen en el éxito del tratamiento son la rapidez en el aislamiento del meristemo, para evitar la deshidratación de esta frágil estructura; la época del año en que se obtiene el explante y la influencia estacional muy fuerte en algunas especies y regiones.

Los meristemos se clasifican en primarios y secundarios. Los primarios generan el crecimiento en longitud de la planta; pueden ser apicales. Se encuentran en los ápices de brotes y raíces tanto en la rama principal como en las laterales. Su origen se remonta al embrión, el cual contiene un polo apical y otro basal. Los meristemos apicales se dividen en:

- Caulinares: se originan en el polo apical del embrión, los cuales darán origen a las estructuras reproductoras, al tallo y a las hojas.
- Radicales: proceden del polo basal del embrión y originan la raíz.

Los meristemos primarios pueden ser también intercalares, es decir, que se encuentran en la base de los entrenudos; su crecimiento se denomi-

na crecimiento intercalar. En una planta joven, ocupa todo el entrenudo; en una adulta solo la base.

Meristemos secundarios: se encuentran en los laterales de tallos y raíces, y producen el crecimiento en el volumen del tallo. Existen dos tipos: el cámbrum vascular, que origina un crecimiento en espesor de los tejidos vasculares, y el cámbrum suberoso o felógeno, que aumentará la corteza del vegetal originando la peridermis.

Las células meristemáticas son de tamaño pequeño, indiferenciadas, generalmente isodiamétricas con un núcleo grande, lámina media y pared celular delgada, presentan gran numero de pequeñas vacuolas y carecen de espacios intercelulares.

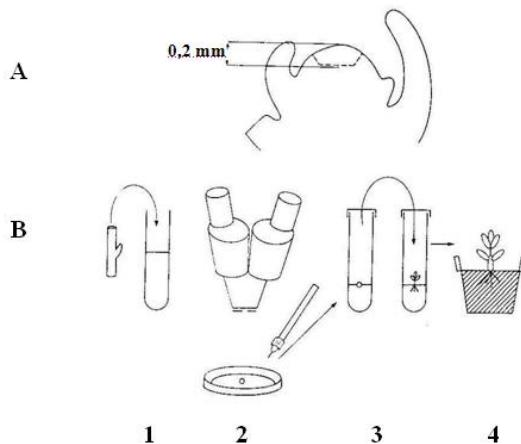


Figura 3.3. A. Esquema del corte longitudinal del meristemo de una yema. La cúpula meristemática de 0,2mm de tamaño se encuentra protegida por los primordios foliares. B. Secuencia del proceso de extracción, observación y siembra del meristemo.

El desarrollo de la práctica consiste en aislar el meristemo de las plantas para su posterior regeneración. Favorece la ausencia de patógenos debido a que este tejido carece de haces vasculares y a su constante y rápida división celular.

3.4.1. Tomate de árbol (*Solanum betacea*)

Es una fruta exótica con delicioso sabor y aroma, su nombre científico es *Solanum betacea* (cav) Sendt. Pertenece a la familia *Solanaceae*. Originario de la vertiente oriental de los Andes de Colombia, Ecuador y Perú, corresponde al tipo biológico de arbusto semileñoso, alcanza 2 o 3 metros de altura, presenta ciclo vegetativo perenne. Crece en zonas con altitudes que varían de 1000 a 3000 msnm. La vida productiva del cultivo está ligada estrechamente a la sanidad del mismo, debido al ataque de virus, los cuales causan los principales problemas.



Figura 3.4. Planta de tomate de árbol (Olaya, 1991).

Materiales y métodos

Se necesitan ramas de tomate de árbol cvar. tamarillo infestadas por el TAMV Tamarillo Mosaic Virus, a las cuales se les aislará el meristemo apical. Para la desinfección se requiere alcohol antiséptico al 70 %, Tween20®, hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación dell medio de cultivo

En la preparación del medio de cultivo para el desarrollo del cultivo de meristemos de Tomate de árbol cvar. tamarillo se procede a:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y pasarlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.

2. Adicionar 1.0 mg/L de AG3.
3. Añadir 3 mg/L de tiamina adicional a la propuesta en el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962).
4. Disolver las sales, los reguladores en agua destilada estéril y completar a volumen de 1L.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
7. Agregar 8g/L de Agar-agar Merck®.
8. Calentar y agitar constantemente para evitar la formación de grumos hasta ebullición.
9. Distribuir el medio en tubos de ensayo y llevar a autoclave para esterilización a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua el material.
- Sumergir el material en alcohol antiséptico al 70 % durante 5 minutos.
- Introducir el material en una solución de 100 ml de agua destilada estéril más 15 gotas de tween20®.
- Transferir el material a una solución de isodine®, en una concentración de 2,5 % durante 15 minutos.
- Llevar el material a una solución de hipoclorito de sodio al 2,0 % durante 25 minutos.
- Enjuagar el material tres veces con agua destilada estéril.
- Aislar el meristemo y realizar la siembra en condiciones asépticas.

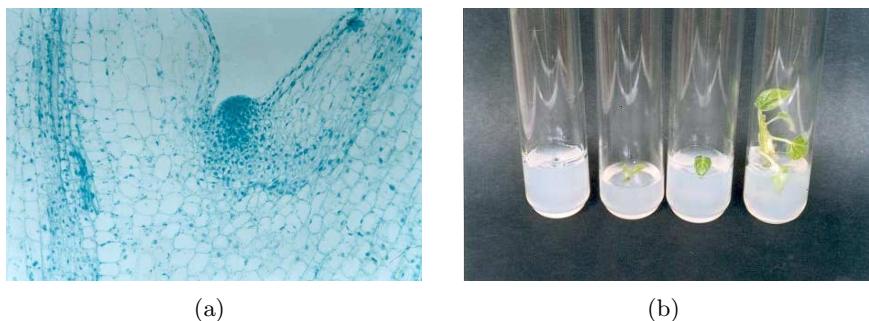


Figura 3.5. a. Corte histológico del meristemo apical de tomate de árbol (Tirado, 2003). b. Secuencia del desarrollo meristemático de tomate de árbol (Tirado, 2003).

3.4.2. Bananos y plátanos (*Musa spp*)

Las *Musaceas* comestibles, que comprenden bananos y plátanos, son consideradas componentes básicos de la dieta cotidiana de más de cuatrocientos millones de personas en las regiones tropicales y subtropicales (FAO, 2001). Los bananos y plátanos pertenecen al grupo de las monocotiledóneas; son plantas herbáceas con grueso tallo subterráneo (cormo) y continúan su desarrollo conformando el pseudotallo con poco tejido de sostén, que se mantiene erecto por las hojas que presentan una distribución helicoidal (Perea, 2003). Estos cultivos son atacados por numerosos patógenos que causan enormes pérdidas. Portanto es necesario la implementación de metodologías apropiadas para la eliminación de estas enfermedades.



Figura 3.6. Frutos de bananos y plátanos (Tirado, 2005).

Materiales y métodos

Se seleccionan cormos obtenidos de plantaciones en campo a los cuales se les retiran las hojas que conforman el pseudotallo hasta dejarlo de un tamaño de 4 cm. Para la desinfección del material se utilizan isodine® e hipoclorito de sodio.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo de meristemos de Musáceas se deben tener presentes los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y llevarlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 1 mg/L de ANA.
3. Agregar 1 mg/L de BAP.
4. Añadir 3 mg/L de tiamina.
5. Disolver las sales, los reguladores en agua destilada estéril y completar a volumen de 1L.
6. Ajustar el pH a 5,8.
7. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
8. Agregar 2,0 g/L de Gelrite Sigma®.
9. Calentar y agitar constantemente hasta ebullición para evitar la formación de sólidos.
10. Servir el medio en recipientes adecuados y llevar a autoclave para esterilización a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua hasta eliminar el exceso de tierra del rizoma.

- Retirar las hojas que conforman el cormo hasta dejarlo de 4 cm.
- Introducirlo en una solución de isodine® al 2 % por 30 minutos.
- Llevarlo a una solución de hipoclorito de sodio al 2 %.
- Lavar con agua destilada estéril hasta eliminar el exceso de desinfectantes.
- Eliminar el resto de hojas hasta obtener el domo apical.
- Realizar la siembra en condiciones de asepsia.

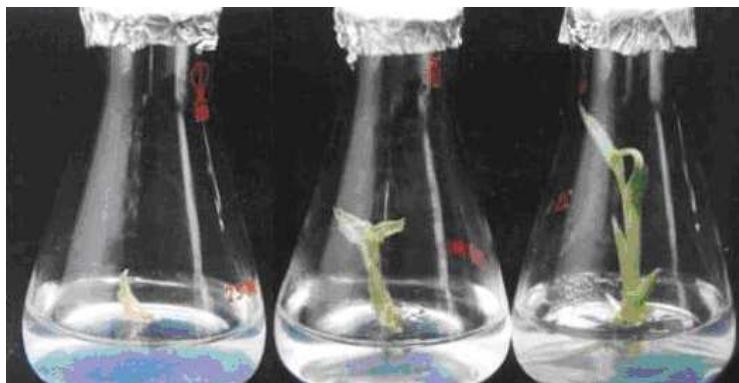


Figura 3.7. Secuencia del desarrollo de meristemos en *Musa spp* (Perea, 1988).

3.4.3. Crisantemo (*Dendrathema morifolium*)

El género *Dendrathema* pertenece a la familia *Asteraceae*. La planta presenta hojas que pueden ser lobuladas o dentadas, ligulosas o rugosas, de color variable de verde claro a oscuro, recubiertas de un polvillo blanquecino que le da un aspecto grisáceo. Casi siempre son aromáticas. La flor es una inflorescencia en capítulo, y esta puede ser de diversos colores. El crisantemo es una de las especies ornamentales más cultivadas de todo el mundo. La producción es importante en varios países europeos, como Holanda, Gran Bretaña y Francia; así como en Colombia, Estados Unidos y Canadá, donde desde hace mucho tiempo es un cultivo industrializado. Generalmente los cultivos son afectados por virus y viroides, razón por la cual se hace necesaria la implementación de metodologías

que permitan la obtención de plantas sanas aptas para la producción y comercialización en mercados internacionales.

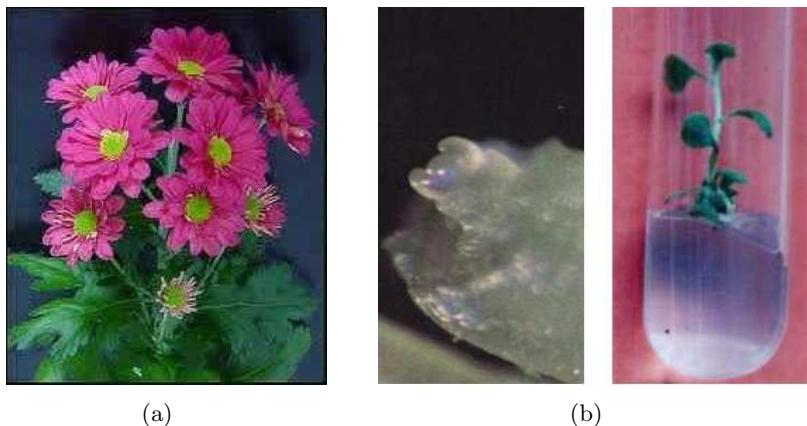


Figura 3.8. a. Planta de crisantemo rosado (*Dendratema molrifolium*) en floración . b. Aislamiento y desarrollo in vitro del meristemo de crisantemo (*Dendratema molrifolium*) (Perea, 2000).

Materiales y métodos

Para esta práctica, se requieren esquejes de crisantemo de los cultivos de flores provenientes de la sabana de Bogotá. Para la desinfección se necesita alcohol antiséptico al 70 %, hipoclorito de sodio e Isodine®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo de meristemos de crisantemo se deben tener presentes los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y adicionarlas en un recipiente de 1000 ml.
2. Adicionar 0,5 mg/L de ANA.
3. Añadir 1,0 mg/L de AG_3 .
4. Agregar 1,5 mg/L de tiamina.

5. Disolver las sales, los reguladores en agua destilada estéril y completar a volumen de 1L.
6. Ajustar el pH a 5,8.
7. Incorporar 30 g/L de sacarosa
8. Adicionar 2,0 g/L de Gelrite Sigma®.
9. Calentar y agitar constantemente hasta ebullición para evitar la formación de sólidos.
10. Servir el medio en recipientes adecuados y llevar a autoclave para esterilización a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua.
- Introducir el material en alcohol antiséptico al 70 % por 5 minutos.
- Sumergir el material en isodine® al 2,5
- Introducir el material en hipoclorito de sodio al 1,5 % durante 15 minutos.
- Lavar el material tres veces con agua destilada estéril.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.5. Cultivo de segmentos nódulos

Este sistema consiste en aislar los segmentos nódulos del tallo de la planta y transferirlos a un medio apropiado para su desarrollo. En ocasiones, la micropropagación por esta vía permite sembrar explantes con más de un segmento, para activar todos los puntos meristemáticos que se encuentren en el tejido y obtener un mayor número de plantas.

A través de este sistema es posible diseñar medios de cultivo empleando concentraciones hormonales balanceadas adecuadas para obtener la

proliferación de brotes, es decir que a partir del punto de crecimiento se obtenga un gran número de plántulas idénticas a la planta madre.

En el caso de plantas monocotiledóneas, casi siempre la propagación se realiza aislando la yema central, debido a que presentan los segmentos nodales muy cortos para establecer el sistema de propagación por esta vía.

3.6. Dicotiledóneas

Con el desarrollo de estas prácticas se pretende demostrar la propagación clonal en especies de interés comercial, proporcionando los diferentes medios de cultivo y utilizando como explantes segmentos nodales.

3.6.1. Lulo (*Solanum quitoense*)

El lulo (*Solanum quitoense*) pertenece a la familia *Solanaceae*. Es una fruta exótica muy apetecida por su agradable sabor. Actualmente se cultiva en Colombia para consumo nacional y se exporta a diferentes países.



(a)



(b)

Figura 3.9. a. Fruto de lulo; variedad Castilla. b. Micropropagación de lulo de Castilla utilizando segmentos nodales (Caro,1995).

Materiales y métodos

El material que se requiere son segmentos nodales jóvenes de lulo, variedad Castilla. Para la desinfección se utiliza alcohol antiséptico al 70 %, hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y adicionarlas en un recipiente de 1000 ml.
2. Incorporar 3 mg/L de tiamina adicional a la contenida en el medio de Murashige & Skoog (1962).
3. Añadir 0,5 mg/L de AG3.
4. Disolver las sales, los reguladores en agua destilada estéril y completar a volumen de 1L.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Pesar y añadir 30 g/L de sacarosa
7. Agregar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
8. Llevar a calentamiento y agitar constantemente hasta ebullición para evitar la formación de sólidos.
9. Servir en los recipientes adecuados y llevar a autoclave para esterilización a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua.
- Sumergir los segmentos en alcohol antiséptico al 70 % durante 5 minutos
- Introducir el material en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 % durante 15 minutos.
- Pasar el material a isodine® al 1,5 % por 40 minutos.

- Realizar tres enjuagues con agua destilada estéril.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.6.2. Guanábana (*Annona Muricata L.*)

La guanábana pertenece a la familia *Annonaceae* y su nombre científico se conoce como *Annona muricata L.* Es originaria de las regiones subtropicales de Suramérica; fue uno de los primeros árboles americanos introducidos al viejo mundo. La fruta es de forma ovalada semejante a un corazón, alcanza los 10 a 30 cm de longitud, está cubierta por una cáscara de color verde oscuro con varias espinas pequeñas, suaves y carnosas que se desprenden fácilmente cuando la fruta está madura. La aromática pulpa, con textura similar a la del algodón, es blanca, cremosa, jugosa y suave, recubre totalmente las semillas negras de 1,25 a 2 cm de largo, cada fruta puede tener hasta 200 semillas.



Figura 3.10. Fruto de *Annona muricata L.*

Materiales y métodos

Se recomienda sembrar semillas de guanábana en un sustrato que contenga aserrín. Cuando germinen se seleccionan los segmentos nodales para transferirlos a condiciones in vitro. Para la desinfección se requiere tween20®, isodine® e hipoclorito de sodio.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se debe tener en cuenta:

1. Pesar las sales del medio básico de Murashige & Skoog y pasarlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Añadir 2 mg/L de BA.
3. Adicionar 0,3 mg/L de ANA.
4. Pesar 3 mg/L de tiamina.
5. Agregar 100 mg/L de ácido ascórbico y 100 mg/L de ácido cítrico.
6. Disolver las sales y demás compuestos con agua destilada, luego llevar a volumen de 1L.
7. Ajustar el pH a 5,8.
8. Incorporar 30 g/L de sacarosa
9. Adicionar 8 g/L de Agar-agar Merck® y disolverlo hasta que hierva para evitar la formación de grumos.
10. Transferir a recipientes deseados y llevar a esterilización a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua y jabón los segmentos nodales.
- Sumergir los explantes en tween20 10 gotas/100ml durante 20 minutos.
- Introducir el material en una solución de isodine® al 3% por 30 minutos.
- Pasar los explantes a hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos.
- Lavar tres veces en condiciones asépticas con agua destilada estéril.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.



Figura 3.11. Secuencia del proceso de micropagación de Guanábana utilizando segmentos nodales (Castillo, 2005).

3.6.3. Tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

Materiales y métodos

Para el proceso de propagación a partir de segmentos nodales de tomate de árbol se utilizan las plántulas provenientes del cultivo de meristemos. Estos cultivos asépticos no requieren del proceso de desinfección.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y llevarlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 2 mg/L de tiamina.
3. Disolver las sales en agua destilada y completar a volumen de 1L.
4. Ajustar el pH a 5,8.
5. Añadir 30 g/L de sacarosa

6. Adicionar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
7. Llevar al calor y agitar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de grumos.
8. Servir en los recipientes adecuados y autoclavar a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.
9. Realizar la siembra en condiciones asépticas.

Desinfección del material

Si se dispone de material proveniente de los cultivos de tomate de árbol se procede a la desinfección de los tallos o ramas utilizando el procedimiento utilizado para el cultivo de meristemos (página 29).



Figura 3.12. Micropagación de tomate de árbol utilizando segmentos nodales (Tirado, 2003).

3.6.4. Yuca (*Manihot esculenta* L.)

Pertenece a la familia *Euforbiaceae* que comprende más de 7.000 especies distribuidas en las regiones cálidas de todo el mundo; su nombre científico se refiere a *Manihot esculenta* L. La yuca es una raíz que procede de un arbusto cultivada en los países tropicales de América,

África y Asia. Presenta una carne de color blanco, recubierta por una corteza parda o marrón oscura y de aspecto leñoso.



(a)



(b)

Figura 3.13. a.Raíces de *Manihot esculenta* L. b.Multiplicación de yuca a partir de segmentos nodales (Perea, 1996).

Materiales y métodos

El material que se requiere son segmentos nodales de yuca obtenidos de plantas in vitro, las cuales han sido transferidas previamente a partir de tallos provenientes de cultivos.

Preparación del medio de cultivo

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y llevarlas a un vaso de precipitado de 1000ml.
2. Adicionar 3 mg/L de tiamina.
3. Añadir 0,5 mg/L de piridoxina.
4. Disolver las sales y demás compuestos en agua destilada estéril hasta completar a volumen de 1L.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Agregar 30 g/L de sacarosa
7. Incorporar 8 g/L de Agar-agar Merck®.

8. Llevar al calor y agitar constantemente hasta que hierva y conseguir un medio homogéneo.
9. Servir en los recipientes adecuados y autoclavar a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.
10. Realizar la siembra en el medio de cultivo establecido en condiciones asépticas.

