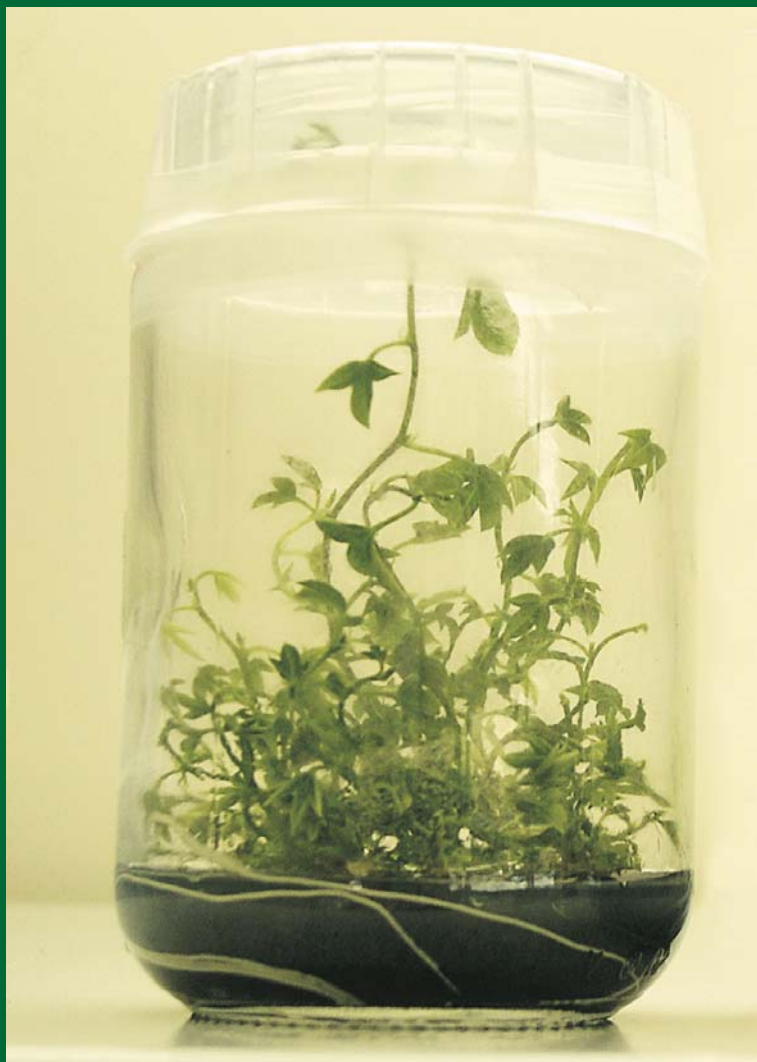


Bolivia Ecológica

EDICIÓN TRIMESTRAL REVISTA Nº 60

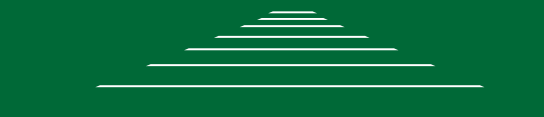
AÑO 2010



CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES

- Antecedentes
- ¿Qué es el cultivo de tejidos vegetales?
- Organización de un laboratorio de cultivo de tejidos
- Medidas de seguridad del personal
- Control preventivo de la contaminación microbiana
- Medios de cultivo
- Establecimiento de un cultivo de tejidos *in vitro*
- Técnicas de cultivo de tejidos
- Micropropagación
- Regeneración de plantas
- Conservación *in vitro*
- Limpieza de virus
- Cultivo de haploides
- Cultivo de protoplastos
- Experiencias en Bolivia
- Bibliografía
- Glosario

CENTRO DE ECOLOGÍA DIFUSIÓN



FUNDACIÓN SIMÓN I. PATIÑO

EDITOR

CENTRO DE ECOLOGÍA DIFUSIÓN SIMÓN I. PATIÑO

DIRECTORA DE LA PUBLICACIÓN

Carmina Montoya Köster

AUTORA

Teresa Ávila Alba (CIFP)

COLABORACIÓN

José Baudoin

Cristina Torrico Laserna

FOTOGRAFÍA PORTADA

Planta de pasiflora en cultivo de tejidos

Centro de Investigaciones Fitoecogenético

Pairumani (CIFP)

DISEÑO GRÁFICO

Sandra P. Heredia A.

ÍNDICE

• Antecedentes	pág. 1
• ¿Qué es el cultivo de tejidos vegetales?	pág. 1
• Organización de un laboratorio de cultivo de tejidos	pág. 2
• Medidas de seguridad del personal	pág. 5
• Control preventivo de la contaminación microbiana	pág. 6
• Medios de cultivo	pág. 9
• Establecimiento de un cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	pág. 13
• Técnicas de cultivo de tejidos	pág. 14
• Micropropagación	pág. 14
• Regeneración de plantas	pág. 21
• Conservación <i>in vitro</i>	pág. 25
• Limpieza de virus	pág. 28
• Cultivo de haploides	pág. 32
• Cultivo de protoplastos	pág. 33
• Experiencias en Bolivia	pág. 33
• Bibliografía	pág. 35
• Glosario	pág. 37

CENTRO DE ECOLOGÍA DIFUSIÓN



FUNDACIÓN SIMÓN I. PATIÑO

Independencia, Esq. Suárez de Figueroa - Tef. / Fax: (+ 591- 3) 3 37 57 26 - Casilla 1674 - Santa Cruz - Bolivia
E-mail: edifusion@fundacionpatino.org - www.cedsip.org

ANTECEDENTES

Las técnicas actuales de cultivo de tejidos, son el resultado de numerosas investigaciones que se han dado a lo largo de más de un siglo, constituyéndose en una valiosa herramienta para apoyar el desarrollo, como la producción de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria, así como respuestas a problemas y desafíos que se plantean en la actualidad, como el cambio climático.

En un principio del cultivo de tejidos, los medios que se utilizaban, contenían principalmente jugos y extractos vegetales. A partir de investigaciones en la década de los 50, que permitieron la utilización de hormonas vegetales o reguladores de crecimiento, las técnicas de cultivo de tejidos, vivieron un rápido desarrollo abarcando una amplia gama de aplicaciones.

En el año 1962 Murashige y Skoog, desarrollaron un medio de cultivo, que permitió la propagación de diversas especies vegetales, que consiste en una mezcla de sales minerales y vitaminas, el cual sigue utilizándose en la actualidad.

El desarrollo y progreso de las técnicas de cultivo de tejidos, permitió el paso de su aplicación en la investigación a la producción masiva de plantas, lo cual, ha dado lugar a una industria que se inicio en Europa y Estados Unidos y que se encuentra ampliamente extendida en el resto del mundo, incluyendo países en desarrollo de América Latina, Asia y África (Pérez *et al.*, 1998).

¿QUÉ ES EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES?

El cultivo de tejidos vegetales consiste en aislar un pedazo de una planta, denominado **explante** y cultivarlo en un medio de cultivo que le proporcione los nutrientes necesarios e incubarlo en una cámara o cuarto de crecimiento con condiciones artificiales de luz y temperatura, a fin de que el explante pueda expresar su potencial intrínseco o inducido.

Se basa en el principio de la totipotencia de las células vegetales, que se refiere a la capacidad que tienen los vegetales de formar una planta completa a partir de cualquier parte aislada de la misma, cuando ésta ha sido sometida a ciertas condiciones químicas y físicas de cultivo.

Se entiende como cultivo de tejido y/o cultivo *in vitro* a las plantas que son cultivadas en laboratorio, llamado así debido a la utilización de envases de vidrio. Aunque en la actualidad, es común utilizar envases de plástico.

El cultivo de tejidos constituye una herramienta que permite apoyar procesos de investigación, producción y conservación de plantas y comprende una serie de técnicas para obtener tejidos, órganos, plantas y metabolitos.

La utilización de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, permite cultivar plantas en un espacio reducido y acelerar algunos de los procesos como la multiplicación. Estas técnicas, están principalmente dirigidas a ser utilizadas en plantas de reproducción vegetativa y de semilla recalcitrante.

Las plantas de reproducción vegetativa son las que no pueden ser reproducidas mediante semilla y se multiplican a través de partes de la planta, como ser el banano, el plátano y la papa. Las plantas de semilla recalcitrante son aquellas que no pueden ser conservadas en forma de semilla, ya que no toleran la desecación y la conservación en condiciones de frío.

Ventajas del cultivo *in vitro*

En comparación con los sistemas convencionales de cultivo de plantas, el cultivo *in vitro* presenta las siguientes ventajas:

- Posibilidad de producción masiva de plantas homogéneas, en una superficie reducida, a bajos costos y tiempos reducidos
- Ahorro de espacio, respecto a los sistemas tradicionales
- Mejor control sobre la sanidad del material vegetal que se propaga
- Facilidad para transportar el material *in vitro*, incluso menores restricciones sanitarias para el transporte de las plantas de un país a otro
- Posibilidad de multiplicar una variedad de la cual sólo existen pocos individuos
- Posibilidad de conservar germoplasma a mediano y largo plazo (Aguirre *et al.*, 2010).

Limitaciones del cultivo *in vitro*

- Estabilidad genética débil en algunos sistemas de propagación *in vitro*

- La aclimatación de las plántulas es un proceso difícil con altas probabilidades de pérdidas
- Poca respuesta inicial de algunas especies y genotipos
- Alto costo de establecimiento de un laboratorio, lo que incide directamente en el precio final de la planta producida
- Alto costo de los reactivos, aspecto que influye en el desarrollo de investigación en esta área
- Necesidad de mano de obra especializada
- Alta dependencia de energía eléctrica.

ORGANIZACIÓN DE UN LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS

Un laboratorio de cultivo de tejidos, está organizado por áreas o secciones diferentes, que cumplen funciones específicas como ser:

• Lavado y esterilización

Es el ambiente donde se lavan los envases y se esterilizan materiales, medios de cultivo y los cultivos que deben ser desechados.

Esta área debe contar con los siguientes equipos: autoclave, horno de esterilización, destilador de agua, desionizador de agua. Además con envases y dispensadores de agua destilada y desionizada.

• Preparación de medios de cultivo

Lugar donde además de preparar los medios de cultivo, se guardan los reactivos y los materiales de vidrio y

plástico. Este ambiente debe contar con equipos como: balanza, medidor de pH, agitadores magnéticos con plato caliente y refrigerador, principalmente.

El área de lavado y el área de preparación de medios pueden estar localizadas en el mismo ambiente.

- **Transferencia y otras manipulaciones**

En esta sección del laboratorio, se realiza el trabajo de corte, inoculación y transferencia de los explantes a los medios de cultivo, así como los trabajos de repicado y multiplicación de las plantas *in vitro*.

Debido a que en este ambiente, se realizan trabajos que requieren el máximo nivel de asepsia, es que se cuenta con cámaras de flujo laminar de aire filtrado bajo presión.

