



Programa de la asignatura:

Cultivo de tejidos vegetales II

U2 | Protocolos y técnicas de trabajo *in vitro* para propagación



DCSBA



BIOTECNOLOGÍA



Índice

Presentación de la unidad	2
Propósitos de la unidad	3
Competencia específica	3
2.1. Inducción de callos	4
2.1.1. Iniciación de callos	5
2.1.2. Orientación del explante	9
2.1.3. Establecimiento de un cultivo	12
2.2. Regeneración y morfogénesis	14
2.2.1. Morfogénesis controlada	14
2.2.2 Embriogénesis somática	17
2.2.3. Regeneración de arroz	22
2.2.4. Requerimientos de latencia de explantes	23
2.3. Arbustos leñosos y árboles	25
2.3.1. Azaleas	29
2.3.2. Rosas	31
2.3.3. Árboles de Birch (Abedul)	32
2.3.4. Cedro blanco	34
2.4. Propagación comercial in vitro de ornamentales	35
2.4.1. Helechos	37
2.4.2. Ficus	44
2.4.3. Violeta africana	46
2.4.4. Cactus	48
Actividades	49
Autorreflexiones	49
Cierre de la unidad	50
Para saber más	51
Fuentes de consulta	52



Presentación de la unidad

Los protocolos y técnicas de trabajo *in vitro* para propagación pretenden ser un listado de aspectos puntuales a desarrollar por el micropropagador de plantas.

En esta unidad se revisarán dichos protocolos para obtener cultivo de callos, el cual, con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales y ambientales, permite desarrollar brotes, raíces, embriones, etc., los cuales a su vez pueden llegar a formar plantas completas. De igual forma, el empleo de brotes o nudos, son útiles para la regeneración y morfogénesis. Ambos procesos son puntos clave en la micro-propagación de plantas.

Durante el transcurso de esta unidad se han integrado cinco casos de estudio, los cuales se han obtenido de revistas científicas, con el fin de observar los objetivos y los variados protocolos empleados. De igual forma se hace una pequeña introducción sobre la importancia económica del sector de micro-propagación (cultivos ornamentales) que se relaciona con el éxito comercial del Cultivo de Tejidos Vegetales.

Definitivamente, el micropropagador de plantas requerirá de mucha práctica en la manipulación y al realizar una y otra vez el protocolo indicado, tomando notas de los pasos realizados y, sobre todo, de los resultados obtenidos, a través de una bitácora.

Esta segunda unidad está enfocada en el trabajo como practicante, y ofrece ideas para que construyas tu experiencia a través de la observación.



Propósitos de la unidad



- Identificar las características del producto final en los diversos protocolos.
- Comparar los diversos protocolos de trabajo y la diversidad de mecanismos para establecer un cultivo *in vitro*.

Competencia específica



Analizar protocolos utilizados en biotecnología vegetal para seleccionar técnicas correspondientes a la propagación in vitro en función de las necesidades del cultivo.



2.1. Inducción de callos

Como primer paso en muchos experimentos de cultivo de tejidos, es necesario inducir la **formación de callos** a partir de un explante primario. Este explante puede ser una plántula germinada asépticamente, o raíces esterilizadas superficialmente, tallos, hojas o estructuras reproductivas.

Callo

El callo es un tejido de herida producido en respuesta a una lesión, en otras palabras, el callo es una proliferación de células a partir de una región herida o cortada de un explante. Los callos son generalmente formados por células friables, largas y vacuoladas que son altamente diferenciadas, pero desorganizadas. Los callos también pueden ser duros y compactos, y contener regiones de pequeños agregados de células meristemáticas. Estas células meristemáticas, desdiferenciadas son en general competentes para regenerar, vía embriogénesis somática o iniciación de órganos, el desarrollo usual de brotes o raíces.

No todas las células en un explante contribuyen a la formación de callos, y más importante aún es que ciertos tipos de células de callos son competentes para regenerar estructuras. Otros tipos de células de callos no parecen ser competentes para expresar totipotencia. La **selección visual** temprana generalmente es necesaria para seleccionar el tipo de célula regenerable.