Desinfección del material

En caso de utilizar tallos procedentes de los cultivos de yuca se recurre al proceso de desinfección:

- Lavar los tallos con abundante agua y jabón.
- Introducir los tallos en tween20, 10 gotas/100 ml durante 20 minutos.
- Transferir el material para solución de isodine al 3 % durante 30 minutos.
- Pasar los emplantes a hipoclorito de sodio al 2% durante 30 minutos.
- Lavar por tres veces en condiciones asépticas con agua destilada esteril.
- Realizar la siembra de los segmentos nodales.

3.6.5. Papa Criolla (*Solanum phureja*)

Originaria de América tropical. El cultivo de papa criolla se extiende desde México hasta el norte de Chile. Pertenece a la familia de las solanáceas y su nombre científico es *Solanum phureja*. Botánicamente es una planta de 60 cm de alto, conformada por varios tallos herbáceos con muchas ramificaciones de donde brotan flores blancas o púrpuras que se conservan hasta el final del ciclo y hojas de color verde oscuro. El sistema radical se conforma de raíces con ramificaciones laterales y estolones a partir de los cuales se forman los tubérculos, que son órganos de reserva

de la planta. El color de los tubérculos presenta diferentes matices de amarillo; en algunos casos, presenta tintes rojos. Presenta forma redonda a ovoide, ojos o puntos vegetativos distribuidos en toda la superficie donde se localizan las yemas.



(a)



(b)

Figura 3.14. a.Tubérculos de *Solanum phureja*. b.Micropropagación de papa criolla utilizando segmentos nodales (*Perea, 1999*).

Materiales y métodos

El material que se requiere son segmentos nodales de papa criolla obtenidos de plántulas *in vitro*.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se requiere:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y transferirlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicional 3 mg/L de tiamina.
3. Disolver las sales en agua destilada estéril y completar a volumen de 1L.
4. Ajustar el pH a 5,8.

5. Añadir 30 g/L de sacarosa..
6. Adicionar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
7. Llevar al calor y agitar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de sólidos.
8. Servir en los recipientes adecuados y llevar a esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.
9. Realizar la siembra en condiciones asépticas.

Desinfección del material

Si el material procede de los cultivos de papa, se hace necesario realizar el preocesso de desinfección:

- Utilizar abundante agua y jabón para lavar los tallos, previamente se les ha eliminado las hojas.
- Sumergir los tallos en una solución de tween20 10 gotas/100 ml durante 30 minutos.
- Introducir los tallos en la solución de isodine al 3% durante 30 minutos.
- Transferir el material a la solución de hipoclorito de sodio al 2,5% por 45 minutos.
- Lavar tres veces con agua destilada esteril.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas en el medio de cultivo establecido.

3.6.6. Remolacha azucarera (*Beta vulgaris*)

La remolacha, *Beta vulgaris*, pertenece a la familia *Chenopodiaceae*; es una especie dicotiledónea bianual. En éste sentido, la planta en su primer ciclo solo crece vegetativamente, desarrollando hojas y una raíz

principal carnosa. En su segundo ciclo, luego de entrar en un receso invernal y de cumplir los requerimientos de vernalización, la planta desarrolla un tallo floral que produce gran cantidad de flores.

El principal objetivo del cultivo es la extracción de azúcar a partir de sus raíces, caso en el cual la remolacha se comporta de manera anual. En los cultivos para la obtención de la semilla, las plantas deben completar su desarrollo y ciclo, quedando de manifiesto el carácter bianual de la especie.³



(a)



(b)

Figura 3.15. a.Tubérculos de remolacha azucarera. b.Propagación clonal en remolacha azucarera (Tirado, 2004).

Materiales y métodos

El material que se requiere son semillas de *Beta vulgaris*. Para la desinfección de las semillas, se empleará isodine® e hipoclorito de sodio.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se debe tener en cuenta:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y transferirlas a un Vaso de precipitado de 1000 ml.

³http://www.uc.cl/sw_educ/cultivos/remolach/remolach.htm

2. Adicionar 2 mg/L de tiamina.
3. Añadir 0,25 mg/L de BAP.
4. Disolver las sales y los reguladores en agua destilada estéril, luego completar a volumen de 1L.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Agregar 30 g/L de sacarosa.
7. Incorporar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
8. Llevar a fuego y agitar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de sólidos.
9. Distribuir en los recipientes adecuados y llevar a esterilización en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar las semillas con abundante agua.
- Sumergirlas en solución de isodine® al 2 % por 20 minutos.
- Llevar a solución de hipoclorito de sodio al 1 % por 30 minutos
- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril en condiciones estériles.
- Realizar la siembra en el medio de cultivo en condiciones asépticas.

3.7. Monocotiledóneas

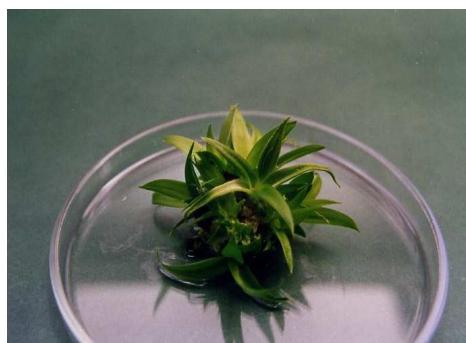
Son muchas las diferencias existentes entre plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas; y una de ellas es la forma de propagación. Las plantas presentan una única yema central de la cual se desarrollan las yemas axilares formando rosetas, que, se dividen y se siembran para realizar el preceso de multiplicación.

3.7.1. Piña (*Ananas comosus*)

La piña, *Ananas comosus*, pertenece a la familia *Bromeliaceae*; es originaria de las zonas tropicales del Brasil. Es una planta vivaz con una base formada por la unión compactada de varias hojas formando una roseta. Sus hojas son espinosas o no, dependiendo de la variedad, y miden de 30 a 100 cm de longitud.



(a)



(b)

Figura 3.16. a. Planta de piña *Ananas comosus* (Olaya, 1991).
b. Micropagación de piña utilizando la yema central (Perea & Tirado, 2000).

Materiales y métodos

El material seleccionado son coronas de piña obtenidas de cultivos comerciales. Para la desinfección se necesita hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se debe tener presente:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) e incorporarlas en un Vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Añadir 3 mg/L de tiamina.

3. Adicionar 2,5mg/L de BAP.
4. Disolver las sales con agua destilada estéril, luego completar al volumen de 1L.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Agregar 30 g/L de sacarosa.
7. Incorporar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
8. Llevar al fuego y agitar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de sólidos.
9. Distribuir en los recipientes adecuados y llevar a esterilización a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua el material.
- Retirar con cuidado el mayor número de hojas posible, sin dejar desprotegida la yema central.
- Introducir las rosetas en una solución de hipoclorito de sodio al 5,25 % por 45 minutos.
- Sumergir el material en solución de isodine® al 10 % por 30 minutos.
- Enjuagar con agua destilada estéril seis veces.
- Retirar el exceso de hojas.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.7.2. Gerbera (*Gerbera jamesonii*)

Es originaria de África del Sur; pertenece a la familia *Asteraceae*. Es una planta herbácea, vivaz, en roseta, cuyo cultivo puede durar varios años, aunque comercialmente solo interesa cultivar durante 2 a 3 años de acuerdo con cultivares y técnicas de cultivo empleadas. El sistema

radicular es pivotante en origen y, a medida que se desarrolla, se convierte en fasciculado y conformado por gruesas raíces de las que parten numerosas raicillas. Las hojas presentan forma de roseta, son alargadas, de unos 40 cm, y ligeramente hendidas en los bordes; del pecíolo de algunas de ellas evolucionarán los brotes florales, que van a desarrollar unos vástagos o pedúnculos con una inflorescencia terminal en capítulo. El pedúnculo puede ser de distintos diámetros, y su longitud depende del cultivar y de las condiciones medioambientales existentes. El capítulo floral está formado, desde el exterior hacia el interior, por varias hileras concéntricas de flores femeninas liguladas, normalmente una hilera de flores hermafroditas no funcionales y en el centro se ubican las flores masculinas. Las flores liguladas son de forma y espesor variables y de amplia gama de colores, depende del cultivar.



(a)



(b)

Figura 3.17. a.Flor de *Gerbera jamesonii*. b.Propagación de gerbera (Cortes & Mikan, 1992).

Materiales y métodos

El material requerido son los botones florales de gerbera obtenidos de cultivos bajo invernadero. Para la desinfección se utilizó hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

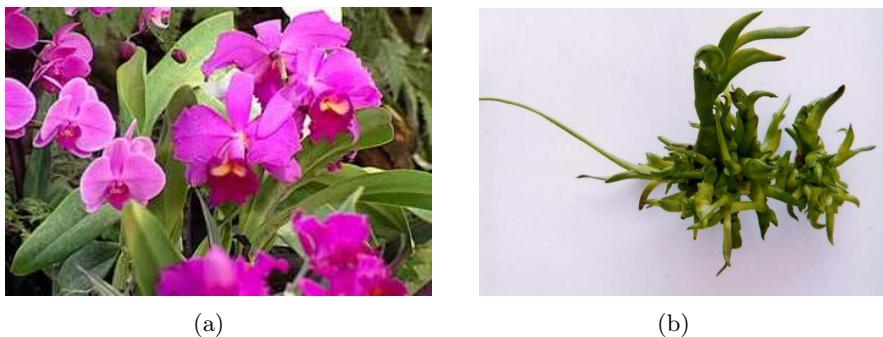
1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) e incorporarlas en un Vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 3,0 mg/L de BAP.
3. Añadir 2 mg/L de tiamina.
4. Disolver las sales y reguladores en agua destilada, luego completar a volumen de 1 litro.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Agregar 30 g/L de sacarosa.
7. Incorporar 2,0 mg/L de Gelrite Sigma®.
8. Calentar y mezclar constantemente hasta que hierva para prevenir la formación de grumos.
9. Servir en los recipientes y llevar a la autoclave a 15 psi, 121 ° C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua el material.
- Introducir los botones en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % por 20 minutos.
- Sumergir el material en solución de isodine® al 3,5 % por 30 minutos.
- Enjuagar con agua destilada estéril tres veces.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.7.3. Orquídeas (*Catleya trianae*)

Las orquídeas constituyen la familia más numerosa de plantas con en el mundo; son originarias de zonas tropicales; por tanto se encuentran en casi todos los continentes. En Colombia, han sido identificadas cerca de 3.000 especies, aunque se presume que existen muchas más porque las condiciones de diversidad climática del país garantizan el desarrollo de esta bella especie floral. Seguramente su número real es mucho mayor.



(a)

(b)

Figura 3.18. a.Flores de *Catleya trianae*. b.Micropropagación de *Catleya trianae* (Perea, 1998).

Materiales y métodos

El material requerido son plántulas de orquídeas obtenidas de material *in vitro*, las cuales deben ser transferidas al medio de cultivo para inducir el proceso de micropropagación.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se debe tener en cuenta:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) e incorporarlas en un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 1 mg/L de kinetina.
3. Agregar 1,5 mg/L de BAP.
4. Añadir 20 ml/L de agua de coco
5. Disolver las sales y los reguladores en agua destilada, luego completar a volumen de 1 litro.
6. Ajustar el pH a 5,8.
7. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
8. Adicionar 8 g/L de Agar-agar Merck®.

9. Llevar a fuego y agitar constantemente hasta que hierva para evitar que se formen grumos.
10. Distribuir en los recipientes y llevar a esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Es importante resaltar que todos los cultivos *in vitro* después de la siembra en condiciones de completa asepsia deben transferirse a la sala de crecimiento para el desarrollo de las plantas en condiciones apropiadas de luz, intensidad luminosa y temperatura.

Desinfección del material

Existe la posibilidad de utilizar yemas para la propagación clonal de orquídeas de los cultivos bajo invernadero. Para realizar la desinfección se hace necesario:

- Llevar las plantas al laboratorio para extraer las yemas y luego utilizar la solución jabonosa para eliminar
- Lavar las yemas con abundante agua.
- Introducir el material en la solución de isodine® al 3% durante 30 minutos.
- Sumergir el material en hipoclorito de sodio al 2% durante 30 minutos.
- Transferir las yemas al medio establecido en condiciones asépticas.

3.7.4. Alcachofa (*Cynara scolymus*)

Es una planta vivaz, que puede considerarse bianual o trianual; pertenece a la familia *Compositae*. Es originaria del norte de África y del sur de Europa. El tallo es erguido y grueso, posee un sistema radical extraordinariamente potente que le permite adaptarse a una extensa gama de suelos, las hojas son alargadas, pubescentes y de color verde intenso, la flor es terminal, gruesa y recubierta por escamas gruesas y fibrosas que constituyen la parte comestible.



(a)



(b)

Figura 3.19. a.Cultivo de alcachofa var. Globo verde. b.Micropropagación de alcachofa (Tirado, 2003).

Materiales y métodos

El material que se necesita para esta práctica son las yemas de la planta de alcachofa obtenidas de material de campo. Para la desinfección se requiere: Tween20®, Isodine® e hipoclorito de sodio.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se debe tener en cuenta:

1. Pesar las sales nitrogenadas del nedio Murashige & Skoog (1962) a la mitad ($NH_4 NO_3$ y KNO_3) y adicionar las sales restantes en la concentración normal en un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Añadir 1,5 mg/L de IBA.
3. Agregar 3 mg/L de tiamina
4. Disolver las sales y los reguladores en agua destilada, luego completar a volumen de 1 litro.
5. Ajustar pH a 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa
7. Adicionar 2,0 g/L de Gelrite Sigma®.

8. Calentar y mezclar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de sólidos.
9. Servir y llevar a esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua el material.
- Sumergir el material en solución de tween20 ® 15 gotas en 100ml de agua destilada estéril.
- Lavar con agua destilada estéril.
- Introducir en solución de isodine al 4.5
- Llevar a solución de hipoclorito de sodio al 2.0
- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril.
- Realizar la siembra en condiciones estériles.

3.7.5. Sábila (*Aloe Vera*)

Es una planta perenne perteneciente a la familia *Liliaceae*, mide aproximadamente 80 centímetros de altura. Es común en los jardines domésticos y crece particularmente en sitios secos. Las hojas están dispuestas en forma de rosetas alrededor del tronco, y miden de 3 a 6 centímetros de longitud; son carnosas, de forma lanceolada, con un margen espinoso, de color verde pálido. Las flores crecen en la parte superior de la planta, son tubulares y de un color rojo brillante, el fruto está conformado por una cápsula membranosa, las hojas contienen gran cantidad de jugo celular y, cuando se seca, constituye el compuesto denominado aloe o acíbar.⁴

La especie es muy utilizada en la medicina como antiinflamatoria, coagulante, cicatrizante, antibiótica y regeneradora celular. En la industria alimenticia se utiliza para la fabricación de bebidas, nutrición hu-

⁴<http://www.radiohc.cu/español/agricultura/plantasmedicinales/sabila>

mana y animal. Igualmente, se emplea en farmacia para la producción de cosméticos, cremas y geles.

Aloe vera contiene 19 aminoácidos esenciales. En cuanto a minerales están calcio, fósforo, cobre, hierro, manganeso, magnesio, potasio, sodio, además de vitaminas A, B₅, B₆, B₁₂ y C (Aloetrade, 2008)⁵.

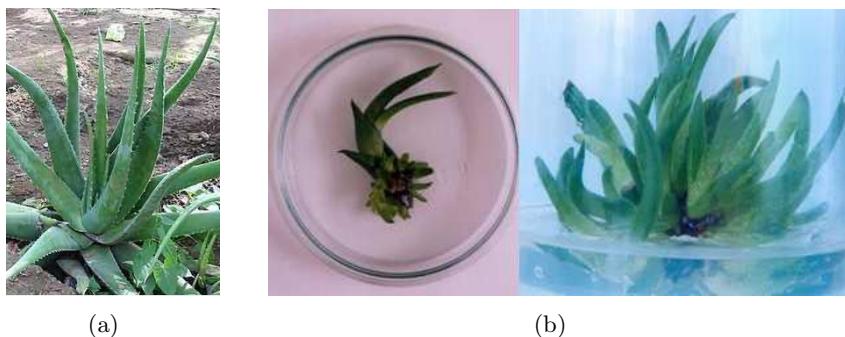


Figura 3.20. a. Planta de sábila *Aloe vera*. b. Proceso de propagación clonal de sábila (*Aloe vera*) (Tirado, 2004).

Materiales y métodos

Se seleccionan plantas de sábila obtenidas de material de campo de aproximadamente 12 cm de longitud. Para la desinfección, se requiere isodine® e hipoclorito de sodio.

Preparación del medio de cultivo

En la preparación del medio de cultivo se debe tener en cuenta:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) e incorporarlas en un Vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 2,5 mg/L de BAP.
3. Añadir 2 mg/L de tiamina.

⁵<http://www.aloetrade.com.ar>

4. Disolver las sales y los reguladores en agua destilada, luego completar a volumen de 1 litro.
5. Ajustar pH a 5,8.
6. Agregar 30 g/L de sacarosa.
7. Añadir 2,0 g/L de Gelrite Sigma®.
8. Llevar a calentamiento y mezclar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de grumos.
9. Distribuir en recipientes adecuados y llevar a autoclave para la esterilización a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con agua el material seleccionado.
- Retirar las hojas que circundan el eje central.
- Introducir el material en solución de hipoclorito de sodio al 3,5% durante 40 minutos.
- Pasar el material a solución de isodine® al 4% durante 1 hora.
- Enjuagar seis veces con agua destilada estéril.
- Retirar las hojas que se encuentran alrededor de la yema principal.

3.7.6. Ñame (*Dioscorea alata*)

Es una planta originaria del sudeste de Asia; que pertenece a la familia *Dioscoreaceae*. En Colombia se cultiva principalmente en la costa atlántica y los llanos orientales; contiene fécula abundante y constituye un importante alimento en las regiones tropicales. Se conocen más de 600 especies, caracterizadas por ser plantas primitivas, de hábito trepador y que normalmente se propagan de forma vegetativa. La especie más comercial es *Dioscorea alata*.



(a)



(b)

Figura 3.21. a. Planta de ñame *Dioscorea alata*. b. Propagación clonal de ñame.

Materiales y métodos

El material que se requiere para esta práctica son segmentos nodales de ñame, obtenidos de tubérculos asperjados con ácido giberélico (AG_3) para inducir la germinación de las yemas. Para la desinfección se requiere de Tween20®, isodine® e hipoclorito de sodio.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) e incorporarlas en un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Añadir 3 mg/L de tiamina.
3. Agregar 1 mg/L de BAP.
4. Adicionar 0,5 mg/L de AG_3 .
5. Incorporar 2,0 mg/L de putrescina.
6. Disolver las sales y los reguladores en agua destilada, luego completar a volumen de 1 litro.

7. Ajustar pH a 5,8.
8. Agregar 30 g/L de sacarosa.
9. Adicionar 2,0 g/L de Gelrite Sigma®.
10. Llevar al calor y mezclar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de sólidos.
11. Servir y llevar los medios a esterilización a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua y jabón el material.
- Sumergir el material en solución de tween20® 15 gotas en 100 ml de agua destilada estéril.
- Lavar con agua destilada estéril.
- Introducir en solución de isodine® al 3,5 % por 30 minutos.
- Llevar a solución de hipoclorito de sodio al 2,5 % por 15 minutos.
- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.7.7. Cactus (*Mammillaria elongata*)

Esta especie es originaria del oriente de México; pertenece a la familia *Cactaceae*. Es una planta espinosa con tallo cilíndrico, tubérculos cónicos en líneas transversales. Mide aproximadamente 12 cm de alto por 3 cm de diámetro cuando la planta tiene un año; sus flores son grandes de color blanco a amarillo.

Materiales y métodos

El material que se requiere para esta práctica son tallos de *Mammillaria elongata* obtenidos de material de campo. Para la desinfección se requiere de tween20®, isodine® e hipoclorito de sodio.