- **Incubación y crecimiento**

En este ambiente los cultivos son incubados bajo condiciones controladas de temperatura y luz. La temperatura se regula de acuerdo a los requerimientos de los cultivos, generalmente se encuentra entre 20 y 28°C. La luz es también variable de acuerdo a las necesidades, con una intensidad de entre 1 000 y 5 000 lux y un fotoperiodo de 12 ó 16 horas de luz.

En este cuarto se cuenta con estanterías, generalmente metálicas, donde se colocan los cultivos. Generalmente,



Área de preparación de medios



Área de transferencia

se utilizan tubos fluorescentes para la iluminación, los cuales calientan el ambiente, por tanto es necesaria la instalación de un equipo de aire acondicionado. De igual manera, es necesario propiciar una buena distribución del aire en este cuarto, para evitar zonas de recalentamiento por efecto de las luces.



Área de crecimiento

• Aclimatación

Las plantas que tienen que salir para su cultivo al invernadero o campo, pasan por un proceso de aclimatación, el cual puede realizarse en la misma sala de crecimiento y/o contar con un ambiente adecuado para este fin.

Después del trasplante, las plantas generalmente necesitan un acondicionamiento gradual a las condiciones de campo, que se puede lograr usando nebulización, cámaras húmedas de plástico, etc.



Aclimatación de las plantas en el laboratorio

• Invernadero



Plantas provenientes de cultivo de tejidos en invernadero

Es importante contar con un invernadero que permita el desarrollo de plantas que salgan del laboratorio y posteriormente ser trasplantadas al campo. En este ambiente, debe haber control de humedad y temperatura, además contar con los cuidados para evitar la contaminación de las plantas provenientes del laboratorio.

Lo adecuado e indispensable es contar con: un ambiente de ingreso previo al invernadero, control de humedad adecuado, pisos de concreto, estructura de malla anti áfidos, sistemas de nebulización, áreas de almacenamiento para los implementos del invernadero y para las mezclas de sustratos desinfectados y sistemas de desinfección de sustratos (Aguirre y Calle, 2010).

MEDIDAS DE SEGURIDAD DEL PERSONAL

La seguridad en el laboratorio depende de las acciones que tome cada uno y la seriedad con que asuma su responsabilidad. En este sentido es importante que el laboratorio cuente con un manual de manejo de seguridad, que sea de conocimiento del personal, las personas nuevas y los estudiantes.

Se debe contar en el laboratorio con los equipos de primeros auxilios, extintores de incendio, así como duchas para baños del cuerpo entero y ojos.

En el caso de Bolivia, se tiene que tener en cuenta sustancias que están bajo el control de la Fuerza Especial de Lucha Contra el Narcotráfico (FELCN), dichas sustancias son precursores y reciben un trato especial tanto en su alma-

cenamiento como en su registro, como por ejemplo el ácido clorhídrico que se utiliza para ajustar el pH de los medios de cultivo.

CONTROL PREVENTIVO DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA

El medio de cultivo en el que se multiplican las plantas *in vitro*, es enriquecido con nutrientes y azúcar, esto hace que sea muy susceptible a ser contaminado con microorganismos que se encuentran en el ambiente, por lo tanto, todos los materiales utilizados en las manipulaciones y el medio de cultivo, deben ser esterilizados, de igual manera las manipulaciones deben realizarse en un ambiente aséptico.

Una de las condiciones básicas para el éxito de las técnicas de cultivo de tejidos, es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminantes.

Los contaminantes pueden estar en diferentes fuentes como los tejidos vegetales, área de trabajo, instrumentos, en el exterior de los recipientes de cultivo y en el investigador, por este motivo, se debe contar con una estrategia que permita minimizar o mejor aún, eliminar los contaminantes (Roca y Mroginski, 1991).

Los tejidos pueden llevar contaminantes en su superficie, en su interior o en ambas partes. Los que lleva el explante sobre su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección, pero los que se encuentran dentro del tejido son

difíciles de eliminar. En este último caso, puede ser útil la inclusión al medio de cultivo de fungicidas y antibióticos de amplio espectro, como el sulfato de gentamicina o el benomyl para los hongos.

Para obtener explantes que den lugar a plantas sanas en cultivo *in vitro*, es importante también contar con material de partida en buenas condiciones fitosanitarias y fisiológicas, es decir, plantas donadoras sanas y que no hayan sufrido ningún estrés por falta de agua o exceso de temperatura.

En el **área de trabajo**, los contaminadores más comunes son las bacterias y las esporas de hongos, que habitan en el ambiente. En esta área es necesario contar con aire filtrado y una cámara de flujo laminar, que permitan mantener la asepsia durante las manipulaciones.

Los **instrumentos** de trabajo se deben esterilizar antes de usarlos en autoclave o en horno de aire seco, sin embargo, durante las manipulaciones estos vuelven a contaminarse con microbios del aire, de superficies vegetales mal desinfectadas, de las manos o de la exhalación del investigador, por lo que se debe trabajar con más de un juego de instrumentos, los mismos que deben ser desinfectados en un mechero luego de cada manipulación.

El **exterior de los recipientes de cultivo**, a pesar que han sido esterilizados en autoclave, existe la posibilidad de que durante el tiempo transcurrido entre la esterilización y el momento de usarlos, se localicen en su exterior ciertos contaminantes, por tanto, se deben limpiar con alcohol al

ser ingresados en la cámara de flujo laminar y flamear obligatoriamente en el mechero, la boca de cada envase, antes y después de sembrar el explante en el medio de cultivo.

El **investigador** es una fuente importante de contaminantes. El uso de batas de laboratorio y la protección del cabello, la boca y la nariz reducen la contaminación. De igual manera las batas, zapatonas, barbijos y gorros, deben ser estilizados por medio de rayos ultravioletas.

La esterilización, es el proceso mediante el cual cualquier material, sitio o superficie se libera completamente de microorganismos vivos o esporas.

En la terminología médica se utiliza generalmente la palabra asepsia para designar la condición en la que están ausentes los microorganismos. Quienes trabajan en el cultivo de tejidos de plantas utilizan la palabra aséptico como sinónimo de estéril (Roca y Mroginski, 1991).

La estrategia para minimizar y/o eliminar el contenido de contaminantes en las diferentes fuentes mencionadas tiene que incluir varios pasos como:

Desinfección del explante

El explante introducido al laboratorio debe ser desinfectado utilizando acaricida, luego fungicida y finalmente hipoclorito de sodio o calcio, en los cuales los tejidos son remojados por un tiempo determinado y posteriormente enjuagados para evitar toxicidad. En lugar de hipoclorito, puede utilizarse

también una desinfección con formol o una solución de blicloruro de mercurio, sin embargo, ambos productos son altamente tóxicos y se deben utilizar con mucha cautela.

Una solución de hipoclorito de sodio, en concentraciones de 1% al 3% (comercialmente conocido como lavandina), es una de las preparaciones más útiles como germicida, el mismo que puede ser utilizado para cualquier superficie.



Desinfección de los explantes en una solución de hipoclorito de sodio

Desinfección de los medios de cultivo

Los medios de cultivo generalmente son esterilizados mediante vapor bajo presión en un autoclave. Para esterilizar los medios de cultivo se utiliza una presión de 15 lb durante 20 minutos, a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente de 121°C, suficiente para destruir todas las formas de bacterias, hongos y sus esporas.

Hay algunas sustancias de los medios de cultivo que son termolábiles, por lo tanto, deben ser esterilizadas mediante filtración a través de filtros especiales a prueba de hongos y bacterias.

Desinfección de los instrumentos

Los instrumentos son desinfectados mediante calor seco en una estufa de aire caliente a una temperatura mínima de 170°C durante dos horas.

Área estéril de trabajo

La cámara de flujo laminar es el equipo que proporciona el área de trabajo estéril. En el mesón de este equipo se realizan todas las manipulaciones.

A fin de asegurar la asepsia de los medios de cultivo y los explantes, se deben seguir estrictas normas de trabajo y procedimientos para que el investigador no se constituya en una fuente de microorganismos. Algunos de estos procedimientos son el uso de ropa adecuada y esterilizada, como batas de laboratorio, botines, barbijos y gorros. Las



Autoclave para la desinfección de los medios de cultivo



Flujo laminar que proporciona un área estéril

manos del trabajador no deben tocar nunca los tejidos ni el medio de cultivo. De igual manera, no se debe pasar las manos o la cabeza, por encima de los envases abiertos.

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo que se utilizan en cultivo de tejidos están compuestos por diferentes componentes como sales minerales, azúcar, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y otros compuestos adicionales.

La composición de estos elementos está en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización.

Sales minerales

a) Macronutrientes

Son constituyentes esenciales para el crecimiento de los tejidos vegetales, debido a que intervienen en la conservación del equilibrio iónico de las plantas (Bengoa, 1990, mencionado por Ugarte *et al.*, 2010).

Los macronutrientes que aportan los elementos que se consideran esenciales para el crecimiento de las plantas son: Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio y Azufre.

La concentración de estos elementos, depende de los requerimientos de las especies y la finalidad del cultivo.

b) Micronutrientes

Representan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales micronutrientes son: Hierro, Manganeso, Zinc, Boro, Cobre y Molibdeno. Algunos medios contienen además Cobalto, Yodo y Cloro, aunque estos compuestos no son esenciales para el crecimiento (George y Sherington, 1984, mencionado por Ugarte *et al.*, 2010).

El hierro es generalmente suministrado de forma separada de las demás sales y está mezclado con un agente quelante como el ácido etilen diamin tetra acético (EDTA) con la finalidad de que no precipite en la solución.

Para suministrar los macro y micronutrientes necesarios para el cultivo de tejidos, se han desarrollado medios básicos, donde la composición de sales varía de uno a otro.

El más utilizado es el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) pero existen otros como el medio B5 desarrollado por Gamborg *et al.* (1968), el N6 por Chu *et al.* (1975) y el medio Wh por White (1943).

La mayoría de las formulas salinas basales de las soluciones de cultivo con las que se dispone actualmente, debería ser más que suficiente para suministrar un mínimo esencial de los elementos requeridos. Sin embargo, es útil ensayar estas soluciones a diferentes concentraciones totales, por

ejemplo, el MS es un medio relativamente alto en contenidos de sales, mientras el medio Wh generalmente se considera como de bajo contenido de sales (Krikorian, 1991).

Fuente de carbono

Los cultivos *in vitro* son heterótrofos, es decir deben alimentarse con las sustancias orgánicas que le son suministradas en el medio de cultivo, de esa manera obtienen el carbono, el nitrógeno y la energía que necesitan.

La sacarosa en una concentración de 2 al 5% es el azúcar que más se utiliza como fuente de carbono y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa. En general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas.