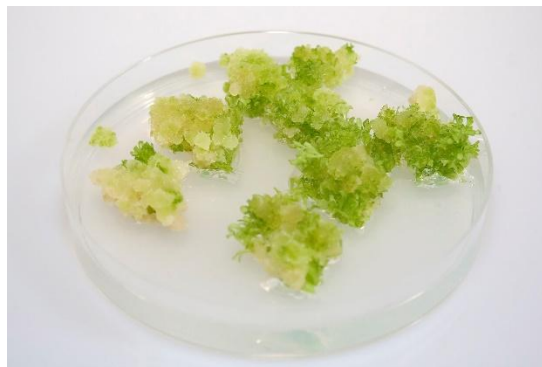


Figura 1. Cultivo de tejidos de planta de tabaco.

Tomado de:
[https://en.wikipedia.org/wiki/Callus_\(cell_biology\)#/media/File:Callus1.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Callus_(cell_biology)#/media/File:Callus1.jpg)



El nivel o concentración de reguladores de crecimiento de plantas (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, etc.) es el principal factor que controla la formación de callos en el medio de cultivo. Las concentraciones del regulador de crecimiento de plantas pueden variar para cada especie de planta e incluso pueden depender del origen del explante o genotipo de la planta individual, edad, estatus nutricional, etc. Las condiciones del cultivo (temperatura, medio sólido, luz, etc.) son también importantes en la formación y desarrollo de callos.

2.1.1. Iniciación de callos

Al examinar la literatura científica entre 2007 y 2011 se confirma que **no existe un método universal para obtener con éxito el cultivo de callos de todas las especies de plantas**. Hay miles de artículos que describen la investigación usando variedades de explantes, medios de cultivo, niveles y combinaciones de reguladores de crecimiento de plantas, tanto como otras adendas al medio de cultivo, y variedad de las condiciones de cultivo para inducir el callo y callo regenerable a partir de especies de plantas específicas.

La zanahoria (*Daucus carota*) fue uno de los principales modelos a ensayar históricamente en el cultivo de tejidos vegetales, por lo que no es de extrañar sea uno de los primeros protocolos aquí descritos. Por otra parte, y de aquí en adelante se presentan una serie de protocolos los cuales serán un punto de partida para proveer la experiencia en el desarrollo de técnicas variadas para el uso de diferentes explantes, especies y condiciones de cultivo para observar y estudiar la inducción de callos.



Iniciación de callos de zanahoria, limón y brócoli

Propósito. Ganar experiencia en técnicas asépticas e inducir callos a partir de varios explantes (plántulas, frutos, inflorescencia, raíces).

Preparación del medio. Un litro de medio equivalente para iniciación de callos.

1. En un matraz Erlenmeyer de 2000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 10 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 10 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 10 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 30 g de sacarosa
 - e) 1.0 ml del stock de cinetina (10 mg/100 ml)
 - f) 3.0 ml del stock de 2,4-D (10 mg/100 ml)
 - g) 10 ml del stock de vitaminas
3. Ajustar al volumen de 1000 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Adicionar 8 g/l de agar TC o agar Difco-Bacto, cubrir el matraz Erlenmeyer con papel de aluminio.
5. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.
6. Distribuir 25 ml por cada caja de Petri estéril (100x20 mm) dentro de una campana de transferencia.

Preparación del explante

Plántulas de zanahoria

1. Remueva las plántulas y colóquelas en una caja de Petri estéril.
2. Corte las plántulas y cultive el tejido de hoja, tallo y raíz. Las semillas que no produjeron plántulas, todavía se pueden utilizar si la radícula sobresale. Remueva la cubierta de la semilla (testa) y corte la semilla en varias partes.



Figura 2. Plántulas de zanahoria (*Daucus carota*)

Tomado de: <https://www.maxpixel.net/Carrots-In-The-Garden-Garden-Carrot-Plant-Nature-1595311>



Iniciación de callos de zanahoria, limón y brócoli

Limón

1. El fruto inmaduro verde producirá mejores resultados que en la fruta madura. Lave la fruta en agua tibia y jabonosa. Corte el tejido del tallo y cáliz que pueda estar unido a la fruta; remueva el tejido necrótico de la cáscara.
2. Corte el fruto en secciones de 0.5 pulgadas (1.25 cm).
3. Desinfecte en agente blanqueador (cloro) al 15 % (+ Tween 20) por 15 minutos. Enjuague tres veces con agua estéril. Las secciones centrales de la fruta pueden proveer mejores explantes. Cultive los agregados y vesículas de jugo individuales.