(a)



(b)

Figura 3.22. a.Cactus de la especie *Mammillaria elongata*. b.Propagación clonal de *Mammillaria elongata*.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales nitrogenadas del nedio Murashige & Skoog (1962) a la mitad ($NH_4 NO_3$ y KNO_3) y las demás de manera normal y añadirlas en un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 2,5 mg/L de BAP.
3. Agregar 3 mg/L de tiamina.
4. Disolver las sales y los reguladores en agua destilada, luego completar a volumen de 1 litro.
5. Ajustar pH a 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
7. Adicionar 2,0 g/L de Gelrite Sigma®.
8. Llevar al calor y mezclar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de sólidos.
9. Servir en los recipientes adecuados y llevar a esterilización en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua el material.
- Sumergir el material en solución de tween20® 15 gotas en 100 ml de agua destilada estéril.
- Lavar con agua destilada estéril.
- Introducir en solución de isodine® al 4,5 % por 40 minutos.
- Llevar a solución de hipoclorito de sodio al 2,0 % por 30 minutos.
- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.8. Organogénesis

Es considerada una de las fases más importantes dentro de los sistemas *in vitro*, puesto que a partir de cualquier segmento de la planta se obtienen los diferentes órganos requeridos para la multiplicación de plántulas. La proliferación puede lograrse con el empleo de sustancias reguladoras de crecimiento como componentes principales en un medio nutritivo. El hallazgo de las citoquininas, que en combinación con las auxinas pueden regular la formación de los brotes o raíces, ha significado el desarrollo de las tecnologías para la regeneración de plantas.

La organogénesis puede ocurrir a través de dos vías: directa y indirecta. La primera consiste en la formación de órganos a partir del explante seleccionado; y la segunda se refiere a la formación previa de callo y a la posterior formación de órganos. Este proceso puede ocasionar variabilidad genética debido a que las células pueden ser alteradas por diversos factores, lo cual lleva a la variación somaclonal.

La organogénesis implica la formación de raíces de manera directa o indirecta, que origina la rizogénesis y la formación de brotes, conocida como caulogénesis. La primera requiere mayor concentración de auxinas; la segunda, de citoquininas.

3.9. Organogénesis directa

Esta práctica, como su nombre lo indica, se refiere a la formación de nuevos órganos (raíces o brotes) a partir de diferentes partes de la planta. Se debe seleccionar material de óptima calidad con el fin de obtener resultados satisfactorios.

3.10. Rizogénesis

La rizogénesis es el proceso por el cual se genera la formación de raíces en un medio establecido, suplementado con auxinas.

3.10.1. Uchuva (*Physalis peruviana L.*)

La uchuva, *Physalis peruviana L.* pertenece a la familia *Solanaceae* y al género *Physalis*, cuenta con más de ochenta variedades que se encuentran en estado silvestre y se caracteriza porque sus frutos están encerrados en un cáliz o capacho. Originaria de los Andes suramericanos, se caracteriza por tener un fruto azucarado y buenos contenidos de vitaminas A y C, además de hierro y fósforo. Esta planta contiene gran número de metabolitos secundarios importantes para la industria, distribuidos a lo largo de cada una de las partes de la planta. Los witahanólicos, en su mayoría concentrados en las raíces, son utilizados en la producción de fármacos (Velásquez, 2005).



(a)



(b)

Figura 3.23. a.Frutos de uchuva dentro del cáliz. b.Rizogénesis directa de uchuva a partir de segmentos de hoja (Velásquez, 2005).

Materiales y métodos

El material vegetal que se utiliza en esta práctica son hojas jóvenes de *Physalis peruviana L.* (uchuva). Para la desinfección de los explantes (segmentos de hoja de 1,5 cm x 1,5 cm) se requiere de hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de rizogénesis en uchuva, se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y transferirlas en un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 2,5 mg/L de ANA.
3. Agregar 3,0 mg/L de tiamina adicional a la que incluye el medio de Murashige Skoog (1962).
4. Disolver las sales, los reguladores en agua destilada y completar a volumen de 1 litro.
5. Medir el pH del medio a 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
7. Llevar al calor y añadir 2,0 g/L de Gelrite Sigma®, mezclando constantemente hasta ebullición para evitar la formación de sólidos.
8. Servir en los recipientes y llevar a esterilización en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua destilada las hojas de uchuva.
- Transferir a la solución de isodine® en concentración de 2,5% durante 40 minutos.

- Sumergir en solución de hipoclorito de sodio al 2,0 % durante 30 minutos.
- Lavar con agua destilada estéril tres veces en la cabina de flujo laminar.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.10.2. Pitahaya (*Hylocereus triangularis*)

La pitahaya es el fruto de una planta rústica xerofítica de la familia *Cactaceae*, originaria de América tropical. Fue observada por primera vez en forma silvestre por los conquistadores españoles en México, Colombia, Centroamérica y las Antillas, quienes le dieron el nombre de pitahaya, que significa fruta escamosa. La pitahaya amarilla se comenzó a cultivar comercialmente en Colombia a comienzos de la década de los ochenta, principalmente con fines de exportación, promovida como cultivo de diversificación en zonas cafeteras por el Programa de Desarrollo y Diversificación de la Federación Nacional de Cafeteros.

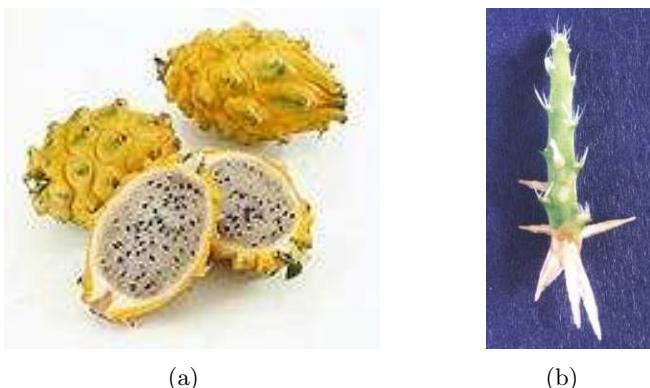


Figura 3.24. a.Fruta madura de pitahaya amarilla. b.Rizogénesis directa de pitahaya a partir de segmentos de tallo (Tirado, 2003).

Materiales y métodos

El material vegetal que se requiere son segmentos de tallo de *Hylocereus triangularis* (pitahaya). Para la desinfección de los explantes

(segmentos de tallo de 3 cm de longitud), se necesita hipoclorito de sodio, isodine® y tween20®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de rizogénesis en pitahaya, se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales nitrogenadas del medio Murashige & Skoog (1962) a la mitad ($NH_4 NO_3$ y KNO_3), las otras sales que componen el medio M & S en las cantidades normales y transferirlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. PAdicionar 0,5 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de AIB.
3. PAgregar 2,5 mg/L de tiamina adicional a la que contiene el medio Murashige & Skoog (1962).
4. PDisolver las sales, los reguladores en agua destilada y completar a volumen de 1 litro.
5. PAjustar el pH del medio a 5,8.
6. PIncorporar 30 g/L de sacarosa.
7. PAdicionar 2,0 g/L de Gelrite Sigma®.
8. PLlevar a temperatura mezclando constantemente para evitar la formación de sólidos hasta ebullición.
9. PServir en recipientes adecuados y llevar a esterilización en autoclavar a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua destilada los tallos de pitahaya.
- Sumergirlos en una solución de agua + tween20® (100 ml de agua destilada estéril y 5 gotas de tween20).
- Enjuagar con agua destilada 3 veces.

- Transferir a la solución de isodine® en concentración de 1,5 % durante 1 hora.
- Sumergir en solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 40 minutos.
- Lavar con agua destilada estéril por tres veces en cabina de flujo laminar.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.11. Caulogénesis

La caulogénesis es la base esencial de la multiplicación vegetativa apoyándose en la formación de estructuras de *novo*.

3.11.1. Maracuyá (*Passiflora edulis var. flavicarpa*)

El maracuyá, *Passiflora edulis var. flavicarpa*, o fruta de la pasión hace parte de las numerosas especies de plantas trepadoras de la familia Passifloraceae con flores características. El fruto es una baya de forma globosa; u ovoide presenta una corteza de color amarillo, de consistencia dura lisa y cerosa, posee un agradable aroma y exquisito sabor. Es originaria del Amazonas brasileño; actualmente se cultiva muy bien en Colombia en diferentes regiones.

Materiales y métodos

El material vegetal seleccionado como explantes son segmentos jóvenes de hoja de *Passiflora edulis var. flavicarpa*. Para la desinfección de los explantes, se requiere hipoclorito de sodio, isodine® y tween20®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de caulogénesis en maracuyá, se deben tener en cuenta los siguientes puntos:



Figura 3.25. a. Fruta madura de maracuyá. b. Caulogénesis directa en *Passiflora edulis* a partir de segmentos de hoja. Obsérvese la formación de los brotes (Rivera, 1997).

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y transferirlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 2 mg/L de BAP.
3. Añadir 1,5 mg/L de ANA.
4. Disolver las sales, los reguladores en agua destilada y completar a volumen de 1 litro.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
7. Agregar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
8. Calentar y mezclar continuamente hasta llevar a ebullición para disolver sólidos.
9. Servir en los recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua destilada los tallos jóvenes de maracuyá.
- Sumergirlos en una solución de agua + tween20® (100 ml de agua destilada estéril y 5 gotas de tween20®).

- Enjuagar con agua destilada 3 veces.
- Transferir a la solución de isodine® en concentración de 3 % durante 30 minutos.
- Sumergir en solución de hipoclorito de Sodio al 1,5 % durante 45 minutos.
- Lavar con agua destilada estéril tres veces en cabina de flujo laminar.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.11.2. Violeta africana (*Saintpaulia ionantha*)

Su nombre científico es *Saintpaulia ionantha*. Es una planta vivaz que forma una roseta de hojas ovaladas, carnosas y ligeramente aterciopeladas; se clasifica entre las plantas ornamentales de interior. Es muy apetecida por su belleza, requiere de lugares luminosos sin recibir directamente los rayos del Sol. Esta especie, perteneciente a la familia *Gesneriaceae*, es, como su propio nombre indica, originaria de las regiones tropicales de África. Su gran belleza y el hecho de que pueda llegar a florecer en cualquier época del año la convierten en un ejemplar muy apreciado.



(a)



(b)

Figura 3.26. a. Planta florecida de violeta africana *Saintpaulia ionantha*. b. Caulogénesis directa de violeta africana a partir de segmentos de hoja. Se observan las yemas en crecimiento (Perea, 1998).

Materiales y métodos

El material vegetal que se requiere son segmentos de hoja de *Saint-paulia ionantha* (violeta africana). Para la desinfección de los explantes (segmentos de hoja de 1,5 cm x 1,5 cm de longitud) se necesita hipoclorito de sodio, isodine® y tween20®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo en la obtención de caulogénesis directa en violeta africana, se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio básico de Murashige & Skoog (1962) y transferirlas a un recipiente (vaso de precipitado de 1000 ml).
2. Adicionar 0,08 mg/L de BAP.
3. Agregar 3 mg/L de tiamina adicional a la que contiene el medio de Murashige & Skoog (1962).
4. Mezclar todo lo anterior y completar a un volumen de 1 litro con agua destilada.
5. Ajustar pH a 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
7. Adicionar 2,0 g/L de Gelrite Sigma®.
8. Llevar a calentar y mezclar constantemente para evitar la formación de sólidos hasta que el medio hierva.
9. Servir y esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua destilada los segmentos de hoja de violeta africana.

- Sumergirlos en una solución de agua + tween20® (200 ml de agua destilada estéril y 10 gotas de tween20).
- Enjuagar con agua destilada por 3 veces.
- Transferir a la solución de isodine® en concentración de 3,5 % durante 40 minutos.
- Sumergir en solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 40 minutos.
- Lavar con agua destilada estéril tres veces en la cabina de flujo laminar.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.11.3. Melón (*Cucumis melo L.*)

El melón, *Cucumis melo L.*, posiblemente es originario de África, aunque existen reportes donde se presume su origen en Asia meridional e India. Fue introducido al Nuevo Mundo por los conquistadores; su cultivo comenzó en Centroamérica y de allí pasó a Estados Unidos y Brasil. Actualmente se cultiva en todo el continente americano (Jaramillo, 1983). Es una de las frutas de mayor importancia agroindustrial y se desarrolla en climas cálidos y secos a temperaturas de 18 a 25°C (aproximadamente). Esta fruta es apreciada por su aroma, su sabor y por su rico contenido en vitaminas A, B₁, B₂ y C, además de sodio, fibra y azúcares.

Materiales y métodos

El material vegetal que se requiere de *Cucumis melo L.* (melón) son cotiledones jóvenes de 2 días provenientes de material *in vitro* obtenido a partir de semillas.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo en el proceso caulogénesis directa de melón, se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

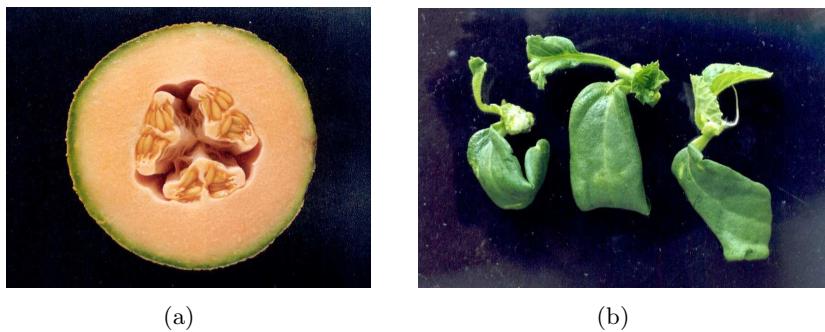


Figura 3.27. a. Fruto de melón cv. cantaloupe. b. Caulogénesis directa de Melón cv. cantaloupe a partir de cotiledones. Detállese la formación de los brotes sobre la nervadura central del explante (Tirado, 2001).

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) en concentraciones a la mitad y transferirlas a un recipiente de 1000 ml.
2. Adicionar 1.5 mg/L de kinetina.
3. Añadir 3 mg/L de tiamina adicional a la contenida en el medio Murashige & Skoog (1962).
4. Mezclar los nutrientes con agua destilada y completar a volumen de 1L.
5. Ajustar pH a 5,8.
6. Agregar 30 g/L de sacarosa.
7. Adicionar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
8. Calentar el medio y disolver totalmente el Agar-agar. Mezclar continuamente hasta ebullición para evitar la formación de grumos .
9. Servir en recipientes y esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.
10. Realizar la siembra en el medio establecido y llevar a incubación los cultivos.

3.12. Organogénesis indirecta

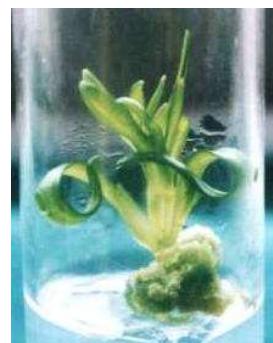
Esta práctica se refiere a la inducción de callo, previa a la formación del órgano en estudio. Es posible utilizar cualquier tipo de explante aunque la capacidad de diferenciación de las células no es igual en todas las especies. Se debe establecer el medio de cultivo adecuado.

3.12.1. Clavel (*Dianthus caryophyllus*)

Es un híbrido procedente de la región mediterránea occidental y es utilizado por los horticultores para la producción de la flor. Se encuentra gran variedad de formas y colores, los cuales han sido obtenidos a través de cruzamientos. Florece en todas las estaciones, dependiendo de las condiciones climáticas. Requiere una buena iluminación, clima templado y un terreno abonado frecuentemente. Los cultivos comerciales se ven afectados por un gran número de patógenos principalmente virus y hongos.



(a)



(b)

Figura 3.28. a.Flor de clavel. b.Organogénesis indirecta de clavel (Perea, 1999).

Materiales y métodos

El material vegetal que se necesita para esta práctica son esquejes de clavel provenientes de los cultivos de flores de la sabana de Bogotá a los cuales se les aislará el meristemo con ayuda del estereoscopio. Para

la desinfección hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo para la formación de callo y la posterior regeneración de la planta (clavel), se deben tener en cuenta los siguientes pasos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y transferirlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 1 mg/L de kinetina.
3. Agregar 3 mg/L de AG_3 .
4. Pesar 2 mg/L de ácido nicotínico.
5. Disolver los nutrientes en agua destilada y completar a volumen de 1L.
6. Añadir 30 g/L de sacarosa.
7. Ajustar a pH de 5,8.
8. Incorporar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
9. Llevar al calor y mezclar constantemente el medio de cultivo para evitar la formación de grumos.
10. Servir en los recipientes adecuado y esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua los esquejes provenientes de campo.
- Llevarlos a solución de isodine® al 3 % durante 40 minutos.
- Sumergirlos en solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % durante 20 minutos.
- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril.

- Realizar la disección del meristemo con ayuda del estereoscopio.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.12.2. Taco de reina (*Tropaeolum majus*)

Tropaeolum majus es una especie ornamental, nativa de las montañas de México, Chile y Argentina. Existe una amplia variedad de cultivos con tonalidades púrpuras, amarillo y naranja, siendo más frecuentes las de color naranja. Además de ser utilizada para decoración, también es importante en usos medicinales y hortícolas.



(a)



(b)

Figura 3.29. a.Flores de *Tropaeolum majus*. b.Organogénesis indirecta de *Tropaeolum majus* (Matallana, 2004).

Materiales y métodos

El material vegetal que se requiere son segmentos de hoja provenientes de plantas de campo. Para la desinfección se necesita hipoclorito de sodio, isodine® y tween20®.

Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio para la formación de callo y su regeneración en *Tropaeolum majus*, se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) e incorporarlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 1 mg/L de 2,4-D.
3. Agregar 0,5 mg/L de BAP.
4. Disolver las sales y reguladores en agua destilada, luego completar a volumen de 1L.
5. Ajustar a pH de 5,8.
6. Añadir 30 g/L de sacarosa.
7. Adicionar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
8. Llevar al calor y mezclar constantemente el medio de cultivo hasta ebullición para evitar la formación de grumos.
9. Servir en los recipientes y esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar las hojas con abundante agua.
- Sumergir las hojas en tween20® (5 gotas en 500 ml de agua destilada estéril) durante 2 minutos.
- Llevar los explantes a una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 10 minutos.
- Sumergir el material en isodine® al 3% por 10 minutos.
- Lavar los explantes tres veces con agua destilada estéril.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

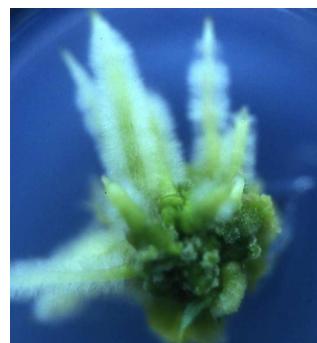
3.13. Rizogénesis

3.13.1. Kiwi (*Actinidia chinensis*)

El kiwi pertenece a la familia *Actinidiaceae* y su nombre científico es *Actinidia chinensis*. Es una planta trepadora originaria de las montañas de China. Considerada con un alto contenido de vitamina C, E y abundante fibra, es baja en colesterol. Produce efectos anticancerígenos, tiene capacidad antioxidante y antiinflamatoria, mejora el sistema inmunológico y aumenta las defensas en el organismo (Polo, 1991).



(a)



(b)

Figura 3.30. a. Frutas maduras de kiwi. b. Rizogénesis indirecta en kiwi a partir de segmentos de hoja (Polo, 1991).

Materiales y métodos

El material vegetal que se utiliza son segmentos de hojas jóvenes de *Actinidia chinensis* provenientes de campo aproximadamente de (1,5 cm x 1,5 cm). Para la desinfección, se requiere isodine® e hipoclorito de sodio.