La sacarosa puede ser sustituida por azúcar comercial, obteniéndose buenos resultados y permitiendo un ahorro considerable en los gastos.

El alto contenido de azúcar en el medio de cultivo es uno de los motivos por los cuales, estos son tan susceptibles a la contaminación por microorganismos.

Vitaminas

Las vitaminas son utilizadas como catalizadores en varios procesos metabólicos, estas son añadidas al medio de cultivo para estimular procesos de crecimiento específicos en los tejidos (Torres, 1988, mencionado por Ugarte *et al.*, 2010)

Para Murashige (1974) la vitamina imprescindible en cultivo de tejidos es la Tiamina, considerada esencial para un buen crecimiento del cultivo.

Otras vitaminas han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro* como: piridoxina, ácido nicotínico, pantotenato de calcio, riboflavina.

Mio-inositol

Estimula el crecimiento y división celular en muchas especies vegetales. La concentración más utilizada es de 100 mg/litro.

Aminoácidos

Los aminoácidos son utilizados como fuente de nitrógeno reducido y son favorables para la proliferación de callos y la regeneración de plantas a partir de los mismos. Se usan generalmente en forma de mezcla como caseína hidrolizada o extracto de levadura.

Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos son muy variables según la especie y la técnica utilizada.

Hasta el momento, no ha sido posible establecer una regla general (García *et al.*, 2008).

Reguladores de crecimiento

Se entiende por reguladores de crecimiento a las hormonas vegetales, las mismas que son sintetizadas en un deter-

minado lugar de la planta y se translocan a otro donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento y el desarrollo o metabolismo del vegetal. El término “sustancias reguladoras de crecimiento” es mas general y abarca a las sustancias, tanto de origen natural como sintetizadas en laboratorios.

Los reguladores de crecimiento pueden ser de varios tipos:

a) Auxinas

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular.

Los principales efectos que producen en las plantas son:

- Estimulación de la elongación celular en tallos
- Estimulación de la dominancia apical, es decir, la yema apical se desarrolla inhibiendo el crecimiento de las yemas axilares cercanas
- Estimulación de la formación de raíces laterales

Las auxinas pueden ser producidas por la planta como el ácido indol acético (IAA) o sintéticas como el ácido indol butírico (IBA), ácido naftalen acético (NAA), 2,4 ácido diclorofenoxiacético (2,4D).

b) Citoquininas

Estos reguladores deben su nombre a su función, la

citoquinesis. En conjunto con las auxinas, estimulan la división celular.

Los principales efectos que producen las citoquininas son:

- Estimulan el crecimiento, la diferenciación y la morfogénesis
- Provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento
- Estimulan la formación de tallos
- Estimulan el crecimiento de las yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas).

Las citoquininas pueden ser producidas por la planta como la Zeatina o ser sintéticas como la Kinetina y la Benzyl aminopurina (BAP).

En cultivo de tejidos es importante que las auxinas y las citoquininas estén en equilibrio para estimular el desarrollo de los mismos. Cuando hay mayor concentración de auxinas en el medio, se estimula la formación de raíces y cuando la concentración de citoquininas es mayor, se estimula la formación de la parte aérea.

c) Giberelinas

Las giberelinas (GA) están relacionadas con

- Estimulación de la floración, sin embargo en algunas plantas pueden inhibir la floración

- La germinación es su principal efecto, casi todas las semillas germinan cuando son inducidas por GA. Estas posibilitan la movilización de las sustancias de reservas en la semilla (Zryd, 1988 mencionado por Ugarte *et al.*, 2010).
- En cultivo de tejidos estimulan la germinación de semillas y embriones y la elongación de brotes

d) Ácido abscísico y etileno

Estos reguladores de crecimiento no son generalmente utilizados en cultivo de tejidos, sin embargo hay casos en los que se utiliza ácido abscísico para disminuir el crecimiento y estimular la conservación de los explantes o para la producción de tubérculos y bulbos *in vitro*, denominados microtubérculos y microbulbillos.

El etileno es producido por las plantas *in vitro* y su acumulación puede producir problemas en el crecimiento de las plantas y vitrificación, por lo que constituye más bien un problema de los cultivos *in vitro*.

Carbón activo

El carbón es utilizado en cultivo de tejidos para absorber las sustancias fenólicas y otras sustancias tóxicas que son excretadas por el explante y que se acumulan en el medio de cultivo. Estas sustancias dañan los tejidos e incluso puede provocar la muerte del explante. Las concentraciones que se usa de carbón activo, varían entre 0,5 y 5 g/litro.

También se le atribuye al carbón activo un efecto favorable sobre el desarrollo de las raíces, debido al oscurecimiento del medio de cultivo.

Agente gelificante

El medio de cultivo puede ser líquido o solidificado por medio de un agente gelificante que permite mantener el material cultivado en la superficie. Los tejidos de algunas especies crecen mejor en algunos gelificantes que en otros (Orellana, 1998).

El agar es el material de soporte más utilizado en cultivo de tejidos por proveer al medio un excelente gel húmedo, sin embargo, fisiológicamente no es inerte y posee además impurezas (Hurtado y Merino, 1994).

El phytigel es un gelificante sintético y se caracteriza por tener un bajo porcentaje de impurezas, textura fina y calidad más consistente que la mayoría de los gelificantes, facilitando la detección de cualquier agente contaminante por su apariencia cristalina (Villegas, 1988 mencionado por Ugarte *et al.*, 2010).

El costo del agente gelificante en el medio de cultivo, representa un porcentaje importante en el total del costo del medio. Pérez y Claure (2004) mencionan que el agente gelificante más económico es la caragenina, el mismo que se obtiene de algas rojas.

pH del medio de cultivo

El rango óptimo de pH para cultivo de tejidos fluctúa entre 5-6, debido a que las sales se encuentran en forma soluble. Valores superiores a seis presentan problemas de precipitación de nutrientes y valores inferiores a 3,5 manifiestan mala gelificación del medio de cultivo.

ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO*

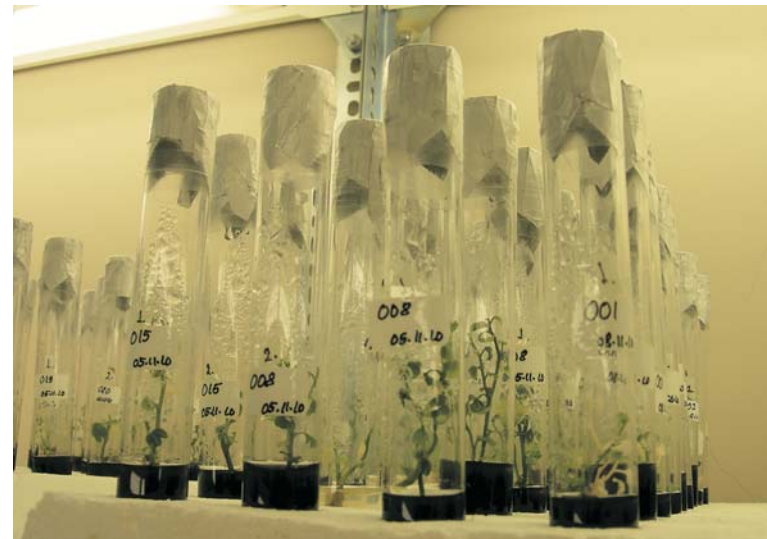
Para establecer una planta *in vitro*, se debe partir de plantas sanas y en crecimiento activo. Para este fin, lo más adecuado es tomar los explantes de plantas que son cultivadas en invernadero y que han sido tratadas para reducir la población de patógenos y contaminantes.

Se pueden introducir *in vitro*: esquejes, yemas, meristemas, anteras y también pedazos de hojas, dependiendo del objetivo del cultivo. Generalmente, lo más común es introducir esquejes o yemas. También se pueden introducir semillas o embriones. El establecimiento mediante embriones constituye una buena alternativa para las plantas que poseen semillas con dormancia o alguna dificultad para germinar.

Mientras más pequeño sea el explante a ser establecido, tiene menos posibilidades de llevar contaminantes en su superficie, lo cual es una ventaja, pero si es muy pequeño será más difícil la brotación de una planta a partir del mismo.



Introducción *in vitro* de un embrión extraído de una semilla



Plántulas establecidas *in vitro*

El primer paso para establecer un cultivo es la desinfección de los explantes. Los explantes una vez desinfectados tienen que ser utilizados inmediatamente, introduciéndolos en un medio de cultivo.

Se dice que un cultivo está establecido, cuando se desarrolla de manera adecuada en un medio de cultivo.

TÉCNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS

Existen varias técnicas de cultivo de tejidos las cuales son utilizadas de acuerdo a los objetivos que se persigue, como multiplicación de plantas, limpieza de virus, conservación de germoplasma, entre otros. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden además complementarse una con otra.

Estas técnicas han revolucionado los métodos clásicos de producción de plantas.

MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación consiste en la multiplicación por medio de esquejes que se obtienen de una planta y a partir de los cuales, se desarrollan nuevas plantas, dando lugar a clones de la planta multiplicada. Es una técnica simple, pero que puede dar lugar a una industria de plantas multiplicadas *in vitro* en las denominadas Biofabricas.

Esta técnica consiste en reproducir plantas conformes a la planta madre por la estimulación de capacidades naturales de multiplicación vegetativa de la especie, o por la inducción de una nueva formación de brotes y raíces. Es la multiplicación a través de cultivos sucesivos en un medio adecuado para la multiplicación.

Este método pone todo su interés en la multiplicación masiva de plantas en condiciones estériles, a partir de plántulas reconocidas como sanas, por lo tanto sin contaminaciones.

La tasa de multiplicación es muy elevada, de miles por año, lo que permite lograr un producto de calidad y en gran cantidad en un tiempo muy corto (Villarroel y Cadima, 2010).

El principal objetivo de la multiplicación es el de producir el mayor número de plantas posible, en el menor tiempo. No basta conseguir altas tasas de multiplicación, lo importante es la reproducibilidad del sistema, es decir, conseguir un mínimo de variación de explante a explante. Otro aspecto esencial, es la calidad y homogeneidad de las partes áreas producidas.

La tasa de multiplicación es el número de explantes nuevos producidos a partir de un explante inicial, en un cierto periodo.

Se inicia la multiplicación con **el establecimiento** o la obtención de un cultivo de partes áreas y yemas libres de contaminación, que están suficientemente establecidas *in vitro* y receptivas a la aplicación de reguladores de crecimiento.

Según Villarroel y Cadima (2010), los factores que determinan **la multiplicación**, que pueden ser manipulados para optimizar esta etapa son:

- Composición del medio de cultivo
- Condiciones de la incubación
- Cuidados en la manipulación del material durante los subcultivos.