Figura 3. Frutos inmaduros de limón (*Citrus limon*).

Tomado de: <https://www.maxpixel.net/static/photo/1x/Green-Citrus-Fruit-Lemon-Immature-Lemon-Bud-Food-1674523.jpg>

Brócoli

1. Lavar los floretes con agua tibia y jabonosa.
2. Desinfecte en agente blanqueador (cloro) al 15 % (+ Tween 20) por 15 minutos. Enjuague tres veces con agua estéril. Corte el tejido quemado por el cloro. Cultive secciones del florete de la planta, flores individuales y tejidos del pedúnculo.



Figura 4. Florete de brócoli (*Brassica oleracea*)

Tomado de: <https://www.maxpixel.net/Food-Healthy-Broccoli-Ingredient-Vegetable-Broccoli-498600>



Iniciación de callos de zanahoria, limón y brócoli

Tejido de raíces de zanahoria

1. Use zanahorias frescas con ápices verdes aún unidos.
2. Friegue las raíces con un cepillo en agua tibia y jabonosa. Recorte los puntos malos de la raíz.
3. Corte la raíz en extremos de 0.5 pulgadas y esterilice en blanqueador al 15% durante 15 min. Enjuague tres veces con agua estéril. Elimine el tejido quemado por el cloro y cultive.



Figura 5. Zanahorias frescas con ápices verdes

Tomada de: <https://www.pexels.com/photo/bio-carrot-market-fresh-vegetables-soup-greens-434301/>

Cultivo

Coloque todos los cultivos en oscuridad (Un gabinete o armario funcionará) entre 27 y 30 °C; lleve un registro de la temperatura.

Observaciones

Son importantes las observaciones una vez a la semana durante un periodo de 6 semanas. Las observaciones deben incluir notas sobre las condiciones del cultivo, la formación del callo y posible contaminación. Es muy importante observar el cultivo bajo un microscopio de disección una vez a la semana y registrar las observaciones apoyándose en dibujos. El callo surgirá de diferentes regiones del explante, así como del tejido del cambium de la raíz de la zanahoria. Además, un gran número de embriones somáticos pueden formarse directamente a partir de las heridas de los explantes de semilla de zanahoria. Muchas de estas actividades no son visibles a simple vista, particularmente en las divisiones tempranas y en el alargamiento del explante. Al final de las seis semanas, es posible sacrificar parte de los cultivos para observar los tipos de células y callos, al hacer preparaciones montadas en portaobjetos bajo el microscopio de luz.



Iniciación de callos de zanahoria, limón y brócoli

Observaciones

Las observaciones que se deben indicar como parte de su formación, incluyen la formación del callo en respuesta al origen del explante, ¿Por qué se formó el callo, o por qué no lo hizo? Comparar respuestas en función a los diferentes orígenes de tejidos. No olvidar ilustrar las observaciones.

El cultivo de zanahoria puede ser usado para iniciar el cultivo en suspensión para embriogénesis somática, curvas de crecimiento y estudio de selección de sales. Además, el cultivo de callos puede ser usado para aislar líneas puras de diferentes líneas celulares pigmentadas.

2.1.2. Orientación del explante

Los niveles endógenos de reguladores de crecimiento de plantas y transporte hormonal polar dentro del explante pueden influir en la inducción del callo a partir del explante. Muchas veces cuando se intenta duplicar un trabajo publicado, los pequeños detalles, como la preparación del explante y su posición en el medio, queda fuera de la sección de materiales y métodos, dando lugar a diferentes respuestas del cultivo, lo anterior se ejemplifica en una sección de materiales y métodos donde puede indicar: "secciones de hipocotilo fue colocado en el cultivo". Para algunas plantas esto no es crítico; sin embargo, para otras plantas si lo es. Esta actividad en el laboratorio puede ilustrar la variación de respuesta del explante de hipocotilo y cotiledón dependiendo de la forma en que se seccionan y se colocan en el medio. Varianzas similares en la respuesta del explante pueden ser esperadas a partir de otros explantes.