Preparación del medio de cultivo

En la preparación del medio de cultivo para la obtención de la rizogénesis en kiwi, se debe tener en cuenta:

1. Pesar las sales nitrogenadas del medio Murashige & Skoog (1962) a la mitad ($NH_4 NO_3$ y KNO_3) y las sales adicionales en concentraciones normales, incorporarlas en un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 0,25mg/L de BAP.
3. Añadir 1 mg/L de kinetina.
4. Agregar 0,3 mg/L de ANA.
5. Disolver las sales, los reguladores con agua destilada, luego completar a volumen de 1L.
6. Ajustar el pH a 5,8.
7. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
8. Agregar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
9. Calentar el medio y mezclar constantemente hasta ebullición evitando la formación de grumos.
10. Distribuir en recipientes y esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua destilada las hojas de kiwi.
- Llevarlas a solución de isodine® al 3 % por 40 minutos.
- Introducirlas en solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % por 20 minutos.
- Enjuagar con agua destilada estéril y realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.13.2. Maracuyá (*Passiflora edulis var. flavicarpa*)

Materiales y métodos

El material vegetal que se utiliza son segmentos jóvenes de tallo de *Passiflora edulis var. flavicarpa*. Para la desinfección de los explantes (segmentos de tallo de 3 cm de longitud), se requiere hipoclorito de sodio, isodine® y tween20®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de caulogénesis en maracuyá, se deben tener en cuenta los siguientes pasos:

1. Pesar las sales del medio Nitsch & Nitsch 1967 (tabla anexos) y verterlas en un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 2,0 mg/L de kinetina.
3. Disolver las sales, los reguladores con agua destilada hasta completar a volumen de 1L.
4. Ajustar el pH a 5,8.
5. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
6. Agregar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
7. Llevar al calor y mezclar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de grumos.
8. Servir en los recipientes y autoclavar a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua destilada los tallos jóvenes de maracuyá.
- Sumergirlos en una solución de agua más tween20® (100 ml de agua y 5 gotas de tween20®).

- Enjuagar con agua destilada 3 veces.
- Sumergir en solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % durante 45 minutos.
- Transferir a la solución de isodine® en concentración de 3 % durante 30 minutos.
- Lavar con agua destilada estéril tres veces en la cabina de flujo laminar.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.



Figura 3.31. Rizogénesis indirecta de maracuyá (Rivera, 1997).

3.14. Cultivo de callo

Los callos son conjuntos de células sin diferenciación, los cuales son utilizados en los procesos *in vitro* para innumerables objetivos, como la transformación genética, la producción de metabolitos secundarios, el cultivo de células en suspensión y embriogénesis somática. Los callos pueden originarse a partir de cualquier parte de la planta con un balance hormonal de auxina/citoquinina moderado.

Los resultados pueden generar la formación de callo friable o callo compacto. Estos se diferencian en la suavidad del tejido y en su fácil manipulación; se recomienda utilizar callo friable, pues este permite mejor disociación de células y rápido crecimiento.

El cultivo de callos puede multiplicarse a través de subcultivos cada 30 a 45 días dependiendo de la especie; generalmente se utiliza el

mismo medio de cultivo de formación para la proliferación celular. Los callos pueden ser utilizados posteriormente para diversos estudios en los sistemas *in vitro*.



Figura 3.32. Desarrollo del callo friable de alfalfa *Medicago sativa* (Perea & Tirado, 2000).

3.14.1. Alfalfa (*Medicago sativa*)

La alfalfa pertenece a la familia de las leguminosas, cuyo nombre científico es *Medicago sativa*. Se trata de una planta perenne, vivaz y de porte erecto. Se considera una fuente alta de vitaminas y minerales. Su área de origen es Asia menor y sur del Cáucaso, abarcando países como Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán.

Por ser una especie pratense y perenne, su cultivo aporta elementos de interés, pues limita y reduce la erosión y determinadas plagas y enfermedades de los cultivos que le siguen en la rotación.

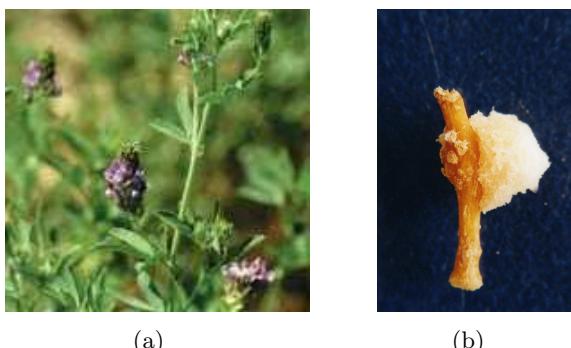


Figura 3.33. a. Plantas de alfalfa *Medicago sativa*. b. Formación de callo de alfalfa a partir de segmentos de tallo (Perea & Tirado, 2002).

Materiales y métodos

Como material vegetal seleccionado, se utilizan segmentos de tallo de 2,5 cm de largo. Para la desinfección se requiere hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio en la obtención de callo de alfalfa se debe tener en cuenta:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y pasarlas a un recipiente de 1000 ml.
2. Agregar 0,5 mg/L de AG_3 .
3. Adicionar 1,0 mg/L de BAP.
4. Disolver lo anterior en agua destilada hasta completar 1L de volumen.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
7. Añadir 8 g/L de Agar-agar Merck®.
8. Llevar al calor y mezclar constantemente hasta ebullición para evitar la formación de sólidos.
9. Se distribuye en recipientes adecuados y se lleva a esterilización en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con agua el material vegetal (segmentos de tallo).
- Cortar los explantes de 1cm de longitud.
- Llevar el material a una solución de isodine® al 4% durante 30 minutos

- Sumergirlos en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% durante 35 minutos.
- Lavar con agua destilada estéril, por tres veces consecutivas en cabina de flujo laminar.
- Realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.14.2. Melón (*Cucumis melo L.*)

Materiales y métodos

El material vegetal que debe utilizarse son brotes jóvenes de *Cucumis melo L.* (melón) provenientes de material *in vitro* a partir de semillas.

Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo para la formación de callo en melón debe tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y ponerlas en un recipiente de 1000 ml.
2. Adicionar 2 mg/L de BAP.
3. Añadir 3 mg/L de tiamina.
4. Disolver los nutrientes en agua destilada y llevarlo a volumen de 1L.
5. Ajustar a pH de 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
7. Agregar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
8. Llevar a calentar y con agitación constante hasta ebullición para evitar la formación de sólidos.
9. Envasar en los recipientes y llevar a esterilización en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Inducción de callo

Para la inducción de callo en melón, se utilizan las plántulas germinadas *in vitro*; se toman las yemas apicales y se transfieren al medio de cultivo establecido. Los cultivos se llevan a la sala de crecimiento a 22 °C ± 1, fotoperiodo 16/8 e intensidad lumínica 1000 lux.

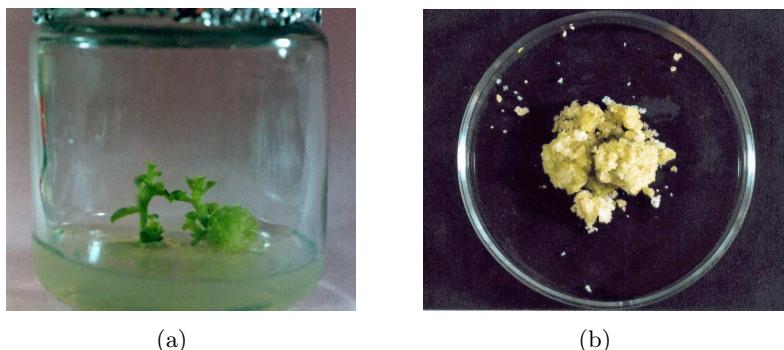


Figura 3.34. a. Formación de callo friable a partir de brotes de melón utilizando 2mg/L de BAP (Tirado, 2001). b. Subcultivo y desarrollo del callo friable de melón (Tirado, 2001).

3.15. Embriogénesis somática

Los embriones somáticos o asexuales pueden resultar de un proceso de diferenciación directa o indirecta a partir de células, órganos o callos de una planta, es decir, sin necesidad de fusión de gametos. La embriogénesis somática fue definida por Haccius (1978) como el proceso por el cual se forma un nuevo individuo a partir de una sola célula, la cual carece de conexiones vasculares con el tejido parental.

Los embriones somáticos son aptos para crecer y diferenciarse hasta formar plantas normales. Pueden originarse de manera directa o indirecta, es decir, con previa formación de callo ó, por el contrario, la formación de estructuras globulares a partir del tejido de partida cuando esta es directa. Los embriones somáticos pasan por los mismos estadios de los embriones sexuales: globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar (Parrot et ál. 1988).

Posterior a la formación de los embriones somáticos, debe ocurrir una serie de eventos hasta la obtención de las plántulas: la proliferación, maduración y germinación. Cada una de estas etapas requiere la adición de compuestos químicos apropiados para un óptimo desarrollo.

La embriogénesis somática puede verse afectada por diferentes factores. El tipo de explante es indispensable, ya que no todos los tejidos presentan capacidad de desdiferenciación y diferenciación, por lo que se aconseja utilizar tejidos jóvenes como cotiledones, hipocótilos y embriones (Litz & Jarret, 1991). El medio de cultivo es otro factor importante; generalmente se utiliza el medio propuesto por Murashige & Skoog (1962) debido a los altos niveles de sales, especialmente nitrógeno, lo cual permite un apropiado desarrollo. Es aconsejable suministrar al medio reguladores de crecimiento teniendo en cuenta el genoma de la planta y el tipo de explante. Evans et ál. (1981) consideran que la mayoría de los sistemas embriogénicos requieren la presencia de auxinas, generalmente 2,4-D, además de factores de crecimiento, como las condiciones del medio ambiente, es decir, temperatura, humedad, fotoperiodo, intensidad de la luz, principalmente. Estas prácticas buscan la formación de estructuras embrionarias a partir de células somáticas, para obtener mayor número de plantas utilizando estos precesos.

Cuadro 3.1. Comparación entre embriones cigóticos y embriones somáticos (Córdoba, 2005).

EMBRIONES CIGÓTICOS	EMBRIONES SOMÁTICOS
Formados por el óvulo fertiizado	Se forman de células somáticas o gaméticas aisladas, sin requerirse la fusión de gametos
Información genética altamente variable	Información genética idéntica a la del parental
Organización bipolar (eje-apical-radical)	Organización bipolar (eje-apical-radical)
Con suspensor (columna de células efímera que une el embrión con la célula basal del tejido parental y determina su desarrollo)	Carecen de suspensor que lo une con el tejido materno
	Carece de reservas alimenticias, de cubierta seminal y de megaesporofito (Parrot et ál.,1991)

La presencia del saco embrionario es importante para su desarrollo	
Siempre sexuales	Naturalmente asexuales
	Se pueden originar de cualquier clase de células, siempre y cuando tengan las condiciones y los estímulos adecuados
	In vitro pueden formarse a partir de callo o sin la presencia de este

3.15.1. Sábila (*Aloe Vera*)



(a)



(b)

Figura 3.35. Inducción de la embriogénesis somática de *Aloe vera*. Obsérvese la formación y el desarrollo de las estructuras embrionarias (Tirado, 2004).

Materiales y métodos

Las plantas seleccionadas de sábila obtenidas de material de campo de 12 cm de longitud aproximadamente. Para la desinfección, se necesita isodine® e hipoclorito de sodio.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) e incorporarlas en un Vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 2,5 mg/L de BAP.
3. Añadir 2 mg/L de tiamina.
4. Agregar 0,5 mg/L de 2,4-D.
5. Disolver lo anterior con agua destilada y completar a volumen de 1L.
6. Ajustar pH a 5,8.
7. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
8. Añadir 2,0 g/L de Gelrite Sigma®.
9. Llevar a calentamiento y agitar constantemente hasta ebullición para prevenir la formación de masas.
10. Servir y llevar a esterilización.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua el material en estudio.
- Retirar las hojas hasta dejar de 3 a 4 hojas.
- Transferir los explantes a solución de isodine® al 4 % durante 1 hora.
- Introducir el material en solución de hipoclorito de sodio al 3,5 % durante 40 minutos.
- Enjuagar seis veces con agua destilada estéril
- Llevar los explantes al medio de cultivo en condiciones asépticas y transferirlos a incubación ($24^{\circ}\text{C} \pm 1$).

3.15.2. Orquídeas (*Epidendrum ruizianum*)

Materiales y métodos

El material que se necesita son plántulas de orquídea obtenidas a partir de la germinación de las semillas. Para la desinfección se requiere isodine® e hipoclorito de sodio.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) e incorporarlas en un Vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 1 mg/L de TDZ.
3. Añadir 2 mg/L de tiamina.
4. Agregar 1 mg/L de 2,4-D.
5. Adicionar 0,5 mg/L de niacina.
6. Agregar 0,5 mg/L de piridoxina.
7. Disolver las sales, vitaminas en agua destilada y completar a volumen de 1L.
8. Ajustar pH a 5,8.
9. Pesar 30g/L de Sacarosa
10. Incorporar 8,0 g/L de Agar-agar Merck®.
11. Llevar al calor y mezclar constantemente hasta ebullición para prevenir la formación de sólidos.
12. Servir y llevar a esterilización en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con agua y jabón las cápsulas de orquídea.
- Sumergirlas en solución de isodine al 4 % por 40 minutos.
- Transferir las cápsulas a una solución de hipoclorito de sodio al 3 % por 30 minutos.
- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril en la cabina de flujo laminar.
- Abrir cuidadosamente las cápsulas y espolvorear las semillas sobre la superficie del medio de cultivo establecido.



(a)



(b)

Figura 3.36. a.Flores de *Epidendrum ruizianum*. b.Formación de estructuras embrionarias de *Epidendrum ruizianum* (Peláez, 2002).

3.15.3. Mango (*Mangifera indica L.*)

El mango *Mangifera indica L.* pertenece a la familia *Anacardiaceae*, es originario de la India y actualmente se cultiva en un gran número de países. Los frutos son de forma redonda, ovalada, arriñonada y acorazonada, dependiendo de la variedad. Su color oscila desde el amarillo hasta el naranja, y su peso y tamaño es variable. Es muy apetecido por su sabor y aroma.

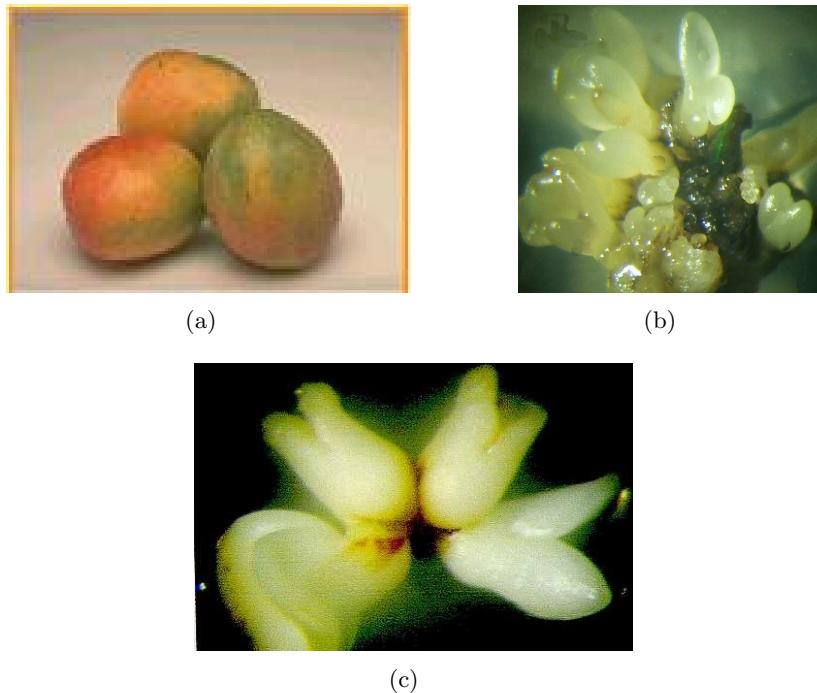


Figura 3.37. a. Frutos de *Mangifera indica L.* b. Formación de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo en *Mangifera indica L.* (Córdoba, 2005). c. Embriones somáticos en estadio intermedio. Se evidencia la polaridad y la presencia de una estructura semejante al suspensor que los mantiene unidos en su origen al tejido materno (Córdoba, 2005).

Materiales y métodos

El material que se requiere para la formación de embriones somáticos en mango es tejido nuclear diferenciado; por ejemplo, embriones adventicios de 5 a 6 mm de longitud, provenientes de frutos inmaduros de aproximadamente 2 a 3 cm. Para la desinfección se utiliza tween20®, hipoclorito de sodio, alcohol antiséptico al 70 % e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se deben tener en cuenta:

1. Pesar las sales del medio Pateña y Barba (2002) e incorporarlas en un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 60 mg/L de ácido cítrico.
3. Añadir 60 mg/L de ácido ascórbico.
4. Agregar 40 mg/L de cisteina.
5. Agregar 1 mg/L de 2,4-D.
6. Adicionar 0,2 mg/L de TDZ.
7. Añadir 100 ml/L de agua de coco.
8. Disolver las sales y reguladores en agua destilada, luego completar a volumen de 1L.
9. Ajustar pH a 5,8.
10. Incorporar 40 g/L de sacarosa.
11. Añadir 8,0 g/L de Agar-agar Merck®.
12. Llevar al calor y mezclar constantemente hasta ebullición para prevenir la formación de sólidos.
13. Servir y llevar a esterilización en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar el material con agua y jabón, con ayuda de un cepillo suave.
- Sumergir los frutos en solución tween 20 al 5 % durante 15 minutos (5 gotas en 100 ml de agua destilada estéril).
- Llevarlos a solución de isodine® al 3 % durante 30 minutos y luego en alcohol antiséptico (70 %) durante 5 minutos.

- Transferirlos a una solución de hipoclorito de sodio al 4,5% durante 60 minutos.
- Enjuagar tres veces en cabina con agua destilada estéril.
- Realizar cuidadosamente la disección del fruto y extraer el tejido nucelar y sembrarlo en el medio de cultivo.
- Transferir a la sala de crecimiento a $22^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Cuadro 3.2. Composición del medio Pateña y Barba (2002).

	Elemento	Concentración (mg/L)
Macroelementos	KNO_3	250
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 * 4\text{H}_2\text{O}$	90
	$\text{MgSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$	100
	NH_4NO_3	180
	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	300
Microelementos	$\text{MnSO}_4 * \text{H}_2\text{O}$	0.65
	H_3BO_3	0.10
	$\text{ZnSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$	0.10
	$\text{CuSO}_4 * 5\text{H}_2\text{O}$	0.02
	Fe-EDTA	25
Vitaminas y aminoácidos	Tiamina-HCL	10
	Piridoxina-HCL	10
	Ácido Nicotínico	5
	Glicina	2
	Mio-Inositol	100
Antioxidantes	Glutamina	0.4g/L
	Ácido Ascórbico	60
	Ácido Cítrico	60
	L-Cisteína	60
Otros	Sacarosa	40g/L
	Agua de coco	100ml/L
	Agar	8g/L

3.16. Microtuberización

El proceso de microtuberización ha sido establecido para especies tuberosas y se ha introducido como una forma rápida y segura de producir material genético, con propósitos de mejoramiento; ofrece las siguientes alternativas.

- a. Obtención de tubérculos en cualquier época del año.
- b. Almacenamiento (bancos de germoplasma).
- c. Material de partida para investigación en cultivo de tejidos.
- d. Material apropiado para establecer cultivos en campo, permitiendo un escalonamiento de la producción.