Composición del medio de cultivo

Es muy común la utilización de la misma composición básica en la fase de establecimiento y la multiplicación: macro y micronutrientes, vitaminas, mioinositol, una fuente de energía (generalmente sacarosa), reguladores de crecimiento y eventualmente otros compuestos orgánicos como aminoácidos.

Las variaciones en la composición de los medios dependen de la especie, las más frecuentes están relacionadas a la concentración de macronutrientes y reguladores de crecimiento.

Las manipulaciones de micronutrientes y vitaminas, igualmente indispensables, generalmente no resultan en alteraciones significativas en la multiplicación.

Los fitoreguladores, particularmente las citoquininas se constituyen indispensables para la multiplicación, siendo la bencil amino purina (BAP), la citoquinina más eficaz para promover la multiplicación en diversas especies.

Las concentraciones de auxina son frecuentemente bajas comparadas a la de las citoquininas, para mantener un balance auxina/citoquinina adecuado.

Concentraciones excesivas de auxina pueden inhibir la multiplicación y favorecer el enraizamiento o la formación de callo en detrimento de la multiplicación.

Las giberelinas son usadas en la fase de multiplicación de algunas especies como la papa, donde se requiere la elongación de las partes aéreas para la multiplicación de los entrenudos.

Condiciones de la incubación

La luz cumple un papel importante en la morfogénesis, generalmente se utiliza un fotoperiodo de 16 horas de luz con una intensidad de 3 000 a 4 000 lux. La temperatura óptima se encuentra en un rango entre 20 - 28°C.

Otro aspecto que debe ser considerado, es el microambiente dentro de los recipientes de cultivo. Los principales factores que determinan la calidad del microambiente son los tipos de tapa, los frascos utilizados y la cantidad de medio de cultivo presente en el frasco.

El tipo de tapa utilizado determinará el nivel de intercambio gaseoso con el ambiente externo. Tapas totalmente herméticas, pueden ser buenas para evitar la contaminación, sin embargo, no permiten un intercambio gaseoso adecuado, pudiendo existir un aumento en la acumulación de CO₂ y

etileno, trayendo como consecuencia una disminución del contenido de clorofila.

El tipo de frasco y la cantidad del medio utilizado son variables y afectan directamente al crecimiento de las plantas incubadas.

Cuidados en la manipulación del material durante los subcultivos

El tratamiento dado a los explantes durante la fase de multiplicación, involucra una serie de factores que afectan al desarrollo de los cultivos. Su mayor influencia se hace sentir en la homogeneidad de las plantas producidas.

Estos factores pueden ser agrupados en tres aspectos:

La frecuencia de los subcultivos

- El tipo y tamaño del explante subcultivado
- Los cuidados durante el procedimiento de repicado.
-

El repicado, es el proceso por el cual se multiplica y refresca el cultivo, consiste en cortar pedazos de la planta madre para colocarlos en un medio nuevo y así estimular su desarrollo.

En una primera fase después del repicado, el explante se restablece del estrés sufrido por las manipulaciones. La siguiente fase se caracteriza por un crecimiento y multiplicación exponencial (cuando el explante utiliza rápidamente el medio de cultivo). En la última etapa, el explante inicia un proceso de senescencia en función del déficit nutricional,



Repicado de los explantes en un medio nuevo

falta de agua en el medio, acumulación de etileno y otros gases en el frasco y eventualmente, barreras físicas al crecimiento como la tapa y las paredes del recipiente.

El periodo más común entre repiques es de cuatro semanas, sin embargo, no todas las especies están listas en este tiempo. Algunas especies leñosas, presentan periodos de adaptación más largos, iniciándose la multiplicación en la segunda o tercera semana por lo tanto, requieren de periodos más largos entre repiques.

Como medida para mantener la calidad del trabajo, es importante hacer una selección de las anomalías o deterioraciones de los cultivos como: vitrificaciones, hojas



Explanete introducido en un medio nuevo

secas, callos en la base, ápices necrosados.

Posterior a la fase misma de multiplicación, se tiene la **fase de enraizamiento**. Las partes aéreas producidas *in vitro* son transferidas a medio de enraizamiento para estimular la formación de raíces, a fin de prepararlas para el subsecuente trasplante a un sustrato. Un sustrato es un suelo inerte que no posee actividad de microorganismos, es esterilizado por calor, también se utilizan sustratos minerales como vermiculita o perlita.

El enraizamiento es una etapa que puede ser realizada *in*



Enraizamiento en vermiculita

vitro o *in vivo*. En el primer caso, las raíces son regeneradas en condiciones asépticas y una planta completa es trasplantada en sustrato. En el segundo caso, todo el proceso de enraizamiento se da en sustrato estéril, aun en condiciones de laboratorio. La opción para determinar uno de los dos, depende fundamentalmente de la calidad de las partes aéreas obtenidas en la multiplicación de la especie y del tipo de planta.

El medio de cultivo para inducir la formación de raíces normalmente contiene la presencia de una auxina o en algunos casos simplemente el medio básico sin hormonas. Las auxinas más comúnmente usadas son: ácido naftalen acético (NAA) y ácido indol acético (IAA). En algunos casos, se utiliza también el carbón activo, ya que simula las condiciones de oscuridad, en las cuales las raíces desarrollan mejor.

Los explantes recién enraizados, son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de **la aclimatación**.

La etapa de trasplante involucra la transferencia de la plantas de condiciones *in vitro* a condiciones *in vivo* en invernadero, donde la planta es sometida a una fase de aclimatación y endurecimiento. Esta fase es crítica y representa en algunos casos, un factor limitante en el proceso de micropropagación, debido a los siguientes factores (Grattapaglia y Machado, 1997):

- La planta debe pasar de una situación con máxima humedad a un ambiente más seco, que la hace más susceptible a la deshidratación.
- La planta pasa de una condición heterótrofa, en la cual depende de un suplemento externo de energía (sacarosa en el medio de cultivo) para un estado autotrófico, en el cual precisa realizar fotosíntesis para sobrevivir.
- La planta pasa de una condición de alta disponibilidad de nutrientes y agua en el medio, hacia otra donde es posible que no se tengan todos los nutrientes altamente disponibles.
- La planta sale de un estado aséptico, hacia un ambiente donde está sujeta al ataque de microorganismos saprófitos y eventualmente patógenos.

Al ser la aclimatación una fase crítica, se deben tener en cuenta una serie de cuidados, además de la importancia de la calidad de las plantas provenientes de la fase anterior.

Durante el trasplante, el estrés hídrico de las plantas es generalmente el mayor problema. Una planta aparentemente perfecta *in vitro*, presenta una serie de deficiencias anatómicas que dificultan el control de la transpiración, permitiendo una rápida pérdida de agua. Los estomas no son funcionales y responden muy lentamente al estrés hídrico, la cera protectora sobre las hojas es mínima o inexistente, la

conexión en el sistema vascular del tallo y de las raíces adventicias, aun es precario para permitir un flujo transpiratorio adecuado.

Es fundamental el mantenimiento de una humedad relativa alta, desde que la planta es retirada del medio de cultivo hasta que empieza a crecer nuevamente. La humedad se debe reducir gradualmente y los sistemas utilizados para este fin, dependen de las condiciones de trabajo. Por ejemplo, la aclimatación de pasifloras en el Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, se realiza en las condiciones del laboratorio de cultivo de tejidos. Las plántulas de pasifloras se colocan en bandejas que tienen tapa, con sustrato estéril y estas bandejas se van destapando periódicamente y por periodos de tiempo cada vez más largos. Recién cuando se observa que la planta ha prendido y empieza a crecer, alrededor de un mes después del trasplante, se la lleva al invernadero.

El sustrato de trasplante es otro factor crítico en el proceso de aclimatación. Desde el punto de vista físico, éste debe tener una buena capacidad de retención de humedad y no compactarse excesivamente a fin de no comprometer el drenaje y consecuentemente la aireación del sistema radicular. Químicamente, el sustrato debe ser de preferencia inerte, de modo de permitir la manipulación de los contenidos de nutrientes de acuerdo con las necesidades de la especie.

Los sustratos más utilizados en nuestro medio son mezclas de musgo, arena y cascarilla de arroz. También pueden utilizarse vermiculita y perlita, pero tienen un costo elevado. El sustrato generalmente es esterilizado a fin de mantener



CIFP

Aclimatación de plántulas de pasifloras



CIFP

Tejidos oxidados que presentan un color oscuro

las condiciones de asepsia del laboratorio. En algunos casos también es útil rociar con algún fungicida para evitar el desarrollo de hongos saprófitos en la superficie del sustrato.

Se pueden presentar algunos problemas y **limitaciones en la micropropagación** como la contaminación con hongos, bacterias y levaduras del medio de cultivo.

Una limitación importante que se presenta es la oxidación de los compuestos fenólicos que son liberados por las células dañadas con el corte. Estos compuestos, se difunden en el medio de cultivo oscureciéndolo y son tóxicos para la planta, lo cual conduce a veces a la muerte del explante.

Para evitar la oxidación fenólica se utilizan sustancias antioxidantes en el medio de cultivo, como el ácido ascórbico, el ácido cítrico, PVP (polivinilpirrolidona) y el carbón activo. Estos productos son utilizados ya sea en el medio de cultivo o en forma de enjuague al momento del repique.

Durante la micropropagación, a veces se presentan tejidos que tienen un aspecto transparente y acuoso, denominado vitrificación. La vitrificación puede ser debida al exceso de citoquininas, concentración y tipo de agente gelificante en el medio y en algunos casos se debe al exceso de vapor de agua en los envases, lo cual se reduce utilizando tapas que permitan un mayor intercambio gaseoso con el ambiente y por lo tanto la difusión del agua (Villarroel y Cadima, 2010).

La presencia de callo también es una limitación para la micropropagación. Considerando que la finalidad de la

misma es la multiplicación de plantas conforme a la original, el callo puede dar lugar a variaciones genéticas en las plantas, que se originan a partir de él. Las variaciones genéticas que se producen con cultivo de tejidos se llaman variación somaclonal.



CIFP

Presencia de callo en un planta micropropagada

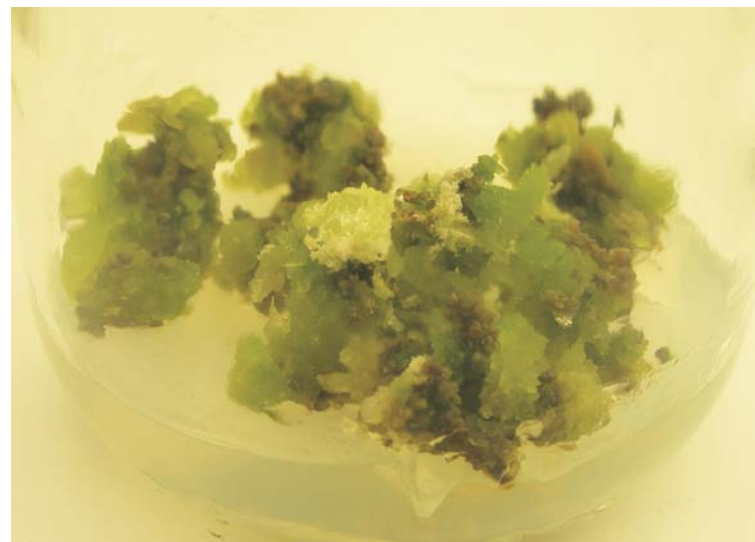
REGENERACIÓN DE PLANTAS

La morfogénesis es el resultado de una división organizada y diferenciación celular. La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos que suceden frecuentemente durante el cultivo *in vitro* de especies vegetales.