Tiempo de respuesta en función a la orientación del explante

Propósito. Demostrar el efecto de la orientación del explante sobre la inducción de callos a partir de explantes de plántulas de algodón y girasol.

Preparación del medio. Un litro de medio equivalente, medio para explante de algodón.

1. En un matraz Erlenmeyer de 2000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 10 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 10 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 10 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 30 g de sacarosa
 - e) 1.0 ml del stock de ANA (10 mg/100 ml)
 - f) 10 ml del stock de 2iP (10 mg/100 ml)
3. Ajustar al volumen de 1000 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Adicionar 8 g/l de agar TC o agar Difco-Bacto, cubrir el matraz Erlenmeyer con papel de aluminio.
5. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.
6. Distribuir 25 ml por cada caja de Petri estéril (100x20 mm) dentro de una campana de transferencia.



Tiempo de respuesta en función a la orientación del explante

Explante

Cortar secciones de hipocotilo o cotiledón a partir de un germinado de semillas de algodón o girasol. El método para cortar secciones de hipocotilo se muestra en la Figura 1. Cultive los explantes sobre el medio previamente preparado.

La posición del explante sobre el medio y el origen del mismo, incide sobre el tiempo de inducción para la formación del callo, la cantidad y apariencia. En este punto, se espera que en su momento pueda realizar diferentes tipos de experimentos, en donde además de retomar la posición y el origen de explantes, implique otros parámetros, tales como luz u oscuridad, temperatura, empleo de la mitad de la concentración de los ingredientes del medio de cultivo, etc.

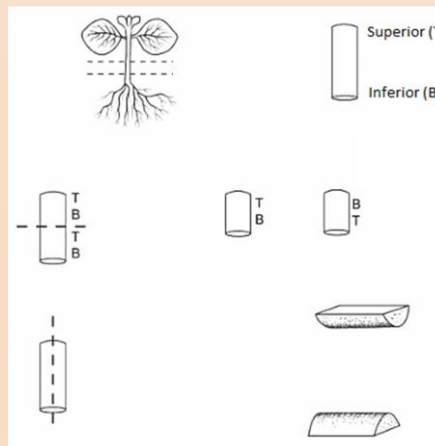


Figura 6. Para obtener secciones de hipocotilos, corte secciones de 1 cm (parte superior de la figura). Las secciones transversales son colocadas con la parte superior e inferior hacia abajo y con la parte inferior hacia arriba y de arriba hacia abajo, respectivamente (centro de la figura). Las secciones longitudinales son colocadas con la superficie cortada hacia arriba y con la superficie cortada hacia abajo (parte inferior de la figura)

Tomado de: Smith RH, 2013

Observaciones

Las observaciones (cada cuatro semanas) deben incluir ilustraciones de los explantes, indicando las áreas y cantidades relativas de la producción de callos. Observe los cultivos bajo una disección al microscopio. Un cultivo adecuado para aislar líneas celulares puras pigmentadas, requiere de 6 a 8 semanas.



2.1.3. Establecimiento de un cultivo

Históricamente, el establecimiento de cultivos de células competentes a partir de monocotiledóneas ha sido difícil. Al final de década de 1970 y en la década de 1980 muchos trabajos reportaron un gran efecto del genotipo sobre la habilidad de regenerar un cultivo. Algunos trabajos han establecido que la regeneración a partir de cultivos de maíz fue controlada genéticamente por genes nucleares (Hodges T.K. et al., 1986; Tomes D.T. y Smith O.S., 1985). Por otra parte, Peng J. y Hodges T.K. (1989) presentaron evidencias de que la regeneración de arroz estaba bajo el control de ambos genes: nucleares y citoplasmáticos. La capacidad para formar callos regenerables en sorgo varió entre genotipos, fue hereditario, y actuó como un rasgo dominante (Ma H. et al., 1987), lo que implicaba que ciertos cultivares carecían de los genes para la regeneración en el cultivo, sin embargo esta premisa ya se ha descartado (Bhaskaran S. y Smith, R.H. 1990).