El sistema de tuberización en condiciones *in vitro* está influenciado por una serie de factores en el medio de cultivo, por ejemplo, la adición de reguladores de crecimiento, fundamentalmente citoquininas, la presencia de antigiberelinas como cloruro de clorocolina (CCC), y el aumento de la concentración de sacarosa 6–9 % (Orellana, 1998).

Estas prácticas se orientan a la formación de microtubérculos a partir de segmentos nodales de la planta.

3.16.1. Ñame (*Dioscorea alata*)

Materiales y métodos

El material que se requiere para esta práctica son segmentos nodales de ñame obtenidos de tubérculos que han sido asperjados con AG_3 . Para la desinfección se requiere de tween20®, isodine® e hipoclorito de sodio.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

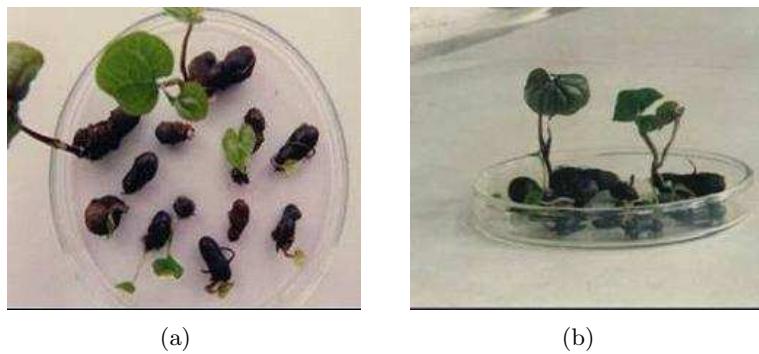


Figura 3.38. Microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata*). Obsérvese el inicio de la germinación (Perea & Tirado, 2000).

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y añadirlas en vaso de precipitado de 1000 ml.
 2. Añadir 3 mg/L de tiamina.
 3. Agregar 1 g/L de cloruro de clorocolina (CCC).
 4. Disolver las sales en agua destilada y completar a 1L de volumen.
 5. Ajustar pH a 5,8.
 6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
 7. Adicionar 8,0 g/L de Agar-agar Merck®.
 8. Llevar al calor y agitar constantemente hasta ebullición para evitar la formación de sólidos.
 9. Servir y llevar al autoclave a 15 psi, 121 °C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con abundante agua y jabón el material.
 - Sumergir el material en solución de tween20® 15 gotas en 100 ml de agua destilada estéril.
 - Lavar con agua destilada estéril.

- Introducir en solución de isodine al 3,5 % por 30 minutos.
- Llevar a solución de hipoclorito de sodio al 2,0 % por 15 minutos.
- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril.
- Realizar la siembra de los segmentos nodales en el medio de cultivo y transferirlos a condiciones de crecimiento.

3.16.2. Papa Var. Capiro (*Solanum Tuberosum*)

Materiales y métodos

El material que se requiere son segmentos nodales de Papa var. capiro obtenidos de plántulas *in vitro*.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y transferirlas a un Vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 3 mg/L de tiamina.
3. Agregar 500 mg/L de cloruro de clorocolina (CCC).
4. Disolver lo anterior con agua destilada y completar a volumen de 1L.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Añadir 30 g/L de sacarosa.
7. Incorporar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
8. Llevar a fuego y agitar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de sólidos.

9. Distribuir el medio en los recipientes adecuados y llevar a esterilización en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.
10. Para agilizar el proceso de microtuberización, se recomienda utilizar el material *in vitro*, en este caso se dispone de los tallos de papa asépticos.

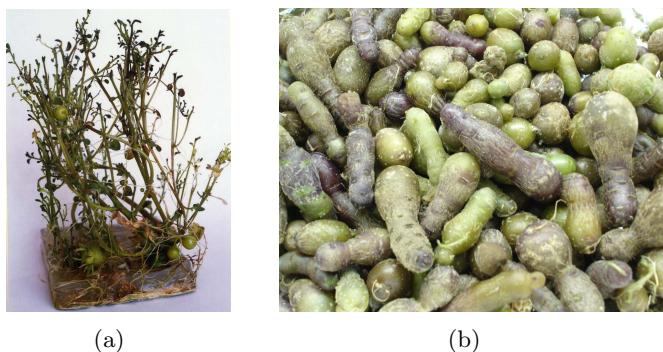


Figura 3.39. a. Formación de microtubérculos (*Solanum Tuberosum Var. Capiro*) (Perea & Tirado, 2001). b. Microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum Var. Capiro*) (Perea & Tirado, 2001).

3.17. Rescate de embriones

El cultivo de embriones se ha utilizado para diferentes propósitos, entre otros para estudiar los requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo, rescatar embriones híbridos que se hayan derivado de cruzamientos interespecíficos, producir monoploidies y superar la latencia en semillas de algunas especies vecalcitantes. El desarrollo de los embriones en plantas se caracteriza por presentar dos estados: el estado temprano, heterotrófico, y el estado tardío, autotrófico. Los embriones globulares heterotróficos se desarrollan a expensas del endosperma y poseen una baja capacidad de síntesis; el crecimiento de los embriones en fase de corazón depende de nutrientes como hormonas, aminoácidos, carbohidratos, proteínas y vitaminas que se encuentran en el saco embrionario (Litz y Jarret, 1991).

Otra aplicación práctica del cultivo de embriones es el rescate del material de propagación con baja viabilidad, además de la obtención de

híbridos en especies en las cuales el embrión presenta aborto con mucha frecuencia.

Estas prácticas consisten en el aislamiento del embrión de la semilla, con el propósito de cultivarlo aislado en un medio de cultivo adecuado. Hanning (1940) fue el primero en demostrar que era posible remover de los óvulos de la planta los embriones y cultivarlos en medio estéril con nutrientes esenciales que permitan desarrollarlos y hacerlos germinar.

3.17.1. Melón (*Cucumis melo L.*)

Materiales y métodos

El material necesario para esta práctica son semillas de melón provenientes de frutos seleccionados. Para la desinfección se requiere de alcohol antiséptico al 70 %, hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y ponerlas en un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 2 mg/L de tiamina.
3. Añadir 0,5 mg/L de AG_3 .
4. Disolver las sales, adicionar reguladores en agua destilada y completar a volumen de 1L.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
7. Adicionar 8 g/L de Agar-agar Merck®.
8. Llevar al calor, agitar constantemente hasta ebullición para evitar la formación de grumos.

9. Servir en los recipientes adecuados y llevar al autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.



Figura 3.40. Cultivo de embriones de melón; germinación a los ocho días (Tirado, 2000).

Desinfección del material

- Retirar el mucílago de las semillas.
- Lavar con abundante agua.
- Sumergir en alcohol al 70 % por 10 segundos.
- Introducir el material en Hipoclorito de Sodio al 1 % por 20 minutos.
- Llevar las semillas a una solución de isodine® al 0,5 % por 10 minutos.
- Enjuagar tres veces en la cabina de flujo laminar con agua destilada estéril.
- Retirar la testa con ayuda del equipo de disección y realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.17.2. Papaya (*Carica papaya L.*)

La papaya, *Carica papaya L.*, pertenece a la familia de las *Caricaceae*, nativa de Centroamérica, posiblemente en el sur de México y el norte de Nicaragua. Se le considera una hierba gigante y no un árbol debido a que no posee madera en su tallo, que en ocasiones puede alcanzar hasta

8 metros o más de altura. Las flores son grandes, blancas de 5 pétalos y 5 sépalos; se desarrollan en el tallo cerca de la inserción de las hojas en el mismo. Pueden ser de sexo masculino, sin ovario desarrollado; femenino, sin estambres; y hermafroditas, con estambres y ovarios. El sexo de las flores determina el de las plantas y, en consecuencia, la producción y las características de los frutos. Los frutos son bayas de diferentes formas y tamaños, dependiendo del tipo de flor que los origina, desde casi esféricos, redondeados, cilíndricos o alargados y con pesos que oscilan entre 200 gramos y 8 kilogramos. Este cultivo ha sido seriamente afectado por enfermedades causadas por virus y otros organismos. En Colombia, la incidencia de estas enfermedades son el mayor problema. Quizás; la de mayor prevalencia; sea la causada por el virus de la mancha anular de la papaya (PRV), que ocasiona pérdidas hasta de 60 % en las plantaciones comerciales.



(a)



(b)



(c)

Figura 3.41. a.Frutas maduras de *Carica papaya var.* Maradol y Tainung (Olaya, 1991). b.Cultivo de embriones de papaya (Bustamante & Tirado, 2005). c.Embrión cigótico de papaya (Torres, 1993).

Materiales y métodos

El material que se requiere son semillas de papaya provenientes de frutos seleccionados de las variedades taynoon y maradol. Para la desinfección se necesita alcohol antiséptico al 70 %, hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y pasarlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 3 mg/L de tiamina.
3. Añadir 1,5 mg/L de AG_3 .
4. Disolver las sales, reguladores en agua destilada y completar a volumen de 1L.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
7. Adicionar 2 g/L de Gelrite Merck®.
8. Calentar y agitar constantemente hasta ebullición para evitar la formación de grumos.
9. Servir en los recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Extraer las semillas de frutos seleccionados.
- Eliminar el mucílago de las semillas.
- Sumergir las semillas en alcohol antiséptico al 70 % por 3 minutos.

- Llevar el material a una solución de Hipoclorito de Sodio al 2 % por 20 minutos.
- Transferir el material a una solución de isodine al 2 % por 30 minutos.
- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril en la cabina de flujo laminar.
- Extraer el embrión y realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.17.3. Naranja (*Citrus sinensis L.*)

El origen de los cítricos se remonta alrededor de 20 millones de años en el sudeste asiático. Desde entonces hasta ahora se han generado numerosas modificaciones debidas a la selección natural y a hibridaciones naturales o producidas por el hombre. La dispersión de los cítricos desde sus lugares de origen se debió fundamentalmente a los grandes movimientos migratorios. La naranja, *Citrus sinensis L.* pertenece a la familia *Rutaceae* es apetecida en todo el mundo por su agradable sabor y su alto contenido de vitamina C.

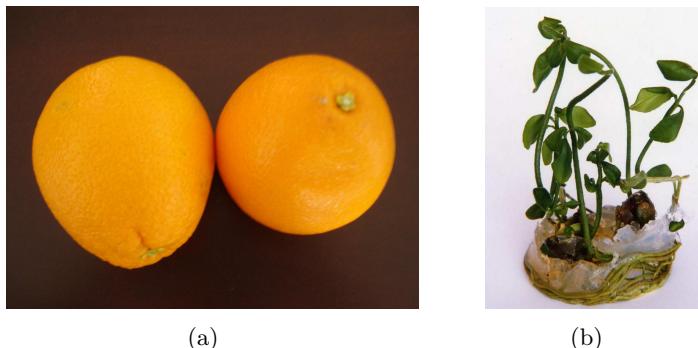


Figura 3.42. a.Naranjas maduras de la variedad tangelo. b.Cultivo de embriones de naranja (Tirado & Perea, 2000).

Materiales y métodos

El material requerido son semillas de naranja provenientes de frutos seleccionados. Para la desinfección se necesita alcohol antiséptico al 70 %,

hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y llevarlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Adicionar 3 mg/L de tiamina.
3. Agregar 2,5 mg/L de AG_3 .
4. Disolver las sales, los reguladores en agua destilada y completar a volumen de 1L.
5. Ajustar el pH a 5,8.
6. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
7. Adicionar 2 g/L de Gelrite Merck®.
8. Llevar al calor, agitar constantemente hasta ebullición para evitar la formación de grumos.
9. Servir en los recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar las semillas con abundante agua.
- Sumergir las semillas en alcohol antiséptico al 70 % por 5 minutos.
- Llevar el material a una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 % por 30 minutos.
- Transferir el material a una solución de isodine al 2,5 % por 40 minutos.

- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril en la cabina de flujo laminar.
- Extraer los embriones y realizar la siembra en condiciones asépticas.

3.17.4. Orquídeas (*Catleya trianae*)

Las semillas de la orquídea son conocidas comúnmente como semillas de polvo debido a que son muy pequeñas y contienen poca reserva de alimento. Usualmente no germinan en el medio natural, a menos que sean infectadas por un hongo micorriza que les proporcione los carbohidratos y los nutrientes necesarios para que la planta pueda desarrollarse. En consecuencia, se recurre a las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en donde las semillas pueden germinar sin la ayuda de este tipo de microorganismos.

Materiales y métodos

Para esta práctica se requiere de cápsulas verdes de orquídeas. Para la desinfección, hipoclorito de sodio e isodine®.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se deben tener en cuenta:

1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y ponerlas en un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Añadir 1 mg/L de AG_3 .
3. Adicionar 10 ml/L de agua de coco.
4. Agregar 3 mg/L de tiamina.
5. Disolver con agua destilada y completar a volumen de 1L.
6. Ajustar el pH a 5,8.

7. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
8. Adicionar 2 g/L de Gelrite Merck®.
9. Calentar y agitar constantemente hasta que hierva para evitar la formación de grumos.
10. Distribuir el medio en los recipientes adecuados y llevar a autoclave a 15 psi, 121°C durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con agua y jabón las cápsulas de orquídea.
- Sumergirlas en solución de isodine al 4% por 40 minutos.
- Transferir las cápsulas a una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 30 minutos.
- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril en la cabina de flujo laminar.
- Abrir cuidadosamente las cápsulas y espolvorear las semillas en los recipientes que contienen el medio de cultivo.
- Llevar a incubación en condiciones de luz u oscuridad, temperatura $18^{\circ}\text{C} \pm 1$.

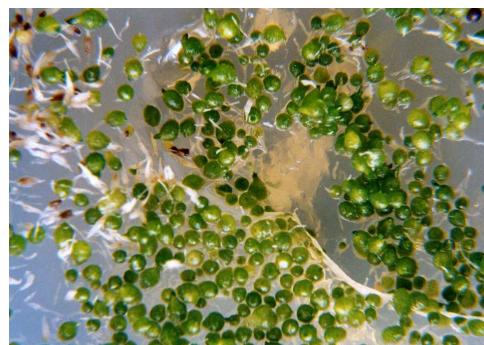


Figura 3.43. Cultivo de embriones de Orquídea *Catleya trianae* (Orozco, 1987).

3.18. Cultivo de anteras y polen

El propósito de cultivar anteras y polen radica en producir plantas haploides mediante la inducción de la embriogénesis somática a partir de microesporas o granos de polen inmaduros. Al contener la mitad del número cromosómico (n), las plantas haploides pueden utilizarse en programas de fitomejoramiento para seleccionar características deseables o bien para desarrollar líneas homocigóticas para la producción de híbridos en especies incompatibles entre sí (Dodds y Roberts, 1982).

La metodología utilizada para llevar a cabo este tipo de prácticas consiste en:

- Colectar capullos florales o inflorescencias de la especie deseada.
- Desinfectarlos superficialmente con hipoclorito de sodio e isodine®.
- Extraer las anteras y realizar la siembra.

Entre los factores requeridos para el éxito de la androgénesis se encuentran:

- **Planta madre:** se debe elegir la planta que presente buenas características fisiológicas.
- **Composición de medio de cultivo:** los componentes del medio son factores importantes no solo para el establecimiento de los cultivos *in vitro* sino también para la obtención de respuestas específicas.
- **Temperatura:** se ha observado que cuando se realiza el pretratamiento en frío, 2-4 °C a las anteras, se producen mejores respuestas androgenéticas.

Para la inducción de la androgénesis es importante establecer el estado de desarrollo del polen. El test de la viabilidad es recomendable debido a que en el momento de la inoculación se requiere que los granos de polen se encuentren en estado uninucleado (temprano, medio o tardío), dependiendo de la especie.

3.18.1. Bananos y plátanos (*Musa ssp*)

Materiales y métodos

Seleccionar las inflorescencias de 8 semanas de desarrollo del clon diploide Tani (BB), someterlas a un pretratamiento frío a 4 °C durante 48h. Para realizar la observación microscópica de la antera y evidenciar el estado de desarrollo de la microspora (uninucleado tardío), tomar la antera y colocarla sobre una lámina portaobjeto, adicionar dos gotas de acetocarmín al 0,5 %, colocar la laminilla y hacer presión para romper la antera (squash).

Para la desinfección de la inflorescencia, se requiere hipoclorito de sodio y alcohol al 70 %.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se debe tener en cuenta:

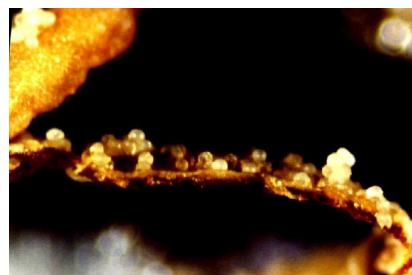
1. Pesar las sales del medio Murashige & Skoog (1962) y transferirlas a un vaso de precipitado de 1000 ml.
2. Añadir 2 mg/L de 2,4-D.
3. Adicionar 0,5 mg/L de kinetina.
4. Agregar 3 mg/L de tiamina.
5. Disolver las sales, reguladores hasta completar volumen de 1 litro.
6. Ajustar el pH a 5,8.
7. Incorporar 30 g/L de sacarosa.
8. Adicionar 2 g/L de Gelrite Merck®.
9. Calentar y agitar constantemente hasta ebullición para evitar la formación de sólidos.
10. Distribuir el medio en los recipientes adecuados y llevar a esterilización en autoclave a 15 psi, 121°C, durante 20 minutos.

Desinfección del material

- Lavar con agua y jabón las inflorescencias procedentes del clon Tani (BB).
- Sumergirlas en alcohol al 70 % por 5 minutos.
- Transferir las inflorescencias a una solución de hipoclorito de sodio al 5 % por 60 minutos.
- Enjuagar el material cinco veces en agua destilada estéril en cabina de flujo laminar.
- Abrir cuidadosamente las inflorescencias y aislar las anteras eliminando el filamento.
- Sembrar las anteras en el medio de cultivo establecido en condiciones asépticas.
- Transferir los cultivos a incubación a $28^{\circ}\text{C} \pm$.



(a)



(b)

Figura 3.44. a. Inflorescencia del clon Tani (BB). b. Desarrollo de estructuras globulares haploides después de cuatro semanas de cultivo del clon Tani (BB) (Perea, 1997).

3.19. Cultivo de protoplastos

El protoplasto puede definirse como la parte de la célula vegetal que está delimitada e incluida dentro de la pared celular la cual puede ser plasmolisada y aislada por eliminación mecánica o enzimática.

Los protoplastos son considerados como una herramienta fundamental para la investigación en biología fundamental y aplicada. La ausencia de una pared celular rígida (obstáculo físico-químico) y la completa exposición de la membrana celular convierten a los protoplastos en un sistema ideal para la investigación en procesos de transporte y división celular, fusión somática, morfogénesis, mutagénesis, selección y transformación genética. En fitopatología, se utilizan para estudiar la etiología de los virus, su absorción, procesos infectivos y replicación.

Los protoplastos pueden ser obtenidos de cualquier parte de la planta cultivada en condiciones *in vitro* o *ex vitro*; también se obtienen de callo, ápices de raíz o tallo, pétalos, nódulos, frutos, polen. Sin embargo, la fuente más utilizada en la actualidad corresponde al mesófilo de hojas jóvenes.