La regeneración de plantas se realiza directamente a partir de los explantes o de un tejido desorganizado denominado callo. El callo es inducido en un explante puesto en un medio de cultivo con alta concentración de auxina, especialmente la auxina 2,4D, la cual inhibe el crecimiento del tejido y provoca el crecimiento desorganizado.

Una vez obtenido el callo, se lo coloca en un medio de cultivo que estimula la regeneración de plantas. La regeneración de plantas, puede ocurrir por medio de organogénesis o por embriogénesis.

La regeneración de plantas por medio de organogénesis o embriogénesis somática, se utiliza como una alternativa a la micropropagación, pero se tiene que tener en cuenta el riesgo de variaciones genéticas, cuando pasa por la fase de callo.



Callo en un medio de cultivo

Regeneración de plantas mediante organogénesis

La **organogénesis** consiste en la formación de órganos (yemas o de meristemas radiculares) a partir de callo o directamente de un explante.

Las células a partir de las cuales se forma un órgano, son regiones de mayor división celular que estimulan la división de las células circundantes.

La organogénesis normalmente envuelve la regeneración de yemas a partir de éstas células meristemáticas (Villarreal y Chavez, 2010).

Los factores que afectan a la organogénesis son los siguientes (Litz y Jarret, 1991):

a) Explante

Todos los tejidos de la planta se pueden utilizar como explantes para la iniciación de callo, no obstante, los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad *in vitro*. Se ha observado variación en la respuesta de ciertos explantes pertenecientes a la misma especie y entre especies.

El tamaño del explante puede determinar la respuesta *in vitro*. Los explantes grandes son más difíciles de desinfectar que los pequeños, pero generalmente poseen un potencial regenerador considerablemente mayor. Los explantes pequeños pueden además, ser dañados más fácilmente.

El potencial organogénico de un explante es inversamente proporcional a su edad fisiológica y el estado de la planta donadora. La estación del año durante la cual el explante es extraído puede también afectar el potencial organogénico. El explante debe ser extraído de una planta joven, sana y que no haya sufrido estrés.

b) Medio de cultivo - reguladores de crecimiento

El callo es inducido en un medio que contenga una alta concentración de auxina, generalmente 2,4D, o una proporción alta auxina: citoquinina.

En medios con citoquinina, algunas veces ocurre la organogénesis directamente del explante.

La diferenciación de yemas se logra subcultivando los callos en un medio que tenga alta relación citoquinina: auxina; en cambio para la diferenciación de raíces se requieren medios con una relación alta auxina: citoquinina.

Las giberelinas no tienen un papel claro en la organogénesis, aunque generalmente inhiben la diferenciación, algunas veces estimulan la formación de yemas.



Plantas regeneradas de tabaco a partir de callo, mediante organogénesis

La regeneración de plantas vía organogénesis incluye los siguientes pasos:

- Obtención de callo
- Inducción de yemas o de meristemas radiculares
- Desarrollo de las plántulas
- Enraizamiento de las plántulas.

Regeneración de plantas mediante embriogénesis

La **embriogénesis** es la obtención de embriones somáticos directamente del explante o a partir de un callo. Es un proceso biológico mediante el cual una célula o un grupo de células somáticas se transforman y se comportan como un cigoto, originando un embrión que posteriormente formará una nueva planta.

Un embrión somático, tiene una estructura similar a un embrión sexual (fruto de la unión de dos gametos), con la diferencia que en la obtención de un embrión somático no hay unión de gametos y éste es generado por medio de cultivo de tejidos.

Los embriones somáticos son estructuras bipolares, presentan un eje apical-radical, aislados por un tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno.

La producción de embriones *in vivo*, es un evento morfogénico que ocurre en algunas especies como *Mangifera indica*, *Garcinia mangostana* y en los ápices de las hojas de la orquídea *Malaxis palmosa*.

Este método, es considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la naturaleza bipolar del embrión, la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos periodos de tiempo y la posibilidad de encapsular estas estructuras para obtener semillas artificiales.

Sus desventajas radican en que aún no se tiene total conocimiento sobre los parámetros que regulan este proceso y su uso en gran escala sigue siendo limitado a pocas especies (Gómez, 1999).

Los factores que afectan la embriogénesis somática son los siguientes (Litz y Jarret, 1991):

a) Explante

Prácticamente todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar callos *in vitro*, sin embargo, pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos. Comúnmente se han usado como explantes iniciales partes de plantas en crecimiento activo y jóvenes. En varias especies se han utilizado embriones sexuales, yemas y también segmentos de hojas, tallos, raíces, entre otros.

La respuesta embriogénica del callo, depende del genotipo de la planta. Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares, no responden en el mismo medio.

b) Medio de cultivo

Generalmente se ha usado el medio de Murashige y Skoog (MS) o modificaciones a esta formulación, la concentración alta de sales de este medio parece ser muy benéfica para el crecimiento de embriones somáticos.

Se ha observado en callos de zanahoria, que su potencial embriogénico es incrementado cuando se los expone a altos niveles de sacarosa o manitol a fin de aumentar el potencial osmótico del medio de cultivo.

El nitrógeno, suministrado como nitrato o como ion amonio es habitualmente incluido en las sales minerales de los medios de cultivo; sin embargo el suministro adicional de nitrógeno orgánico o reducido, es muy importante para estimular la embriogénesis somática.

El nitrógeno orgánico es incluido generalmente al medio en forma de caseína hidrolizada o extracto de levadura.

Se ha observado también, que la inclusión de poliamidas, como la putrescina y la espermidina, está relacionada con el control de la embriogénesis somática en zanahoria.

Para la iniciación de un callo embriogénico usualmente se emplea la auxina 2,4D, sin embargo, la maduración de los embriones y su germinación no ocurren en presencia de 2,4D, sino generalmente se requiere de una citoquinina para la maduración y germinación de los embriones.

El ácido giberélico, es incorporado también al medio, con el fin de ayudar a la maduración y germinación de los embriones.

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye los siguientes pasos:

- Obtención del callo
- Inducción de proembriones somáticos
- Desarrollo de los embriones somáticos
- Proliferación o multiplicación
- Maduración
- Germinación y conversión en plantas.



CIFP

Regeneración de plantas de orquídea a partir de callo embriogénico

La inducción de proembriones empieza como divisiones continuas que dan lugar a la formación de agregados celulares embrionarios. Estos agregados se van dividiendo y proliferando y generan un embrión, el cuál sufre un proceso de maduración y acumulación de sustancias de reserva para posteriormente germinar.

Uno de los aspectos más poderosos de la embriogénesis somática, que permite su aplicación en la propagación masiva, es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas, de proliferar o multiplicarse indefinidamente. Es decir, los embriones generan otros embriones (Gómez, 1999).

CONSERVACIÓN *IN VITRO*

La conservación *in vitro* permite la conservación de plantas en un laboratorio de cultivo de tejidos.

Una planta es conservada porque es considerada un recurso genético y por lo tanto es valiosa y estratégica para el país o la región, por su potencial utilitario actual o futuro. Este material vegetal se conserva en forma de colecciones en bancos de germoplasma.

Germoplasma se considera a una estructura que puede dar origen a una nueva generación transmitiendo sus características genéticas, como por ejemplo las semillas. La forma más común de conservar germoplasma es mediante la conservación de semillas, sin embargo algunas plantas no pueden ser conservadas a bajas temperaturas porque

pierden su capacidad de germinación, éstas son llamadas plantas de semillas recalcitrantes o semi-recalcitrantes.

La conservación *in vitro* se considera como una excelente alternativa para la conservación de plantas de reproducción asexual y de semilla recalcitrante. Esta metodología permite la conservación de un gran número de plantas en espacios reducidos, un mayor control sobre el estado fitosanitario de las colecciones, la disponibilidad permanente de material vegetal, la facilidad de intercambio de material vegetal y la eliminación del riesgo de ataque de factores bióticos y abióticos como ocurre normalmente *in vivo*. Los factores bióticos son las enfermedades y las plagas que atacan a los cultivos y los factores abióticos son la sequia, el exceso de agua, el granizo, el viento, etc.

Como ejemplo de ahorro de espacio, alrededor de 900 accesiones de la colección *in vitro* de papa que era custodiada por la Fundación Proinpa, se mantenían en menos de 4 m², en tanto que en el campo se requieren al menos 5.000 m² para el mismo número de muestras (Cadima y Villarreal, 2010).

La desventaja de la técnica es el costo y el hecho que requiere mano de obra calificada, además el desarrollo de protocolos particulares para cada especie e incluso variedades dentro de una misma especie (Roca *et al.*, 1992; Withers, 1993). Por otro lado existe una eventual pérdida del potencial regenerativo de la planta en conservación y algunas especies son susceptibles a mutaciones.

La conservación *in vitro* tiene que considerarse como parte de la estrategia general de conservación de una especie vegetal; es más bien un auxiliar valioso y un suplemento en la conservación de los recursos genéticos. Solo ocasionalmente, el almacenamiento *in vitro* sería la única estrategia para conservar una especie.

En general la conservación *in vitro* es complementaria a la conservación en campo, en plantas anuales como los cultivos de raíces y tubérculos, (papa, yuca y camote), que se almacenan como semilla durante cortos periodos y se siembran en campo cada año, se tiene una copia en cultivo de tejidos.

Para otros cultivos como la banana y el plátano, que rara vez producen semilla y son prácticamente estériles o el caso de especies tropicales de semilla recalcitrante, como algunas especies forestales y especies del genero *Passiflora*, la conservación *in vitro* es también complementaria a la conservación en campo.

La conservación *in vitro* puede realizarse a mediano o largo plazo. La conservación a mediano plazo frena el desarrollo de los explantes *in vitro* mediante el uso de compuestos que retardan el crecimiento como el manitol y el sorbitol, que son sustancias fisiológicamente inactivas que cambian el potencial osmótico del medio y hacen que los nutrientes y el agua estén menos disponibles para los cultivos.

Los cultivos en medios con manitol y sorbitol crecen más lentamente y en lugar de tener que repicarlos cada 4-6 se-



CIFP

Plántula en un medio de conservación, se observan los entrenudos cortos y las hojas pequeñas

manas estos son repicados cada 10-12 meses, con el consiguiente ahorro de mano de obra, medios de cultivo y espacio en la cámara de crecimiento.