El aislamiento de protoplastos depende, en gran medida, del tipo y de la concentración de las enzimas utilizadas. Las dos enzimas esenciales son la celulasa y la pectinasa, que degradan específicamente el componente celulósico y pectínico de la pared celular. Algunos tejidos también requieren hemicelulasas adicionales para una correcta digestión de la pared. Todos los preparados enzimáticos incluyen impurezas, como nucleasas y proteasas, que pueden tener un efecto negativo sobre la viabilidad celular. Las enzimas son pH dependientes (4-6) y su temperatura óptima de actuación es de 40 a 60°C (Keller et ál., 1973). Debido a la fragilidad osmótica de los protoplastos, es necesario controlar perfectamente el potencial osmótico de la solución enzimática, de la solución de lavado y de la solución de recuperación y cultivo de los protoplastos. Para lograrlo se utiliza sorbitol, manitol, sacarosa, glucosa, y cloruro cálcico en diferentes concentraciones. La práctica está orientada al aislamiento de protoplastos mediante el método mecánico y el método enzimático y su posterior observación al microscopio.

Para la manipulación de los protoplastos se consideran diferentes etapas:

- Primera etapa: obtención, preparación y desinfección del material vegetal.
- Segunda etapa: eliminación de la pared celular mediante enzimas líticas, en solución de alto potencial osmótico.

- Tercera etapa: se relaciona con recuperación de los protoplastos. Incluye la eliminación de las enzimas por lavado y el paso a un medio de cultivo para la recuperación de la pared e iniciación de las primeras divisiones celulares de las células individuales obtenidas. La regeneración de la pared no representa ninguna dificultad, puesto que su formación es espontánea ocurre al eliminar las enzimas. En ocasiones, la fase de división celular presenta dificultades; por diversas causas, requiere la cuidadosa purificación y manipulación previa de los protoplastos. La puesta a punto de un medio de cultivo específico y complejo, con sales minerales, vitaminas, carbohidratos, reguladores de crecimiento y una dosis reducida paulatinamente del agente osmótico es prioritaria; se realiza incubando el material a unos 25 °C en condiciones de oscuridad de 5 a 7 días. En esta etapa se realizan los tratamientos y la selección del material.
- Cuarta etapa: se refiere al cultivo de los microcallos obtenidos mediante la división celular, se cambia en ella la densidad poblacional, la composición del medio de cultivo, e incubación a la luz.
- Quinta etapa: se relaciona con la regeneración de plántulas a partir del tejido de callo, mediante modificaciones en la composición hormonal-mineral del medio de cultivo. Posteriormente, se realiza la transferencia y la aclimatación de las plantas obtenidas a condiciones de invernadero.

3.19.1. Rosa (*Rosa sp*)

Pertenece a la familia *Rosaceae*. Su nombre científico es *Rosa sp*. Actualmente, las variedades comerciales de rosa son híbridos de especies de rosa desaparecidas. Para flor cortada se utilizan los tipos de té híbrida, y en menor medida, los de floribunda. Los primeros presentan tallos largos y atractivas flores dispuestas individualmente o con algunos capullos laterales, de tamaño medio o grande, y numerosos pétalos que forman un cono central visible.

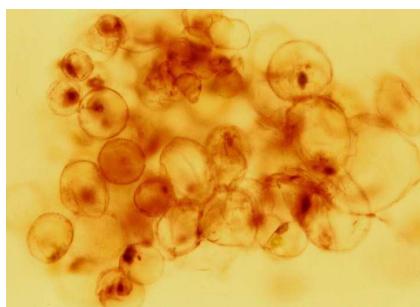
Los rosales floribunda presentan flores en racimos, de las cuales algunas pueden abrirse simultáneamente. Las flores se presentan en una amplia gama de colores: rojo, blanco, rosa, amarillo y lavanda, entre

muchos otros, con diversos matices y sombras. Nacen en tallos espinosos y verticales.

En Colombia el cultivo de la rosa es de gran importancia debido a que es uno de los principales países productores. Se utilizan principalmente en fresco, como producto decorativo y ornamental. En lo que se refiere a la exportación, la demanda de rosas se ajusta a determinadas fechas, principalmente sobresalen el día de San Valentín, Día de la Madre, Semana Santa y Navidad.



(a)



(b)

Figura 3.45. a.Flores de rosa. b.Aislamiento de protoplastos *Rosa spp* (Rodríguez R.J, 2004).

Materiales y métodos

Para esta práctica se requieren callos friables de rosa obtenidos a partir del cultivo *in vitro*. Para el aislamiento de los protoplastos, se necesita una combinación enzimática celulasa, macerozima y pectoliasa.

Procedimiento

Prepara la solución enzimática de la siguiente manera:

- Pesar las enzimas y adicionarlas en 50 ml de agua destilada estéril. Celulasa 50 mg/50 ml + macerozima 100 mg/50 ml + pectoliasa 75 mg/50 ml (pH 5,4).
- Preparar una solución osmoactiva de manitol (250mg/50 ml).

- Tomar una porción de callo y transferirla a cajas de Petri estériles con la solución de manitol durante 10 minutos.
- Retirar el callo y llevarlo a la solución enzimática durante 6 a 8 horas.
- Llevar el material a agitación de 60 rpm con el fin de liberar los protoplastos.
- Observar al microscopio.

3.19.2. Melón (*Cucumis melo L.*)

Materiales y métodos

Para la práctica se requiere de hojas de melón obtenidas en condiciones *in vitro* a partir del rescate de embriones. Para el aislamiento se requiere de una combinación enzimática con celulasa y macerozima.

Procedimiento

Prepara la solución enzimática de la siguiente manera:

- Pesar las enzimas y adicionarlas en 50 ml de agua destilada estéril. Celulasa 50 mg/50 ml + macerozima 50 mg/50 ml (pH 5,5).
- Preparar una solución osmoactiva de manitol (1g/50 ml).
- Cortar en pequeños segmentos las hojas de melón.
- Transferir los segmentos de hojas a cajas de Petri estériles con la solución de manitol durante 10 minutos.
- Retirar las hojas y llevarlas a la solución enzimática durante 4 a 6 horas.
- Llevar el material a agitación de 60 rpm con el fin de liberar los protoplastos.
- Observar los protoplastos al microscopio.

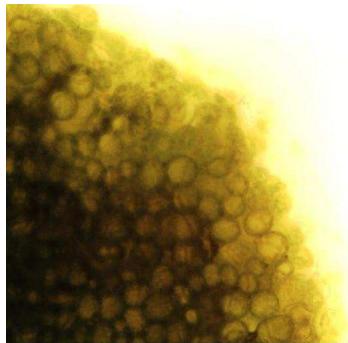


Figura 3.46. Aislamiento de protoplastos de melón, *Cucumis melo L.* (Tirado, 2001).

3.20. Transferencia de las plantas obtenidas *in vitro* y su adaptación a condiciones ambientales

La culminación de los procesos *in vitro* tiene lugar en el campo, por lo que es importante tener en cuenta que las condiciones de las plantas son diferentes y por tal razón es necesario adaptarlas debidamente para que los resultados sean exitosos. Durante el cultivo *in vitro*, las plantas crecen en un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios nutritivos ricos en sacarosa y minerales (Agramonte et ál. 1998).

Estas situaciones generan cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas; por consiguiente se requiere que las primeras semanas de adaptación de las plántulas se controlen factores ambientales; prácticamente se deben simular durante este periodo las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones de crecimiento. Es recomendable mantener una alta humedad relativa para promover el desarrollo de la cutícula y de los estomas, debido a que son muy precarios en cultivo *in vitro* y pueden causar una deshidratación de las plántulas si no se les suministra un tratamiento apropiado. Se recomienda utilizar cámaras húmedas transitorias, las cuales consisten en plásticos transparentes con pequeños orificios puestos sobre las plántulas durante dos semanas aproximadamente. Cuando se dispone de grandes volúmenes de plántulas, deben transferirse a invernadero.

El manejo del material vegetal en esta fase debe realizarse gradual-

mente sin crear traumas, pues se considera el paso más crítico de la propagación y en el que ocurre el mayor porcentaje de pérdidas. A continuación se describen las etapas para lograr la adaptación de las plántulas:

- Lavar cuidadosamente las raíces de las plantas para eliminar restos de medio de cultivo.
- Aplicar una solución auxínica (0,1 mg/L) por inmersión de las raíces para incrementar la emisión de estas.
- Realizar la siembra en un sustrato con drenaje apropiado que garantice la sanidad y el buen desarrollo de las plantas. Para la preparación del sustrato se recomiendan las mezclas de tierra, arena y fibra vegetal (1:1:1), u otros sustratos como la turba canadiense Klasmann (Peat Moots), la fibra de coco Cocopeat y la zeolita sustrato mineral que tiene la capacidad de absorber soluciones nutritivas y liberarlas lentamente. Se sugiere aplicar soluciones nutritivas que favorezcan el desarrollo de las plantas; las más apropiadas son las soluciones Knop o Berthelot, debido a que contienen baja concentración de sales.
- Regar con frecuencia las plantas con poca agua para incrementar la humedad relativa.
- Disminuir la intensidad lumínica durante las dos primeras semanas.
- Transferir las plantas a invernadero y luego a campo cuando alcancen un tamaño adecuado, y fertilizar.

Al utilizar este procedimiento se obtendrán excelentes resultados con altas tasas de sobrevivencia. El éxito de la propagación clonal *in vitro* depende de la capacidad para manejar en el invernadero plantas en gran escala con bajo riesgo de mortalidad y bajo costo durante el periodo de adaptación. Cuando el cultivo esté bien establecido, es conveniente realizar las diferentes prácticas de fertilización, podas, manejo de arvenses y control de plagas y enfermedades, según lo requiera la especie, para garantizar producciones óptimas y excelente desarrollo de los cultivos.



Figura 3.47. a. Transferencia de plantas de melón en adaptación (Tirado, 2001). b. Transferencia de plantas de apaya variedad Maradol en adaptación (Perea, et ál., 2009).

3.21. Contaminación en cultivos de células y tejidos vegetales

Los cultivos axénicos se caracterizan por la ausencia de agentes contaminantes; para lograrlo se implementan diferentes metodologías con el fin de erradicar los microorganismos de las superficies de los tejidos. La contaminación puede ser causada por hongos, bacterias o levaduras, los cuales pueden ser un problema extremadamente grave si no son controlados a tiempo.

Los contaminantes fungos son de fácil detección en el medio de cultivo, pues su crecimiento se visualiza por la forma de colonias aisladas o alrededor de los explantes hasta llegar a invadir toda la superficie del recipiente. Entre los hongos contaminantes, los géneros encontrados con mayor frecuencia han sido *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Neurospora*. (Enjalric et ál., 1988; Danby et ál., 1994; Alvarado et ál., 1997).

Las bacterias también crecen superficialmente en los recipientes, atacando totalmente el cultivo. Se caracterizan por ser de diversos colores y texturas.

Para obtener material axénico se debe tener en cuenta una serie de prevenciones que implican estricta asepsia y apropiada manipulación tanto del equipo de siembra como del material vegetal en estudio.

El investigador debe disponer de vestuario apropiado para realizar las siembras: blusa de laboratorio, tapabocas y gorro, los cuales deben permanecer impecables. Además, se debe lavar manos y brazos con jabón antibacterial y asperjarlos constantemente con alcohol antiséptico. El instrumental (pinzas, bisturí y agujas de disección) debe ser esterilizado previamente en el autoclave y flameado constantemente.

Los contaminantes microbianos de la superficie de los explantes se eliminan comúnmente por inmersión en soluciones desinfectantes como etanol, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, yodo, cloro comercial y bichloruro de mercurio, entre otras. Algunos antibióticos, fungicidas e insecticidas se han utilizado en tratamientos previos a la desinfección de los explantes (Capó, 1998).

3.22. Certificación y sanidad de las plantas regeneradas a partir de meristemos

La eliminación de virus mediante el cultivo de meristemos depende del grado de complejidad del patógeno, en la mayoría de especies se puede eliminar el virus, pero no hay certeza de que con otros virus el material obtenido esté exento de ellos; por consiguiente, se recomienda utilizar el cultivo de meristemos en combinación con otros tratamientos como termoterapia, quimioterapia o crioterapia.

3.22.1. Termoterapia

El tratamiento por termoterapia implica la inactivación de los virus a través del calor, es decir, se impide la multiplicación viral debido a que se afecta el metabolismo celular y la sensibilidad diferencial. En este proceso se altera la síntesis de virus.

El éxito de la termoterapia depende de la capacidad del tejido de la planta para soportar períodos largos de altas temperaturas que inactiven los virus sin afectar significativamente el crecimiento de la planta (Quak, 1977).

El método consiste en someter a temperaturas entre 30 y 40 °C, ya

sea por inmersión de tubérculos, rizomas, o partes infectadas en agua caliente, o aplicarles aire caliente. Los tratamientos son por lo general de corta duración (de 10 a 30 minutos). Para utilizar aire caliente es necesario disponer de cámaras adecuadas, lo que permite practicar el tratamiento en forma continua o fraccionada, durante dos, cuatro o seis semanas, dependiendo del tipo de planta, del estado fisiológico, del contenido de agua en el material vegetal y del tamaño de éste (Roca y Jayasinghe, 1982).

Entre los trabajos pioneros con termoterapia, se encuentran el empleo de agua caliente (hidroterapia) para el tratamiento de estacas de caña de azúcar. Kassanis y Poschette (1961) concluyeron que las plantas hortícolas y propagadas por la vía vegetativa son infectadas por virus que podrían inactivarse mediante tratamientos con calor.

3.22.2. Quimioterapia

La multiplicación de los virus está ligada al metabolismo de la planta. Se plantea la hipótesis que la aplicación de sustancias químicas específicas a la especie en estudio puede alterar el mecanismo de síntesis de los virus. Sin embargo, las sustancias conocidas y utilizadas con este propósito son fitotóxicas; por consiguiente, pueden destruir las células y los tejidos. El empleo de productos químicos para la eliminación de virus requiere el conocimiento previo de la multiplicación y la síntesis de estos patógenos. Los avances en la virología han permitido entender que al utilizar el virasol (considerado como un nucleótido sintético), de amplia acción antiviral, se inhibe la multiplicación de virus que contienen ADN o ARN.

Quak (1977) realizó investigaciones con algunas variedades de papa para eliminar virus utilizando 2,4-D y verde de malaquita; demostró que existe interacción entre las variedades y la concentración de los compuestos empleados.

3.22.3. Crioterapia

Brison et ál. (1997) demostraron por primera vez que el proceso de criopreservación puede utilizarse no solamente para conservar el germo-

plasma, sino también para la eliminación de virus en ápices caulinares de ciruelo infectadas por el virus de la viruela del ciruelo (potyvirus). Recientemente Helliot et ál. (2002) utilizaron la criopreservación para la erradicación del virus del rayado del banano (BSV) de *Musa spp.* Las plantas de cv. Williams (AAA) fueron infectadas mecánicamente con CMV o infectadas naturalmente con BSV y luego se aislaron los meristemos de las plantas infectadas. Se utilizaron las pruebas ELISA para evidenciar la sanidad de las plántulas.

Después del tratamiento por crioterapia, la erradicación de virus para CMV fue del 30 % y del 90 % para BSV. Estos autores evaluaron la eficiencia de la crioterapia para la erradicación de los virus en *Musa* utilizando la proliferación de meristemos (Scalps) en lugar del meristemo. El tratamiento por crioterapia, a -196 °C, puede ser una técnica muy promisoria para la erradicación de los virus en plátanos y bananos, así como para el intercambio de germoplasma.

3.22.4. Diagnóstico y evaluación sanitaria

Los métodos existentes para el diagnóstico de virus en vegetales se derivan en esencia de los desarrollados originalmente para microorganismos en medicina.

Para el diagnóstico de virus se dispone de diferentes metodologías que varían en su grado de complejidad y en su efectividad en el diagnóstico. La variabilidad de los síntomas virales puede confundirse, en ocasiones, con problemas causados por desórdenes fisiológicos, hongos y bacterias; por consiguiente, se recomienda realizar estudios exhaustivos para verificar la sanidad de las plantas.

Las metodologías para la detección de virus y viroides varían en su grado de complejidad y efectividad en el diagnóstico. Actualmente se dispone de técnicas para diagnósticos y detección de virus utilizando métodos biológicos, serológicos y moleculares.

Métodos biológicos

Las plantas indicadoras, generalmente herbáceas, desde hace décadas han sido utilizadas para la detección de virus, entre los que se registran

Chenopodium amaranticolor, *Chenopodium quinoa*, *Gonphrena globosa*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum*, *N. benthamiana*, *Petunia hybrida* y *Physalis floridana*.

Normalmente, inoculación mecánica se realiza con la savia de plantas infectadas por virus, es decir, se obtiene la savia y se esparce en la planta indicadora utilizando previamente un abrasivo como el carbonum, para eliminar la cutícula y dejar en libertad la epidermis, permitiendo la entrada de los virus y aumentando así la efectividad de la inoculación. Después de 4 o 5 días se evalúan los síntomas locales con la formación de manchas concéntricas como resultado positivo.

Métodos serológicos

Los métodos serológicos se basan en la detección y la identificación de virus y bacterias, debido a la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, en la cual los anticuerpos reconocen al antígeno y se combinan solamente con al porción del antígeno que le dio origen o con otra semejante.

Microprecipitación: Esta prueba se realiza en placas de vidrio o cajas Petri en las cuales se colocan pequeñas gotas de antígeno (savia de la planta) y antisuero en diferentes concentraciones. Las gotas se recubren con aceite mineral liviano, se incuban y se observan después de dos horas a temperatura ambiente.

Precipitación en tubo: Esta prueba es semejante a la microprecipitación en placa. Se mezclan el antígeno y el anticuerpo en diferentes concentraciones en tubos de ensayo pequeños; para este proceso se requiere incubación al baño de María durante sesenta minutos.

Doble difusión en agar: Es otra prueba serológica en la cual se aprovecha la capacidad de las proteínas (antígeno-anticuerpo) para migrar o difundirse a través de los poros de un gel (agar). Sobre una caja Petri, con una capa delgada de agar, se perforan varias celdillas circulares en las que se deposita la savia de la planta, y una celdilla circular en el centro, en la que se coloca el antígeno. La respuesta positiva se manifiesta en la formación de líneas o bandas oscuras que corresponden al precipitado que se forma cuando se unen el antígeno y el anticuerpo, es

decir, las proteínas de la planta y proteínas virales, si están presentes, migran y se ubican en distintas posiciones en el gel, conformando las bandas oscuras.

ELISA (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay) Las tecnologías para verificar la sanidad en las plantas, utilizando pruebas serológicas mediante el empleo de anticuerpos monoclonales y policlonales específicos, son empleadas con frecuencia para el diagnóstico y la caracterización de virus.

La prueba ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay).

ELISA fue concebida independientemente en 1971 en Suecia y Holanda, siendo aplicada posteriormente a la revelación y a la cuantificación de los más diversos tipos de sustancias presentes en líquidos orgánicos (antígenos-anticuerpos, hormonas y fármacos, etc.). Es una prueba altamente sensible para concentraciones muy bajas en la muestra; es muy susceptible de contaminación.

Es una prueba serológica en la cual los anticuerpos específicos del virus en estudio se depositan en celdas dispuestas en una placa múltiple, para que se adhieran al fondo. Luego se adicionan en cada celda, en forma independiente, los extractos de savia de las muestras, los controles positivos del virus, los negativos y los blancos, de manera que las proteínas virales, cuando estén presentes, se enlacen con las del anticuerpo. Después de un lavado previo se adiciona un conjugado enzimático específico para el virus que en un extremo opuesto, posee proteínas (globulinas) compatibles con las del virus (Matthews, 1991, Conserve et ál., 1990).

Se efectúa entonces el enlace de las partes compatibles del virus y a disposición libre de la enzima en el otro extremo. Después se adiciona un sustrato que reacciona con la enzima produciendo color; cuando las proteínas están presentes, se producen los enlaces en cadena y se visualiza la reacción positiva (color). La reacción negativa permanece incolora.

Métodos moleculares

Las técnicas que detectan los ácidos nucleicos virales como las hibridaciones moleculares y la reacción en cadena de la polimerasa o PCR

son un complemento a las técnicas serológicas debido a que detectan distintas partes de virus en estudio.