Algunas veces este procedimiento esta complementado con el almacenamiento a bajas temperaturas que frenan el crecimiento de las plántulas *in vitro*. Para especies de hábitats fríos y templados se recomiendan temperaturas entre 2 a 15°C y entre 8 a 15°C para especies tropicales y subtropicales. En algunos casos se utiliza inhibidores de crecimiento como el ácido abscísico, siendo un procedimiento no muy recomendado debido a que se le asocian cambios en la conformación genética de los materiales conservados.

La conservación *in vitro* debe asegurar el mantenimiento de la viabilidad de los explantes conservados y también la estabilidad de su conformación genética al cabo del tiempo de conservación.

Luego de los meses de conservación, las plantas son repicadas en un medio de cultivo de multiplicación o micropropagación y los explantes colocados en el nuevo medio, deben ser capaces de brotar y dar lugar a una planta conforme a la original.

Conservación a largo plazo - crioconservación

La crioconservación permite inhibir el desarrollo del explante conservado en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C. Detiene toda actividad metabólica, razón por la cual, en teoría se la puede utilizar por periodos indefinidos.

Un explante crioconservado mantiene la viabilidad y la estabilidad genética del tejido conservado (Van der Hurk, 2000).

Antes de introducir los explantes en nitrógeno líquido, estos reciben un tratamiento que los protege del congelamiento que podría dañar los tejidos, mediante sustancias crio-protectoras. Estas sustancias evitan que el agua que se encuentra dentro y entre las células se cristalice y dañe las mismas.

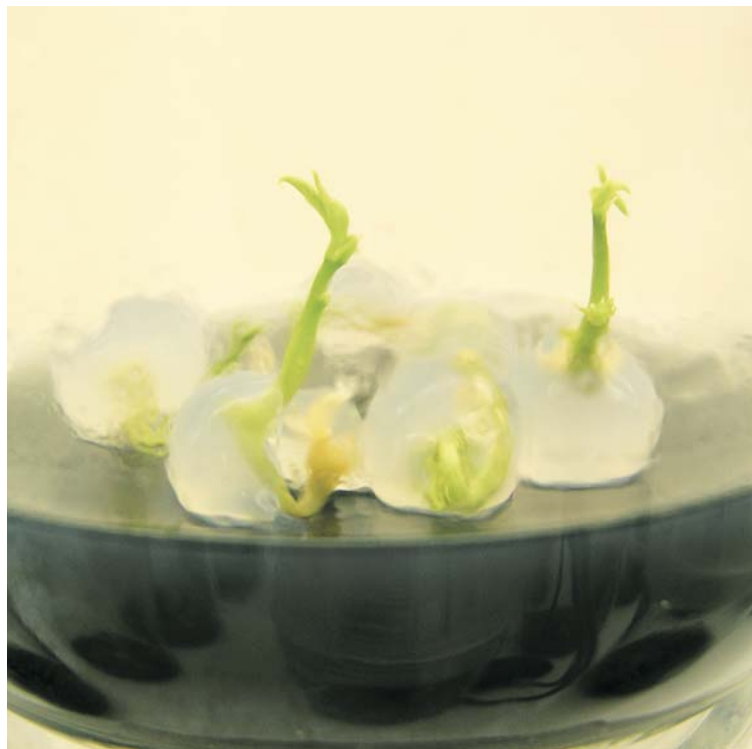
Los explantes son introducidos en unos tubos especiales que resisten bajas temperaturas que se llaman crioviales.



Crioviales introduciéndose al tanque de nitrógeno líquido

La crioconservación puede realizarse por medio de varias técnicas. La **vitrificación**, mediante la cual los tejidos son deshidratados con dosis elevadas de sacarosa conjuntamente con glicerol, etilenglicol y dimetilsulfóxido.

También la técnica de **encapsulación** de los tejidos en cuentas de alginato, que es como una gelatina que rodea al tejido. Las cuentas son desecadas y posteriormente introducidas al nitrógeno líquido (Avila *et al.*, 2010).



Plantas de pasifloras brotando de yemas encapsuladas crioconservadas

Finalmente también se puede crioconservar tejidos vegetales mediante el método de **gotas** que consiste en crioconservar los explantes en unas gotas de medio de cultivo con DMSO (dimetilsulfóxido).

Después de la crioconservación, el descongelamiento se realiza sumergiendo los crioviales en agua destilada estéril a 40°C durante 2 a 3 minutos. Posteriormente se introduce los explantes a un medio de cultivo de recuperación para dar lugar a plantas normales.

LIMPIEZA DE VIRUS

Es una técnica, que permite la limpieza de virus mediante cultivo de meristemas. Los meristemas, son aislados y sembrados en un medio de cultivo que posibilite el desarrollo de una planta completa. Generalmente, se siembra el domo meristemático acompañado por uno o dos primordios foliares. El domo es una estructura de menos de 0,1 mm de diámetro, muy difícil de extraer con éxito y de la cual resulta frecuentemente complicado obtener plantas completas. El meristema apical, se encuentra localizado en el extremo de la punta de un brote.

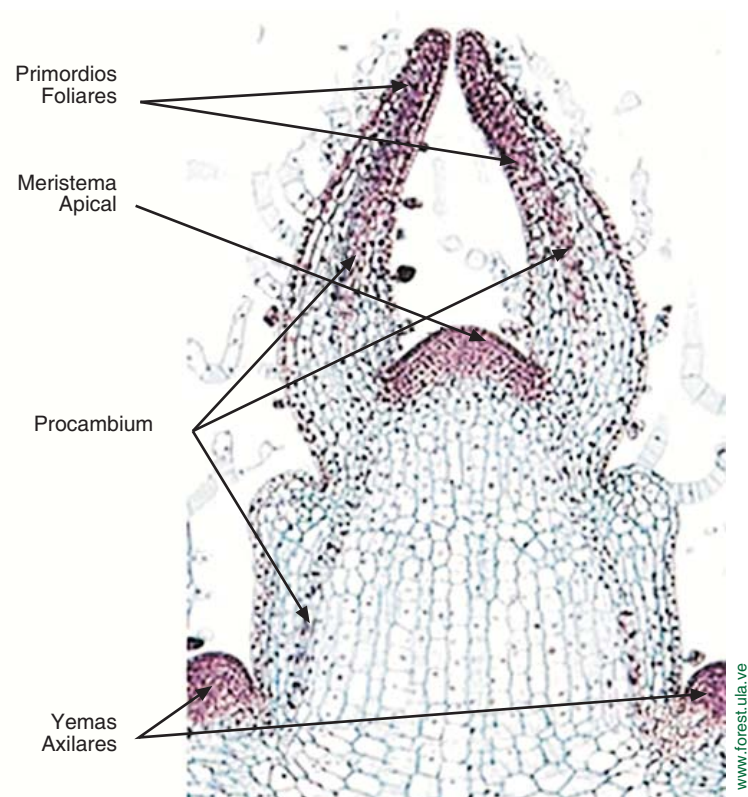
El cultivo de meristemas como una técnica para el saneamiento de plantas afectados por patógenos, especialmente virus, se fundamenta en que la distribución en los tejidos de una planta no es uniforme y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el meristema apical del tallo.

Esto aumenta la posibilidad de obtener plantas sanas mediante la escisión y el cultivo de meristemas en medio nutritivos estériles (Aguirre y Coca, 2010).

Los meristemas suelen tener pocos o ningún virus, las razones para que ello ocurra no están esclarecidas completamente, pero se mencionan como posibles las siguientes (Conci, 2004, mencionado por Aguirre y Coca, 2010):

- Sistema vascular poco diferenciado. Los virus son rápidamente transportados a lo largo de toda la planta por el floema y así se distribuyen sistémicamente.
- Elevada actividad metabólica. Presumiblemente es más difícil para un virus invadir células con elevada actividad metabólica, como en el caso de las células meristemáticas, donde tienen lugar una activa mitosis.
- Elevadas concentraciones de auxinas. Se ha observado que elevadas concentraciones de auxinas en el medio de cultivos inhiben la multiplicación de los virus, se puede suponer que altas concentraciones de auxinas endógenas existentes en los ápices meristemáticos, pueden producir un efecto similar.

La técnica de cultivo de meristemas tiene mejores resultados cuando está asociada a **termoterapia**, la cual consiste en exponer plantas a una temperatura alta (37-40°C diurna y 35°C nocturna) durante 3-4 semanas antes de la escisión de las puntas meristemáticas.



Estructura de un meristema

La termoterapia tiene el objetivo de reducir o inhibir la multiplicación viral en los tejidos tratados y que los brotes nuevos que se desarrollen durante la misma, tengan una menor concentración de virus que los tejidos iniciales.

Es a partir de estos brotes nuevos, que se realiza el cultivo de meristemas.

El éxito de la termoterapia, depende de la capacidad que tenga el tejido de soportar periodos largos de altas temperaturas que inactivan al patógeno, sin afectar significativamente el crecimiento del tejido vegetal.

La combinación de la termoterapia con el cultivo de meristemas, se fundamenta en la atenuación de los patógenos en plantas bajo tratamientos térmicos, por tanto, la región libre de microorganismos del meristema apical aumenta, permitiendo la extracción de meristemas de mayor tamaño con grandes posibilidades de estar sanos (García, 1999).

El reconocimiento de la zona meristemática varía entre especies, por lo tanto se requiere de estudios preliminares que revelen su ubicación y manipulación adecuada, con el objetivo de facilitar su extracción. Existen meristemas muy fáciles de localizar, como son los expuestos, tal es el caso de la papa, en otros cultivos pueden estar más internamente protegidos y se necesita separar mayor cantidad de pequeñas hojas para encontrar la zona meristemática, este es el caso de los bulbos como el ajo y la cebolla.

La disección aséptica del meristema, es un proceso delicado y requiere de muchas horas de práctica, debe realizarse con el apoyo de un microscopio estereoscopio en la cámara de flujo laminar (García, 1999).



CIFP

Vista en el estereoscopio de un meristema de haba rodeado de los primordios foliares

Los factores que determinan el cultivo de meristemas se describen a continuación (Aguirre y Coca, 2010; García, 1999):

a) Explante

El tamaño de los meristemas es directamente proporcional a su regeneración y crecimiento posterior *in vitro*. El riesgo de aparición de patógenos en los tejidos vegetales aumenta con el incremento del tamaño de los explantes iniciales. A menor tamaño de los explantes, existe una mayor probabilidad de obtener plantas libres de virus, pero a su vez, la regeneración de plántulas es menos probable.

El tamaño recomendado es variable y depende de la planta, del tratamiento previo, como la termoterapia y de los virus involucrados.

Existe una marcada influencia del genotipo en el éxito del cultivo de meristemas, donde los porcentajes de establecimiento varían no sólo entre especies, sino inclusive entre variedades y clones.

b) Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo es compleja, ya que un meristema es una porción mínima de la planta. Los medios MS son los más utilizados en especies herbáceas.

Los reguladores de crecimiento suelen utilizarse en bajas concentraciones y se recomienda la adición de auxinas y citoquininas para estimular la división celular y a veces se añaden giberelinas para lograr la elongación del vástago.

Frecuentemente se utilizan vitaminas: tiamina, piridoxina, ácido nicotínico y ácido pantoténico y el azúcar de mayor utilización es la sacarosa.

Generalmente, se usa medio sólido y en algunos casos cuando la planta tiende a oxidarse, carbón activo.

c) Condiciones de incubación

No hay requerimientos especiales de temperatura, se utiliza la misma en la cual crece normalmente la planta *in vitro*. En algunos casos, es necesario utilizar una intensidad de luz más baja durante los primeros días de cultivo.

Entre las ventajas del cultivo de meristemas tenemos:

- Los meristemas son genéticamente estables y resultan el tejido idóneo para la iniciación de programas de propagación *in vitro*.
- El cultivo de meristemas permite eliminar la contaminación de algunos virus por escape, puesto que los tejidos meristemáticos se mantienen sanos aun cuando el resto de las células están infestadas.
- Este método resulta efectivo para el control de bacterias y hongos contaminantes y patógenos.

Los progresos alcanzados en su aplicación han hecho posible propagar gran número de especies de importancia económica, los resultados han sido particularmente atractivos porque se pueden obtener plantas limpias de patógenos a partir de plantas sistémicamente infectadas.

Estas plantas libres de virus son micropropagadas y pueden aclimatarse, para su posterior traspaso al invernadero.

Generalmente, se utilizan plantas libres de virus en los sistemas de producción de semilla, como el caso de la papa. En este cultivo, se maneja un tubérculo como semilla, que es susceptible a la infección acumulativa por nematodos, hongos, bacterias y virus, dando lugar a un proceso conocido como degeneración o pérdida del rendimiento. Por este motivo, la producción de semilla de papa debe realizarse a partir de plantas provenientes de cultivo de tejidos libres de virus.

El diagnóstico de virus en las plantas se realiza mediante pruebas serológicas como Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), que es una técnica que permite detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno producido por un organismo infectado por virus. También pueden detectarse virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es una técnica molecular que detecta el ADN del virus. Una planta que ha pasado por cultivo de meristemas, se tiene que someter a un diagnóstico para confirmar que no tiene virus.

CULTIVO DE HAPLOIDES

Una célula haploide es aquella que contiene un solo juego de cromosomas o la mitad (n haploide) del número normal de cromosomas en células diploides ($2n$ diploide). Las células reproductoras, como los óvulos, el polen y los espermatozoides, contienen un sólo juego de cromosomas, mientras que el resto de las células de un organismo superior suelen

tener dos juegos de ellos. Cuando los gametos se unen durante la fecundación, dan lugar a un embrión que contiene un número normal de cromosomas ($2n$), es una célula diploide.

Los métodos más ampliamente usados para la creación de haploides se valen de la hibridación interespecífica o intergenérica y del cultivo de esporas (masculinas y femeninas). La finalidad de obtener, mediante cultivo de tejidos, organismos haploides es poder duplicarlos y generar rápidamente un organismo que tiene la misma información genética duplicada o sea un homocigótico en todos los genes. Estos organismos haploides duplicados, son utilizados en mejoramiento genético.

Generalmente para la obtención de organismos con un amplio grado de genes en estado homocigótico, se utilizan técnicas tradicionales de autocruzamiento genético durante varias generaciones, que toman varios años. La obtención de organismos haploides duplicados mediante cultivo de tejidos, permite acelerar los procesos tradicionales, disminuyendo el tiempo de varios años a un año.

El método más comúnmente empleado es el cultivo de anteras. Mediante esta técnica, las anteras que contienen polen inmaduro, se colocan en un medio de cultivo donde el polen se divide para formar embriones o callo. Transferidos éstos a medios de regeneración, se forman plantas. Las plantas mediante un tratamiento con colchicina pueden duplicar su juego de cromosomas y se vuelven haploides duplicados.

El medio de cultivo para obtener embriones o callos contiene una auxina, generalmente 2,4D y una fuente de nitrógeno reducido como los aminoácidos. Los embriones o callos obtenidos se colocan en un medio con concentraciones elevadas de citoquininas para la regeneración de plantas haploides, las cuales son posteriormente expuestas a la colchicina que se usa para la duplicación del contenido de cromosomas.

CULTIVO DE PROTOPLASTOS

El término protoplastos se refiere a componentes vivos de las células vegetales que están rodeados solo por la membrana plasmática, en realidad constituyen células desnudas de una planta. Debido a la ausencia de la pared celular, los protoplastos son utilizados para diversas manipulaciones genéticas, como la introducción de ADN para la obtención de plantas transgénicas, las cuales no serían posibles con plantas o células intactas. Los protoplastos sirven además como herramientas experimentales únicas para muchas investigaciones fisiológicas, biofísicas y bioquímicas.

Aunque existe un método mecánico para aislar protoplastos, el método enzimático es el más importante y efectivo para ese propósito. El método mecánico tiene, ante todo, un interés histórico, ya que su rendimiento es bajo, su procedimiento tedioso y su aplicación limitada. Dicho método consiste en aplicar un choque osmótico para producir plasmólisis en las células, las cuales se rompen luego mediante un corte; se pueden liberar los protoplastos de las células

rotas mediante el restablecimiento del nivel osmótico del medio de cultivo.

El método enzimático consiste en incubar las células en una mezcla de enzimas que degradan la pared celular. Generalmente se utilizan enzimas celulasas, hemicelulasas y pectinasas.

En teoría, es posible aislar protoplastos de cualquier tipo de planta, órgano o tejido, pero las fuentes que se usan corrientemente son mesófilo foliar y tejidos cultivados *in vitro* como células en suspensión, callos, ápices de plantas.

Los protoplastos son puestos en medios de cultivo para resintetizar la pared celular, dividirse, formar colonias y posteriormente regenerar plantas.

El cultivo de protoplastos es una técnica difícil y la mayoría de las especies de importancia económica fracasan en la regeneración de plantas a partir de protoplastos o presentan una regeneración apenas ocasional, que a veces está restringida a ciertos genotipos o células (Szabados, 1991).

EXPERIENCIAS EN BOLIVIA

En Bolivia la aplicación de la micropropagación inicia en 1986. La Unidad de Producción de Semilla de Papa UPS-SEPA, basa su estrategia para la producción de cerca de 3 000 tn anuales de semilla de papa, a partir de plántulas libres de enfermedades mediante el cultivo de tejidos. Esta empresa tiene una producción promedio anual de 322 000

plántulas *in vitro*, que luego de ser trasplantadas en invernadero, generan una producción de 1 290 000 minitubérculos (semilla pre-básica, de alta categoría genética y sanitaria). Con esta semilla pre-básica, SEPA provee al mercado nacional y además exporta a Brasil y Chile. La alta calidad de semilla de papa que se comercializa en el país, proviene precisamente de laboratorios nacionales como es el caso de SEPA (Aguirre *et al.*, 2007).

En el país existen otros laboratorios de cultivo de tejidos que utilizan la micropropagación como técnica de multiplicación de plantas de alta calidad, además de otras técnicas de cultivo de tejidos.

La Fundación PROINPA con la multiplicación de banano, durazno, manzana, frambuesa, cereza, frutilla, así como algunas especies ornamentales, cubren demandas específicas del sector público y privado. De igual manera en PROINPA, se han ajustado las metodologías para la conservación *in vitro* de raíces y tubérculos andinos.

El laboratorio de El Vallecito, perteneciente a la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno (UAGRM), multiplica, difunde clones y conserva germoplasma de yuca y camote. De igual manera, en la Carrera de Biología de la UAGRM se cuenta con un laboratorio dedicado a la propagación y conservación de orquídeas y otras plantas ornamentales y forestales.

El Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, aplica las técnicas de micropropagación, conservación *in*

vitro y crioconservación en una colección de pasifloras de altura, muestras colectadas entre los 1 800 y 3 000 m.s.n.m. en diferentes regiones del país. De igual manera se realiza cultivo de meristemas para la limpieza viral de habas y cultivo de anteras de maíz.

En la Universidad Mayor de San Simón se cuenta con dos laboratorios de cultivo de tejidos. El Centro de Semillas Forestales (BASFOR) se ha especializado en la multiplicación y conservación de especies forestales y en la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias se tiene un laboratorio que trabaja en la multiplicación y conservación de especies andinas y especies ornamentales.

El Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) trabaja en la multiplicación y conservación de especies forestales alto andinas en peligro de extinción, así como en la conservación de orquídeas endémicas del subtrópico de La Paz. La Facultad de Agronomía de la UMSA cuenta con un laboratorio que actualmente está realizando trabajos en micropropagación en plantas de papa, frutilla y crisantemo. De igual manera en la Carrera de Bioquímica de la UMSA, se tiene un laboratorio de cultivo de tejidos dedicado principalmente a la investigación en plantas aromáticas y medicinales.

La Escuela Militar de Ingeniería en La Paz cuenta con un laboratorio de cultivo de tejidos donde se trabaja en investigación y producción de plantas de papa y ornamentales.

En el laboratorio de la Universidad Técnica de Oruro se realizan trabajos de micropropagación y conservación de especies andinas.

En Bolivia, en los últimos 20 años, a pesar de los elevados costos de importación y de adquisición de equipos y reactivos, se ha logrado un amplio desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos, lo cual puede verificarse a través del significativo incremento de especies, variedades y número de plantas producidas mediante estas técnicas. Asimismo se ha fortalecido la capacidad de los laboratorios a nivel de equipos y recursos humanos (Aguirre *et al.*, 2010 y Avila e Izquierdo, 2006).

Los laboratorios de cultivo de tejidos en el país forman parte de la Red Boliviana de Biotecnología, la cual es una plataforma que agrupa a personas e instituciones vinculadas con las biotecnologías aplicadas a las áreas vegetal, animal y de microorganismos en el país. La REDBIO Bolivia forma parte de la Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal (REDBIO), promovida por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), que es una red que agrupa a redes nacionales, de todos los países de América Latina y el Caribe.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, G., Villarroel, C., Trujillo, A. Rocabado, C. Avila, T. Mendoza, V.H. y Pérez, J. 2007. El cultivo de tejidos vegetales en Bolivia. Experiencias de su uso actual en la agricultura boliviana. Congreso Sudamericano de Agronomía. Cochabamba.
- Aguirre, G. y Coca, M. 2010. Limpieza viral en especies vegetales. En: Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos (Aguirre G., Baudoin J.P. y Leigue L. eds.). UMSS-CIUF-CUD.
- Aguirre G., Baudoin J.P. y Leigue L. 2010 Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos. UMSS-CIUF-CUD.
- Aguirre, G., Calle. M. y Baudoin, J.P. 2010. Aspectos generales del cultivo *in vitro*. En: Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos (Aguirre G., Baudoin J.P. y Leigue L. eds.). UMSS-CIUF-CUD.
- Aguirre, G. y Calle. M. J.P. 2010. Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos. En: Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos (Aguirre G., Baudoin J.P. y Leigue L. eds.). UMSS-CIUF-CUD.
- Avila, T. e Izquierdo J. 2006. Management of the appropriate agricultural biotechnology for small producers: Bolivia case study. Electronic Journal of Biotechnology 9(1): 2-7.