Hibridaciones moleculares: La detección de virus por hibridaciones moleculares se realiza mediante la unión del ácido nucleico del genoma viral con moléculas de ácido nucleico complementarios (sondas) que han sido marcadas con un isótopo radioactivo u otra molécula no radioactiva (biotina, digoxigenina, quimioluminiscencia, etc) que permite detectar la hibridación.

Reacción en cadena de la Polimerasa - PCR: La reacción en cadena de la polimerasa - PCR, básicamente consiste en producir múltiples copias de un segmento de ADN, se ha convertido en los últimos años en una de las técnicas más utilizadas en biología molecular por ser rápida, sencilla y muy sensible (Blas et ál., 2000).

3.23. Requerimientos para establecer un laboratorio de lultivo de lejidos legetales

3.23.1. Organización general

Un laboratorio de cultivo de tejidos debe tener un lugar específico para cada área de trabajo (preparación de medios, lavado de vidriería, esterilización, microscopía, sala de crecimiento y sala de siembra). En cada uno de estos lugares se debe disponer de equipos especializados para el buen manejo de las técnicas.

3.23.2. Preparación de medios

Como su nombre lo indica, su uso es exclusivo para la preparación de medios de cultivo. Este lugar debe disponer de gavetas para almacenar material de vidrio, de plástico y reactivos químicos. Además, se debe disponer con mesones para distribuir los equipos necesarios: potenciómetros, balanzas, agitadores y destilador.

3.23.3. Lavado y esterilización

Esta área debe estar aislada porque en ella se debe realizar el lavado del material que desecharo por contaminación, al finalizar los cultivos o porque simplemente ya no se requiere. El lavado del material contaminado debe realizarse de manera especial debido a que esporas y otros contaminantes pueden colonizar recipientes que se encuentren limpios. Este material se debe esterilizar y sumergir en agua caliente con una mínima cantidad de hipoclorito de sodio; luego se pasa a una solución jabonosa y se lavar con agua, después se enjuaga y se deja escurrir hasta que seque. En esta área se debe disponer de autoclave, horno, estufas y material de vidrio para los medios de cultivo, además de la batería para lavar el material.

3.23.4. Área de siembra

En esta área se realiza la siembra de los explantes en los diferentes medios de cultivo. Las paredes y los mesones deben estar cubiertas con baldosín u otro material lavable para facilitar el aseo, ya que ésta área requiere asepsia rigurosa para la manipulación de los cultivos in vitro. También se debe disponer de cabinas de flujo laminar y mesas o mesones para distribuir el material que se procesa.

3.23.5. Salas de incubación

El material vegetal se debe transferir a lugares apropiados para el desarrollo de los explantes. Es recomendable organizar los cultivos en estantes metálicos con aislantes para el frío. En esta área se debe disponer de un buen control de temperatura ($20-30^{\circ}$), fotoperiodo controlado, calidad de las lámparas para regular la intensidad lumínica y humedad dependiendo de la especie y del objetivo del trabajo. También se debe disponer de un espacio para los cultivos líquidos en agitación y oscuridad (Roca & Mroginski, 1991).

3.23.6. Oficina

En el laboratorio se debe disponer de oficinas para escritorios, computadores y básicamente toda la bibliografía requerida para la consulta de los diferentes trabajos. Así mismo, se deben disponer de extintores para evitar accidentes causados por fuego en las demás áreas del laboratorio.

3.23.7. Equipos de laboratório

Con el fin de realizar un buen trabajo en el laboratorio, se requieren equipos básicos y especializados indispensables en el laboratório:

- Cabina de flujo laminar
- Autoclave
- Horno eléctrico
- Agitador horizontal
- Destilador y desionizador
- Balanza analítica
- Balanza triple brazo
- potenciómetro
- Microscopio-estereoscopio (binocular)

El material de vidrio que se utiliza con más frecuencia para la preparación de los medios de cultivo se lista a continuación:

- Pipetas (1, 5 y 10 ml)
- Beakers (50, 250, 500 y 1000 ml)
- Erlenmeyers (50, 250, 500 y 1000 ml)
- Cajas de Petri
- Probetas (50, 100, 500 y 1000 ml)

- Agitadores
- Recipientes para los medios de cultivo (diferentes tamaños)
- Mecheros

También se requiere:

- Equipo de disección (bisturí, pinzas y aguja)
- Alcohol antiséptico
- Alcohol industrial
- Algodón
- Papel aluminio
- Plástico Vitafilm
- Cinta Parafilm
- Tween 20 ®
- Hipoclorito de sodio 5,25 %
- Isodine
- Cuchillas para bisturí
- Marcadores permanentes
- Bata de laboratorio
- Gorro
- Tapabocas

El éxito en el laboratorio depende del buen uso de los equipos y de las condiciones de asepsia. Las cabinas de flujo laminar deben asearse 20 minutos antes de iniciar la siembra con alcohol antiséptico e hipoclorito al 1 %, para eliminar los residuos contaminantes. Es importante que el investigador lave bien las manos y los brazos con jabón antibacterial y posteriormente se ponga suficiente alcohol antiséptico sobre las manos. No es aconsejable hablar ni comer en el área de siembra.

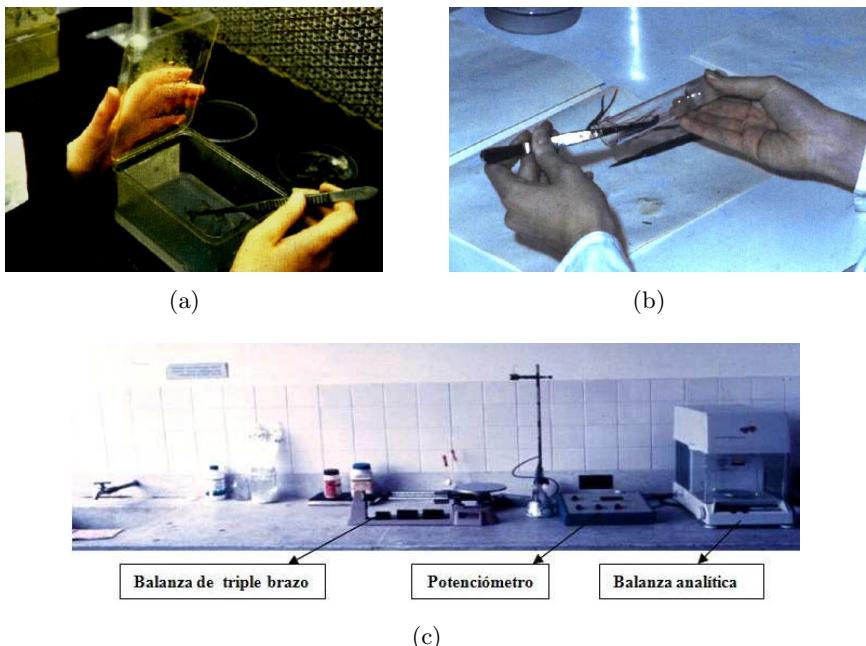


Figura 3.48. a/b.Cabinas de flujo laminar para el asilamiento y cultivo de células y tejidos. c.Balanza de triple brazo para pesar grandes cantidades, potenciómetro (calibra pH) y balanza analítica para pesar pequeñas cantidades.

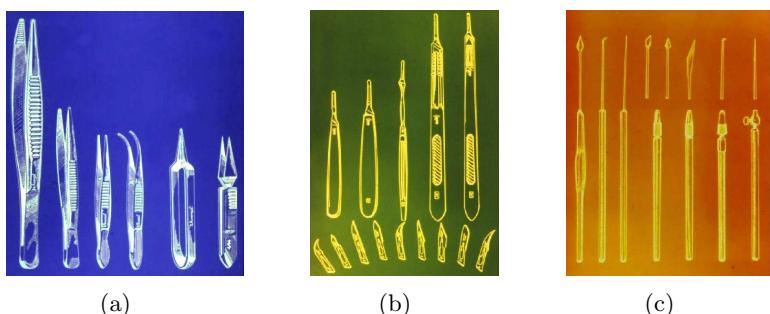


Figura 3.49. a.Diferentes clases de pinzas para disección . b.Diferentes tamaños de mangos y formas de bisturí para disección. c.Mangos de diferentes formas y tamaños de agujas para disección..



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 3.50. a.Destilador de agua. b.Agitador horizontal de 0-100 rpm (cultivos de células y tejidos). c.Sala de crecimiento temperatura 20-30 °C. d.Horno eléctrico. e.Autoclave vertical. f.Microscopio binocular.

Glosario

Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D): Auxina sintética con alto rango de división celular.

Ácido giberélico (AG_3): se le atribuye a la estimulación de la división y alargamiento celular.

Ácido indol-3-butírico (IBA): auxina sintetizada en cloroplastos y plastidios; se le involucra en la inducción de dormancia y regulación de la apertura estomática.

Ácido naftalenacético (ANA): activa la división y elongación de las células, promueve la formación de raíces.

Adventicio: designa una estructura que se desarrolla a partir de zonas poco usuales, como las yemas o cualquier otra parte distinta de las axilas de las hojas.

Agar: polisacárido que se obtiene generalmente de algas rojas y se emplea para solidificar medios de cultivo.

Alógamas: organismo con fecundación cruzada.

Androceo: conjunto de estambres de una flor.

Androgénesis: formación de un individuo a partir de un gameto masculino, es decir, desarrollo de un individuo haploide a partir de un grano de polen (partenogénesis masculina).

Aneuploide: célula u organismo que posee un número cromosómico distinto del numero haploide o un múltiplo exacto de este.

Antera: órgano masculino de una flor en el cual se produce el polen.

Antesis: momento en el que se abre el capullo floral.

Antioxidante: sustancia química que inhibe la fenolización de los explantes.

Antiséptico: sustancia germicida para la desinfección de los tejidos vivos.

Apical: concierne a la cima de alguna cosa, a su parte superior o ápice.

Ápice: extremo o punto terminal de las plantas.

Asepsia: conjunto de métodos para eliminar microorganismos del material biológico, instrumental o equipo de laboratorio.

Autógamas: organismos que se autofecundan.

Autopolinización: transferencia del polen de los estambres a los estigmas, ya sea de la misma flor o flores de la misma planta.

Auxinas: grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que producen elongación celular y, en algunos casos, división celular.

Axénico: totalmente libre de asociaciones con otros microorganismos.

Bactericida: agente que destruye a las bacterias.

Benciladenina (BA): genera la división celular en tejidos y promueve el desarrollo de yemas.

6-Bencilaminopurina (BAP): kinetina particularmente efectiva para promover la morfogénesis.

Bráctea: órgano foliáceo situado cerca de las flores.

Brote: ápice aéreo vegetativo.

Cáliz: envoltura floral externa, compuesta por los sépalos.

Callo: grupo de células proliferativas diferenciadas e indiferenciadas.

Carpelo: nombre para cada una de las hojas modificadas que forman el ovario.

Célula madre del polen: célula de la antera que por meiosis produce el grano de polen.

Cíbrido: variabilidad resultante de la fusión de un citoplasma con una célula completa.

Citoplasto: citoplasma sin núcleo celular.

Citoquininas: grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas) que inducen la división celular y frecuentemente la formación de yemas adventicias.

Clon: descendientes de un solo individuo. Individuo producido asexualmente.

Clorofila: mezcla de dos pigmentos verdes y dos amarillos presentes en los cloroplastos de toda planta, que es capaz de sintetizar carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua.

Cloroplasto: los cloroplastos son los organelos, donde se realiza la fotosíntesis. Están formados por un sistema de membranas interno, donde se encuentran ubicados los sitios en que se realizan las etapas del proceso fotosintético.

Contaminación: alteración de un cultivo por agentes químicos, físicos o biológicos.

Cormo: tallo redondeado, hinchado debajo de la tierra que parece un bulbo en su estado general.

Corola: envoltura floral interna, generalmente formada por elementos de textura fina y de colores más llamativos.

Cromosomas: estructuras que llevan los genes.

Cutícula: capa protectora de cualquier órgano vegetal.

Cultivo celular: crecimiento de células in vitro, incluido el cultivo de células individuales.

Cultivos continuos: cultivos en suspensión que se multiplican por períodos largos sin subculturarse; se utilizan en la industria para la producción de metabolitos secundarios.

Cultivo de meristemos: cultivo in vitro, generalmente de estructuras semejantes a un domo que mide menos de 0.1 mm. La mayoría de las veces se obtienen de brotes o yemas apicales.

Cultivo de tejidos vegetales: mantenimiento o crecimiento de tejidos in vitro; permite la diferenciación y la preservación de su arquitectura o función.

Cultivo celulares: células o agregados celulares que se multiplican en un medio líquido.

Desdiferenciación: conversión de células o tejidos diferenciados en no diferenciados.

Desinfección: eliminación de agentes patógenos por medios físicos o químicos.

Diferenciación: Fase del crecimiento durante la cual las células no especializadas se especializan en funciones particulares. Desarrollo hacia un estado de maduración más avanzado.

Dihaploide: individuo (representado $2n=2x$) que proviene de un tetraploide ($2n=4x$).

Diploidía: estado celular en el cual todos los cromosomas, excepto los sexuales son dos en número y tienen idénticas estructuras a las de aquellos de las especies de las cuales se derivan.

Domo meristemático: región apical que comprende la túnica y el cuerpo, sin incluir la zona donde se inician los primordios foliares.

Dormancia: estado durante el cual las yemas y semillas se encuen-

tran inactivas, sin procesos de diferenciación de tejidos ni división celular.

Embriogénesis: proceso por el cual un embrión se desarrolla a partir de una célula huevo, o asexualmente de una o un grupo de células.

Embrión adventicio: formación y desarrollo del embrión a partir de células asexuales.

Embrioide: estructura embrionaria producida a partir de células somáticas.

Endógeno: cuando los nuevos tejidos se engendran en el interior del tallo, quedando los más viejos en el exterior.

Endomitosis: duplicación del número de cromosomas sin que se produzca división nuclear; resulta así la poliploidía.

Endospermo: tejido de reserva en las semillas de las angiospermas; es el resultado de la fusión de un núcleo generativo con los núcleos polares.

Entrenudo: región del tallo entre los nudos de la planta.

Epidermis: cubierta de células muy unidas que forman una capa en la superficie de las hojas y tallos jóvenes de las plantas.

Esqueje: brote separado de una planta que se utiliza para propagación.

Estambres: órganos que llevan los sacos polínicos. Está formado por lo general de antera y filamento.

Esterilización: eliminación de microorganismos por medios físicos o químicos.

Explante: porción del tejido de una planta que se transfiere a un medio artificial para su desarrollo.

Fitohormona: sustancia orgánica producida en la planta a bajas concentraciones; promueve el crecimiento, lo inhibe o lo modifica.

Floema: tejido conductor presente en las plantas vasculares; se en-

carga de la distribución de materias alimenticias elaboradas a todas las partes de la planta.

Friable: tendencia de las células vegetales a separarse.

Fotoperíodo: duración relativa de la variación de luz y oscuridad; se refiere especialmente al efecto fisiológico.

Gelrite: agente gelificante, transparente y sintético utilizado en proporciones de 2g/L para la preparación de algunos medios de cultivo.

Genes: segmentos específicos de ADN que controlan las estructuras y las funciones celulares.

Género: unidad sistemática de las clasificaciones por categorías taxonómicas; el género se compone de especies.

Genoma: contenido total de cromosomas del núcleo de un gameto.

Genotipo: constitución hereditaria fundamental; distribución de genes de un organismo.

Germoplasma: variabilidad genética total representada en semillas o propágulos disponibles para una población u organismo particular.

Giberelinas: grupo de hormonas que inducen la elongación, la división celular y el rompimiento de dormancia en semillas.

Haploide: célula u organismo que tienen una sola serie de cromosomas, como se observa normalmente en un gameto maduro.

Heterocarión: célula que contiene uno o más núcleos genéticamente diferentes en un citoplasma común. Generalmente resulta de la fusión celular.

Hibridación celular: fusión de dos o más células diferentes, que conduce a la formación de un sincario.

Híbrido somático: célula o planta que resulta de la fusión de protoplastos que difieren genéticamente.

Intina: cubierta interna del grano de polen.

In vitro: designa los procesos biológicos que se realizan fuera de los organismos vivos. Literalmente “en vidri”.

Interespecífico: se utiliza cuando se cruzan dos especies diferentes.

Intergenérico: se usa cuando se cruzan dos géneros diferentes.

Medio de cultivo: mezcla de sustancias en las cuales pueden crecer células, tejidos u órganos.

Meristemo: grupo de células indiferenciadas en división, que se encuentra en regiones de crecimiento activo.

Microp propagación: multiplicación vegetativa de plantas in vitro.

Morfogénesis: proceso de desarrollo y crecimiento de diferentes estructuras de acuerdo con el empleo de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.

Mutante: variación fenotípica resultante de un cambio genético o de un gen nuevo.

Nudo: parte del tallo donde está implantada una hoja o rama.

Organogénesis: evolución a partir de células disociadas o tejidos a estructuras que presentan formas o funciones específicas.

Ovario: porción basal del pistilo que se convierte en el fruto.

Ploidía: número de dotaciones cromosómicas de una célula.

Polen: gametos masculinos de las angiospermas producidos en las anteras.

Poliploide: célula u organismo que posee un número cromosómico que es un múltiplo exacto del número haploide superior al doble de este.

Proliferación: crecimiento por multiplicación rápida de nuevas células.

Propagación clonal: reproducción asexual de vegetales que se consideran uniformes genéticamente originados a partir de un explante.

Propagación vegetativa: reproducción de plantas a través de un

proceso no sexual que incluye el cultivo de partes de la planta, esquejes o trozos de hoja.

Protoplasto: célula vegetal desprovista de pared celular.

Quimera: planta que contiene grupos de células, genéticamente diferentes.

Raíces adventicias: son las que nacen en tallo, ramas u hojas.

Rizoma: tallo subterráneo, con frecuencia alargado y horizontal, que posee yemas, produce vástagos y también raíces.

Saco polínico: recipiente en el cual se forman y contienen los granos de polen.

Subcultivo: proceso mediante el cual los explantes son subdivididos y transferidos a medio de cultivo fresco.

Teca: cada una de las dos mitades en las que se divide una antera.

Thiadiazuron (TDZ): compuesto muy efectivo basado en adenina que induce la formación de brotes y embriogénesis somática.

Totipotencia: característica celular en la cual se retiene el potencial para formar todo tipo de células o regenerar un individuo.

Tubo polínico: estructura organizada en la célula vegetativa del grano de polen a través del cual el núcleo espermático viaja hasta llegar al óvulo.

Variación somaclonal: variación genética que se genera en células cultivadas in vitro.

Vitaminas: grupo de compuestos orgánicos utilizadas en pequeñas cantidades, necesarias para el funcionamiento metabólico.

Xilema: tejido vascular de la planta que transporta agua y nutrientes de las raíces a las hojas.

Yema: estructura en el tallo de una planta que origina una rama, flor o varias hojas.

Bibliografía

- [1] AGRAMONTE, D., F. JIMÉNEZ, M.A., *Aclimatación. En: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*, Ponce, J.N. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara, Cuba. pp. 193–206, 1998.
- [2] ALVARADO, Y., L. HERRERA, M. SUÁREZ, O. RIVERO, L. GARCÍA, M. ACOSTA, *Control de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas*. En: Resúmenes Tercer Seminario Internacional de Sanidad Vegetal, Palacio de las Convenciones, Ciudad de la Habana-Cuba, pp. 76–77, 1997.
- [3] ANDREEAE, W.A., N.E. GOOD., *The formation of indole-acetylaspartic acid in pea seedling*, Plant Physiology, 30:380-382, 1995.
- [4] ARIAS, M., *Establecimiento de cultivos de células en suspensión de Thevetia peruviana y elicitación de metabolitos secundarios tipo glicósidos cardiotónicos*, Trabajo de grado: Doctorado en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Bogotá. pp. 132, 2009.
- [5] AZCON-BIETO, J., M. TALON, *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw Hill, Barcelona-España, 2000.

- [6] BALL, E., *Sterile culture of the shoot apex of Lupinus albus*, *Growth*, 24: 91-110, 1960.
- [7] BARBA, A., *Reguladores de crecimiento vegetal*. En: Hurtado, D.V. & Merino (Eds.) *Cultivo de tejidos vegetales*. Trillas, México D.F., pp. 48-65, 1987.
- [8] BLAS, C., I. ZABALGEAZCOA, S. CASTRO, I. ROMBO, *Técnicas de detección*, 2000.
- [9] BUTENKO, R., *Plant tissue culture and plant morphogenesis*. Kh. Chailakhyan, Jerusalem-Israel, 1996.
- [10] CAÑAS , B.M., *Metodologías in vitro de vegetales*. UIS, Bucaramanga-Colombia, 1993.
- [11] CARO, A.M., *Propagación vegetativa in vitro del lulo Solanum quitoense Lam. Mediante la proliferación de yemas caulinares laterales*. Trabajo de grado: bióloga. Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá, 1994.
- [12] CASTILLO, D.M., *Propagacion clonal de guanábana Anona muricata L. utilizando un sistema de ventilación forzada*. Trabajo de grado: bióloga. Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá, 2005.
- [13] COLLIN, H.A., S. EDWARDS, *Plant Cell Culture*. Springer-Verlag, New York, 1998.
- [14] CONSERVE, R.H., R.R MAILIN, *ELISA methods for plant viruses*. In: Hampton, R.E. Ball and S. de Boer. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual*. St. Paul. The American Phytopathological Society Press, pp. 179-196, 1990.
- [15] CÓRDOBA, J.M., *Inducción de la embriogénesis somática en mango de hilacha Mangifera indica L..* Trabajo de grado: bióloga. Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá, 2005.
- [16] CORTES, G.A., J.F. MIKAN, *Evaluación de metodologías de regeneración in vitro en Gerbera jamesonii Bolus, orientadas hacia la*

- variación somaclonal.* Trabajo de grado: biólogo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ciencias. Departamento de Biología, 1992.
- [17] CURTIS, H., N.S. BARNES, *Biología*. Quinta Medica Panamericana S.A., Buenos Aires, Argentina, 1993.
- [18] CLARK, R.B., *Nutrient solution growth of sorghum and corn in mineral nutrition studies*. Journal of Plant Nutritions, pp. 1039-1057, 1982.
- [19] CLELAND, R.E., *Auxin and Cell Elongation. In: Plant hormones and their role in plant growth and development*. P.J. Davies (Ed.) Kluwer Academic Publishers Netherlands, Dordrecht, pp. 132-148, 1987.
- [20] DANBY, S., H.A.S. EPTON, D.C. SIGEE, C. LEIFERT, *Fungal contaminants of Primula, Coffea, Musa and Iris tissue cultures*. In: Lumsden P.J., J.R. Nicholas, B.J. Davie (Eds.) *Physiology, growth and development of plants in culture*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Dordrecht, 1994.
- [21] DAVIES, P.J., *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, Dordrecht, 1990.
- [22] DIXON, R.A., R.A. GONZALES, *Plant cell culture - A practical approach*. Oxford University Press. Oxford, England, 1994.
- [23] DODDS, J.H., L.W. ROBERTS, *Experiments in plant tissue culture*. University Press. Cambridge, England, 1982.
- [24] ENJALRIC, Y., M.P. CARRON, Y.L. LARDET, *Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of Hevea brasiliensis*. Acta Horticulture, 255: 57-65, 1988.
- [25] EVANS, P.K., E.C. COCKING, *Isolated plant protoplast*. In: Street H.E. (Ed.) pp. 103-135, 1977.
- [26] Everett, N.P., *Plant growth medium*. U.S. Patent 4552844, 1986.
- [27] EVERET, D.R., M.A. HOLT, *Aseptic culture of chrysanthemum in the plant propagation class*. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 25, 444-447, 1975.

- [28] GAMBORG, O.L., R.A. MILLER, K. OJIMA, *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.* Exp. Cell, Res. 50:151-158, 1968.
- [29] GAMBORG, O.L., T. MURASHIGE, T.A. THORPE, I.K. VASIL, *Plant tissue culture media in vitro*, 12: 473-478, 1976.
- [30] GARAVITO, D., *Estudios preliminares orientados a la inducción de callos y proliferación de yemas in vitro de Carica papaya L.* Trabajo de grado: ingeniero agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1993.
- [31] GEORGE, E.F., *Plant propagation by tissue culture.* 2nd edition. Exegetics Limited, Edington, England, 1993.
- [32] HAMMERSCHLAG, F., *Factors influencing in vitro multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan Prunus cerasifera.* Ehrh. J. Am. Soc. Hort. Sci. 107: 44-47, 1982.
- [33] HANSON, J.B., *The function of calcium in plant nutrition.* Advances in Plant Nutrition, 1: 149-208, 1984.
- [34] HELLIOT, B., B. PANIS, Y. POUMAY, R. SWENNEN, P. LEPROIVRE, E. FRISON, *Cryopreservation for the elimination of Cucumber Mosaic and Banana Streak Viruses from banana (Musa spp.).* Plant Cell Report 20: 1117-1122, 2002.
- [35] HUDSON, T.E.K., T. DALE, L.G.R. FREDSDAND, *Principles of tissue culture for micropropagation*, 17: 549-589. In: Plant propagation. Prentice Hall, New Jersey, 1997.
- [36] HURTADO, D.V., M.E. MERINO, *Cultivo de tejidos vegetales.* Triillas, México D.F., 1987.
- [37] KAMADA, H., H. HARADA, *Influence of several growth regulators and amino acids on in vitro organogenesis of Torenia fournieri.* Lind. J. Exp. Bot. 30 (114): 27-36, 1979.
- [38] KASSANIS, B. ET A. F. POSNETTE, *Therapy of virus infected plants.* J.R. Agric. Soc. 126: 105-114, 1961.
- [39] KELLER, W.A., G. MELCHERS, *The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion.* T. Nature, 28: 737-741, 1973.

- [40] KENDE, H., . *Ethylene biosynthesis*. Plant Physiol. 44: 283-307, 1993.
- [41] LITZ, R., J. JARRET, *Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis*. En: Roca, W., L.M. Roginski. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. 7:143-159. CIAT. Cali, Colombia, 1991.
- [42] Matthews, R.E.F., *Plant virology*. Thirth edition, Academic Press, New York, 1991.
- [43] MC KEAN, T.A., S. TA YANG, *Biosynthesis and metabolism of ethylene*. In: Plant hormones and their role in plant growth and development. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, Dordrecht, pp. 94-112, 1987.
- [44] METRAUX, J.P., *Auxin and cell elongation*. In: Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development, Kluwer Academic Publishers. he Netherlands, Dordrecht, pp. 296-317, 1987.
- [45] MOREL, G., C. MARTIN, *de dahlias attaints d'une maladie à virus*. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris 235, 1324-1325, 1952.
- [46] MURASHIGE, T., F. SKOOG, . *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Plant Physiology 15: 473-497, 1962.
- [47] NITSCH, J.P., *Growth and development in vitro of excised ovaries*. Am. J. Bot. 38:566-577, 1951.
- [48] NITSCH, J.P. C. NITSCH, *Neoformation de fleurs in vitro chez une espèce de jours courts: Plumbago indica L.* Ann. Phys. Veg 7: 251-256, 1965.
- [49] OLAYA, C.I., *Frutas de America tropical y subtropical. Historia y usos*. Grupo Editorial Norma. Bogotá, Colombia, 1991.
- [50] ORELLANA, P.A., *Introducción a la propagación masiva*. En: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Ponce, J.N. Ed. Instituto de biotecnología de las Plantas. Villa Clara, Cuba. pp. 125-133, 1998.

- [51] OROZCO, G., *Germinación asimbiótica in vitro en semillas de dos especies de orquídeas Epidendrum vespa Vell y Cattleya trianae Rech.* Trabajo de grado: bióloga. Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá, 1990.
- [52] PARROT, W.A., E.G. WILLIAMS, D.F. HILDEBRAND, G.B. COLLINS, *Regeneration of soybean by somatic embryogenesis.* Newsletter IAPTC, March 1, 54:10-19, 1988.
- [53] Pateña, L., L. Carlos-Refuerzo, R. Barba, *Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in Mango Mangifera indica L. in vitro.* Cell Development Biology. 38: 173-177, 2002.
- [54] PELÁEZ, J.M., *Embriogénesis somática em Epidendrum ruizianum.* Trabajo de grado: biólogo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá, 2002.
- [55] PEREA, M., *Regeneración de plantas libres de Chr.S.V mediante el cultivo de meristemos en Dendrathema grandiflora (Chrysanthemum morifolium).* ACEVIV. Vol.4 pp. 31-38, 1992.
- [56] PEREA, M., *Utilización de los sistemas in vitro para la obtención de plantas de ñame Discorea spp libres de patógenos.* En: Ñame: producción de semilla por Biotecnología. Guzmán M., G. Buitrago (Eds.) Unibiblos, Bogotá, 2000.
- [57] PIERIK, K.L.M., *Cultivo in vitro de las plantas superiores.* Tercera edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España, 1990.
- [58] POLLARD, J.M., E.M. SHANTZ, F.C. STEWARD, *Hexitols in coconut milk: Their role in nurture of diving cells.* Plant Physiol. 36: 492-501.
- [59] POLO, A.B., *Propagación vegetativa in vitro del Kiwi Actinidia chinensis Planchon 1847 mediante la proliferación de meristemos caulinares e inducción de embriogénesis somática.* Trabajo de grado: bióloga. Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá, 1991.
- [60] QUAK, F. , *Meristem culture and virus free plants.* In: Applied and fundamental aspects of plant cell and organ culture. Reinert and Bajaj. Springer-Verlag, New York, pp. 598-615, 1977.

-
- [61] RIVERA, R., *Aislamiento, cultivo de protoplastos y embriogénesis somática in vitro en Passiflora edulis var. flavicarpa Degener.* Trabajo de grado: biólogo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá, 1997.
 - [62] ROCA, W., U.JAYASINGHE, *El Cultivo de meristemos para el sa- neamiento de clones de Yuca.* Centro Internacional de Agricultura Tropical. (CIAT), Palmira, Colombia, 1982.
 - [63] SALISBURY, F.B., C.W. Ross, *Fisiología Vegetal.* Cuarta edición. Grupo Editorial Iberoamerica, S.A. de C.V. México D.F., 1994.
 - [64] TIRADO, A., *Potencial morfogénico de Cucumis melo L. var. Can-taloupe.* Trabajo de grado: bióloga. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá, 2001.
 - [65] TIRADO, A., *Introducción de Solanum betacea a los cultivos in vitro y obtención de plantas libres de virus a través del cultivo de meris-temos.* Trabajo de grado: Especialista en Horticultura. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá, 2003.
 - [66] TIRADO, A., *Potencial morfogénico de Sábila (Aloe vera).* Comuni-cación personal.
 - [67] TORRES, E., *Estudio preliminar en la obtención y aislamiento del cultivo de protoplastos de Carica papaya a partir de diferentes ex-plantes tomados in vitro.* Trabajo de grado: bióloga. Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ciencias. Departamento de Bio-logía. Bogotá, 1993.
 - [68] VELÁZQUEZ, M.E., *Estudio del proceso para la obtención de wit-hanolídos a partir de cultivos in vitro de uchuva (Physalis peruviana L.).* Trabajo de grado: doctor en ingeniería química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingenierías, 2005.

Anexos

Composición y preparación de medios de cultivo

Medio Murashige & Skoog (1962)

Cuadro 1.1. Composición del medio Murashige & Skoog (1962)

Sales y vitaminas	Concentración mg/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
KH_2PO_4	170
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8
$NaEDTA$	37,3
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	16,9
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,63
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
KI	0,83
H_3BO_3	6,2
Continued on next page	

Cuadro 1.1 – continued from previous page

Sales y vitaminas	Concentración mg/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
Tiamina	0,1
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Glicina	2,0
Inositol	100
Sacarosa	30.000

Medio Gamborg (1968)**Cuadro 1.2.** Composición del medio Gamborg (1968).

Sales	Concentración (mg/L)
$(NH_4)SO_4$	134
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	500
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150
KNO_3	3000
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8
Na_2EDTA	37,3
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	10(1 H_2O)
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2
$CUSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
Kl	0,75
H_3BO_3	3
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
Inositol	100
Tiamina	10
Ácido nicotínico	1,0
Piridoxina	1,0
Sacarosa	20.000

Medio de Nitsch (1951)**Cuadro 1.3.** Composición del medio de Nitsch (1951).

Sales	Concentración (mg/L)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250
KCL	1500
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	25
KNO_3	2000
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	250
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CUSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
H_2SO_4	0-5
$FeC_6O_5H_7 \cdot 5H_2O$	10
KI	0,5
H_3BO_3	0,5
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
Cisteina	10
Sacarosa	(50.000-36.000)

Medio de White (1963)**Cuadro 1.4.** Composición del medio White (1963)

Sales	Concentración mg/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	720
Na_2SO_4	200
KCl	65
KNO_3	80
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	300
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	16,5
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	7
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3
$Fe_2(SO_4)_3$	2,5
KI	0,75
H_3BO_3	1,5
Continued on next page	

Cuadro 1.4 – continued from previous page

Sales	Concentración mg/L
Tiamina	0,1
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina	0,1
Pantotenato de calcio	1
Cisteína	1
Glicina	3
Sacarosa	20.000

Medio de Nitsch (1965)**Cuadro 1.5.** Composición del medio de Nitsch (1965)

Sales	Concentración mg/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	125
KNO_3	125
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	500
K_2PO_4	125
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,85
Na_2EDTA	37,25
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	25
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10
$CUSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
H_3BO_3	10
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
Inositol	100
Tiamina	0,5
Ácido nicotínico	5
Piridoxina	0,5
Biotina	0,05
Glicina	2
Ácido folico	0,5
Sacarosa	20.000–30.000

Medio Schenk-Hildebrandt (1972)**Cuadro 1.6.** Composición del medio Schenk-Hildebrandt (1972).

Sales	Concentración (mg/L)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	400
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	200
KNO_3	2500
$NH_4H_2PO_4$	300
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	15
Na_2EDTA	20
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	10
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1
$CUSO_4 \cdot 5H_2O$	0,2
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1
KI	1,0
H_3BO_3	5
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,1
Inositol	1.000
Tiamina	5
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Sacarosa	30.000

Solventes para la preparación de las hormonas vegetales

Auxinas

Cuadro 1.7. Auxinas.

Auxinas	Solventes
Ácido indol acético (AIA)	Alcohol
Ácido naftalenacético (ANA)	Éter y acetona
Ácido 2-4-diclorofenoxyacetico (2,4-D)	Acetona y éter
Ácido 2,4,5-triclorofenoxyacetico (2,4,5-D)	Solventes orgánicos (benceno o tolueno)
Ácido 3,6-dicloro-o-anisico (dicamba)	Etanol y acetona
Ácido 4-amino-3,5,6,-tricloro-2-pyridinecarboxílico (picloram)	Agua
Ácido indo - 3- burítico (AIB)	Agua

Citoquininas

Cuadro 1.8. Citoquininas.

Citoquinina	Solvente
6 - bencylaminopurina (BAP)	HCl o NaOH diluido en agua
<i>N</i> ⁶ - bencyladenina (BA)	HCl o NaOH diluido en agua
<i>N</i> ⁶ -furfuryladenine (Kinetina)	HCl o NaOH diluido en agua
<i>N</i> ⁶ (2-isopentyl) adenina (2ip)	HCl o NaOH diluido en agua
1.fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea (TDZ)	Agua
4-hydroxy-3-metil-trans-2-butenylaminopurina (Zeatina)	HCl o NaOH diluido en agua

Giberelinas

Cuadro 1.9. Giberelinas.

Giberelinas	Solvente
AG_3 (ácido giberélico)	Agua

Cuadro 1.10. Componentes identificados en el agua de coco de frutos verdes y frutos maduros (George, 1993)

Sustancia	Frutos verdes	Frutos maduros
<i>Aminoácido (mg/L)</i>		
Alanita	127,3	177,1
Arginina	25,6	16,8
Ácido aspártico	35,9	5,4
Asparagina	10,1	10,1
γ -Ácido aminobutírico	34,6	168,8
ácido glutamínico	70,8	78,7
Glutamina	45,4	13,4
Glicina	9,7	13,9
Histidina	6,3	—
Lisina	21,4	65,8
Metionina	16,9	—
Fenilalanina	—	10,2
Prolina	31,9	21,6
Serina	45,3	—
Triptofano	—	39,0
Tirosina	6,4	3,1
Valina	20,6	15,1
<i>Elementos inorgánicos (mg/L)</i>		
Potasio	—	312,0
Sodio	—	105,0
Fósforo	—	37,0
Magnesio	—	30,0
<i>Ácidos orgánicos (Meq/ml)</i>		
Ácido málico	34,3	12,0
Ácido shikímico	0,6	0,41

Continued on next page

Cuadro 1.10 – continued from previous page

Sustancia	Frutos verdes	Frutos maduros
Ácido cítrico	0,4	0,3
Ácido succínico	—	0,3
Azúcares (g/L)		
Sacarosa	9,2	8,9
Glucosa	7,3	2,5
Fructosa	5,3	2,5
Vitaminas (mg/L)		
Ácido nicotínico	—	0,64
Ácido pantotenoico	—	0,52
Biotina	—	0,02
Riboflavina	—	0,02
Ácido fólico	—	0,003
Tiamina	—	—
Pyridoxina	—	—
Reguladores de Crecimiento (mg/L)		
Auxinas	—	0,07
Giberelinas	—	0,02
Zeatina	5,8	—

Cuadro 1.11. Formulas y pesos moleculares de los principales reguladores utilizados en el cultivo de tejidos vegetales in vitro (George, 1993).

Nombre común o abreviación	Peso molecular (Mol.Wt)	Nombre alternativo
ABA	264,32	Ácido absícico
Ácido Acetilsalicílico	180,15	ASA
Adenina	135,13	Adenina
BAP	225,26	BA(6-benzylaminopurina)
CCC	158,07	Clorometil-colina
2,4-D	221,04	Ácido 2,4-diclorophenoxyacetico
Continued on next page		

Cuadro 1.11 – continued from previous page

Nombre común o abreviación	Peso Molecular (Mol.Wt)	Nombre alternativo
Dicamba	221,04	Ácido 3,6-Dicloro-o-anísico
Etileno	28,05	—
GA ₃	346,38	Ácido Giberelico
Glifosato	169,07	—
AIA	175,19	Ácido 3-indolacético
AIB	203,24	Ácido 3-indolbutírico
2iP	203,25	N ⁶ (2-isopentyl)adenina
Kinetina	215,22	6-furfurilaminopurina
ANA	186,21	Ácido Naftalenacético
Picloram	241,46	Ácido 4 -Amino-3,5,6-tricloro-2-pyridinecarboxílico
Putrescina	88,15	Poliamina
Espermita	202,35	Poliamina
2,4,5-T	255,49	Ácido 2,4,5-triclorofenoxyacético
Thidiazurón	220,25	TDZ
Vitamina D ₂	396,66	Ergocalciferol
Vitamina D ₃	382,65	—
Vitamina E ₃	430,72	—
Zeatina	219,25	4-hydroxy-3-metil-trans-2-butenylaminopurina