- Avila, T., De la Barra, S., Coca, N., Aguilar, N. y Cespedes, J. 2010. Cultivo *in vitro* de pasifloras. En: Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos (Aguirre G., Baudoin J.P. y Leigue L. eds.). UMSS-CIUF-CUD.
- Cadima, X. y Villarroel, C. 2010. Conservación *in vitro* de especies vegetales. En: Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos (Aguirre G., Baudoin J.P. y Leigue L. eds.). UMSS-CIUF-CUD.
- Garcia, M., Hernandez, R., Bustios, S., Esteves, M., Echevarria, Y. Cruz, R., León, L. y Busto, L. 2008. Nuevas alternativas en la preparación de los medios de cultivo con la utilización de extracto de Aloe vera. Universidad del Pinar del Rio, Cuba. En: www.monografias.com/trabajos-pdf/medios-de-cultivo-aloe.pdf.
- Gómez, R. 1999. Aplicaciones de la biotecnología en la mejora genética de plantas y en la producción de semillas. Curso de Postgrado, Módulo 1. Instituto de Biotecnología de las plantas, Cuba.
- Grattapaglia, D. y Machado, M. 1997. Micropropagación. Curso Sistemas de micropropagación. Brasilia, Brasil.
- Hurtado, D. y Merino, M. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Edición Trillas. México.
- Krikorian, A. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivos de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones (Roca, W. y Mroginski, L. eds) Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.
- Litz R. y Jarret, R. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivos de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones (Roca, W. y Mroginski, L. eds) Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15:473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture: *Ann. Rev. Plant Physiol.* University of Calgary, Canada.
- Orellana, P. 1998. Propagación vía organogénesis y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba.
- Perez, J., Jlménez, E. y Agramonte D. 1998. Aumento de la eficiencia en la micropropagación. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Juan N. Perez (ed). Cuba, Editorial GEO.
- Pérez, J. y Claure, C. 2004. Evaluación de medios de cultivo con diferentes agentes gelificantes en micropropagación de espina del mar (*Hippophae rhamnoides*). En: Memorias de la IV Reunión Nacional de Biotecnología, Santa Cruz, Bolivia.
- Roca W. y Mroginski L. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: Cultivos de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones (Roca, W. y Mroginski, L. eds.) Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.

Roca, W., Arias, D. y Chávez, R. 1992. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. En: Cultivos de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones (Roca, W. y Mroginski, L. eds) Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.

Szabados, L. 1991. Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. En: Cultivos de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones (Roca, W. y Mroginski, L. eds) Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.

Ugarte, C., Villarroel, C., Aguirre, G. y State M. 2010. Medios de cultivo. En: Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos (Aguirre G., Baudoin J.P. y Leigue L. eds.). UMSS-CIUF-CUD.

Van der Hurk. 2000. Complementariedad entre la conservación *ex situ* y la *in situ*. En: Memorias de la 2da. Reunión boliviana de recursos fitogenéticos de cultivos nativos. Cochabamba.

Villarroel, C. y Cadima, X. 2010. Micropropagación de plantas. En: Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos (Aguirre G., Baudoin J.P. y Leigue L. eds.). UMSS-CIUF-CUD.

Villarroel, J. y Chávez, N. 2010. Embriogénesis somática y mutagénesis. En: Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos genéticos (Aguirre G., Baudoin J.P. y Leigue L. eds.). UMSS-CIUF-CUD.

Withers, L.A. 1993. New technologies for the conservation of plant genetic resources. International Crop Science. Crop Science Society of America. Madison, USA.

GLOSARIO

Áfidos: Constituyen una familia de insectos hemípteros. Pequeños y de morfología poco variada, son universalmente conocidos como pulgones. Pueden transmitir virus de una planta infectada a otra.

Apical: Región referente al ápice de la planta.

Autotrofos: Son organismos capaces de sintetizar todas las sustancias esenciales para su metabolismo a partir de sustancias inorgánicas, de manera que para su nutrición no necesitan de otros seres vivos. El término autótrofo procede del griego y significa "que se alimenta por sí mismo".

Callo: Los callos vegetales son tejidos desorganizados y sin diferenciar que pueden desarrollarse en la naturaleza o en cultivo *in vitro* bajo condiciones de cultivo controladas (medio de cultivo, luz y temperatura).

Citoquinesis: Referente a la división celular.

Etileno: El etileno es una hormona vegetal gaseosa que controla muchos procesos (germinación, senescencia y caída de hojas y flores, respuesta al estrés, etc.). En cierto tipo de frutos (climáticos) controla, además su maduración. Al inicio de ésta el aumento de etileno induce cambios en color, textura, aroma y sabor, que hacen que el fruto sea apetecible.

Elongación: Se refiere a crecimiento o alargamiento de un explante.

Embriogénesis somática: La embriogénesis somática (asexual o adventicia), consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión gamética, en otras palabras, es un proceso por el cual se produce una estructura bipolar (embrión) a partir de una célula somática.

Embrión somático: Un embrión somático es una estructura bipolar resultado de una célula somática inducida mediante cultivo de tejidos.

Explante: Parte separada de una planta que será puesta en un medio de cultivo y en condiciones controladas de luz y temperatura.

Fenólicos: Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol. Los compuestos fenólicos de las plantas son un grupo heterogéneo de productos con más de 10.000 compuestos. Muchos son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas, aquellos productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo.

Fitoregulador: Es un producto regulador del crecimiento de las plantas; normalmente se trata de hormonas vegetales (fitohormonas), y sus principales funciones son estimular o paralizar el desarrollo de las raíces y las partes aéreas. Las fitohormonas son compuestos orgánicos sintetizados en una parte de la planta y que se translocan a otra parte

donde, a muy bajas concentraciones, provocan una respuesta fisiológica.

Foliar: Referente a las hojas de las plantas.

Fotoperiodo: Se denomina fotoperiodo al conjunto de procesos de las especies vegetales mediante los cuales regulan sus funciones biológicas (como por ejemplo su reproducción y crecimiento) usando como parámetros la alternancia de los días y las noches y su duración.

Gelificación: Referente al proceso de un gel de volverse sólido por efecto de la temperatura que se estabiliza a la temperatura ambiente.

Germinación: Es el proceso mediante el cual una semilla se desarrolla hasta convertirse en una nueva planta. Este proceso se lleva a cabo cuando el embrión se hincha y la cubierta de la semilla se rompe. En el caso de cultivo de tejidos es cuando el embrión somático da lugar a una nueva planta.

Giberelina: Es una fitohormona. Se producen en la zona apical, frutos y semillas. Sus funciones son: interrumpir el periodo de latencia de las semillas, haciéndolas germinar, inducir la brotación de yemas y promover el desarrollo de los frutos.

Haploides: Los organismos y las células haploides contienen un solo juego de cromosomas o la mitad (n , haploide) del número normal de cromosomas en células diploides ($2n$, diploide).

Heterótrofos: Los organismos heterótrofos (del griego *hetero*, otro, desigual, diferente y *trofo*, que se alimenta), en contraste con los organismos autótrofos, son aquellos que deben alimentarse con las sustancias orgánicas sintetizadas por otros organismos, bien autótrofos o heterótrofos a su vez.

Macronutrientes: Son elementos químicos consumidos en grandes cantidades por las plantas. En cultivo de tejidos se consideran macronutrientes al nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre.

Meristema: Los meristemas están compuestos por células no diferenciadas que se dividen activamente, también llamadas células totipotentes por su habilidad de dar lugar a todos los tejidos vegetales.

Meristema apical: Meristema que se localiza en la zona apical de la planta.

Métodos enzimáticos: Métodos analíticos que utilizan enzimas para detectar sustancias en el organismo.

Morfogénesis: Es el proceso biológico que lleva a que un organismo desarrolle su forma. Este es uno de los tres aspectos fundamentales del desarrollo biológico junto con el control del crecimiento celular y la diferenciación celular.

Organogénesis: En cultivo de tejidos se considera la formación de un órgano por inducción del medio o las condiciones de cultivo.

Primordios foliares: Se encuentran en las yemas, protegiendo el domo meristemático, son hojitas que posteriormente darán lugar a hojas auténticas.

Proembrión: Estructura que dará lugar a un embrión.

Propágulo: Son las estructuras por medio de las cuales ocurre la reproducción asexual en vegetales, por la que se obtienen nuevas plantas y órganos individualizados. Por ejemplo los estolones, los rizomas, los tubérculos y los bulbos.

Protoplasto: Célula vegetal desprovista de pared celular.

Quelante: Es una sustancia que forma complejos con iones de metales pesados. A estos complejos se les conoce como quelatos, palabra que proviene de la palabra griega chele que significa "garra".

Recalcitrante: Se utiliza para definir una semilla que no puede ser deshidratada ni conservada a baja temperatura sin perder su capacidad de germinación.

Repicado: En cultivo de tejidos se utiliza para definir la multiplicación de una planta *in vitro*. Es tomar una muestra o explante de un cultivo y sembrarlo en un medio nuevo.

Senescencia: La última etapa del desarrollo vegetal es la senescencia. Se conoce que la senescencia es una forma de muerte celular programada.

Serológica: Prueba que permiten analizar el contenido de anticuerpos en el suero.

Somática: Las células somáticas son aquellas que forman el crecimiento de tejidos y órganos de un ser vivo.

Somaclonal: La variación somaclonal es la variación genética o epi genética que se genera durante el cultivo *in vitro* de plantas.

Termolábiles: Se refiere a un compuesto que puede sufrir alteración por efecto del calor.

Termoterapia: Tratamiento mediante el cual se utiliza altas temperatura para atenuar la multiplicación de los virus en plantas.

Totipotencia: Es la capacidad de una célula de dirigir el desarrollo total de un organismo.

Vitrificaciones: Cambios en las hojas, tallo y raíces que les dan una apariencia cristalina, acuosa, húmeda y translúcida. Estos desórdenes, especialmente manifiestos en las hojas, se producen en las plantas cultivadas *in vitro*.



CIFP

Regeneración de plantas de orquídea a partir de callo embriogénico