Parece más razonable que los genes nucleares estén involucrados en el control del cultivar de interés al regulador de crecimiento de planta y la concentración en el medio de cultivo (Close K.R. y Gallagher-Ludeman L.A., 1989). Por ellos la diferencias entre cultivares, están probablemente relacionados a la variación en los niveles de hormona endógena, los cuales se establecen genéticamente. Los explantes (esto es, hojas, raíces, anteras, tallos, etc.) a partir de un solo cultivar, incluso una planta de plántula, no responde de manera idéntica en cultivo sobre el mismo medio. De nuevo, esto es muy probable debido a diferentes gradientes de hormonas endógenas (Wernicke W. y Brettell R. I. S., 1982), y tipos de células (meristemáticas contra altamente diferenciadas) dentro del explante.

Los cultivos de callos de cereales pueden ser iniciados a partir de explantes que contienen células meristemáticas. Estos explantes incluyen embriones inmaduros colectados a partir de plantas con flores y de semillas maduras o partes de plántulas, incluyendo secciones de brotes de meristemo y basal de hojas jóvenes. Un segundo factor importante es la selección visual inicial del tipo de callo compacto, nodulado de color blanco lechoso a amarillo (Bhaskaran S, y Smith R.H., 1988; Heyser J.W.y Nabors M.W., 1982). Los callos no embriónicos son generalmente friables (células fácilmente desprendibles del callo), cristalinos y de color amarillos a cafés (Abe T. y Futsuhara Y., 1985; Nabors M.W. et al. 1983), y de crecimiento rápido cubriendo el callo embriogénico



Establecimiento de cultivos celulares competentes de cereal

Propósito. Identificar visualmente y seleccionar el tipo de callo embriogénico a partir de arroz sobre medio de inducción de callo.

Preparación del medio: Un litro equivalente, de medio de inducción de callos.

1. En un matraz Erlenmeyer de 2000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 10 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 10 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 10 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 30 g de sacarosa
 - e) 10 ml del stock de vitaminas
 - f) 35 ml del stock de 2,4-D (10 mg/100 ml)
3. Ajustar al volumen de 1000 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Adicionar 4 g/l de agarosa tipo 1 de Sigma, cubrir el matraz Erlenmeyer con papel de aluminio.
5. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.
6. Distribuir 25 ml por cada caja de Petri estéril (100x20 mm) dentro de una campana de transferencia.

Explantes

Utilizar semillas maduras de *Oryza sativa* L. Texas cultivar "Lemont" (se puede emplear otros tipos de cultivares para comparar la respuesta). Descascarar las semillas y esterilizar la superficie en etanol al 70% durante 1 min seguido por inmersión en blanqueador a base cloro al 30% durante 30 min, enjuagar cinco veces con agua estéril. Plantar las semillas en el medio de inducción para callos. Cultivar en oscuridad entre 27 - 30 °C. A las 2-3 semanas separar el callo embriogénico, el cual es suave, blanco y nudoso, del callo no embriogénico amarillo trasluciente, de apariencia cristalina y húmeda, a través del uso de un microscopio de disección en campana de cultivo. Usar este material para la regeneración de

Observaciones

Es claro que al trabajar con diferentes cultivares la respuesta es diferente, sin embargo, es necesario describir dicha respuesta y tenerla presente. De forma similar identificar el porcentaje de germinación de las semillas empleadas como explantes, es importante el desarrollo de ilustraciones de las observaciones realizadas al microscopio. Identificar los puntos en donde la contaminación fue un problema y buscar alternativas para evitarlo.



2.2. Regeneración y morfogénesis

La morfogénesis o desarrollo morfológico, se define como la formación o la génesis de órganos y comprende el crecimiento y la diferenciación celular.

En células o tejidos cultivados *in vitro*, el proceso de morfogénesis puede inducirse, ya que las células vegetales son capaces de desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo. bajo determinados estímulos Esta plasticidad celular se conoce como *totipotencia celular*. La respuesta morfogénica puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: la organogénesis y la embriogénesis. En la organogénesis se produce la formación de tallos, raíces u otras estructuras y en la embriogénesis se forman embriones que al germinar dan lugar a una planta. En ambos casos, el proceso se genera a partir de células somáticas (Gisbert, 2014).

Por otra parte y como recordarás, si la respuesta primaria al estímulo morfogénico es la formación de callo antes de diferenciarse a meristemas o embriones, se habla de organogénesis o embriogénesis indirecta.

En algunas ocasiones se utiliza el término *regeneración adventicia* que hace referencia a la regeneración que se produce a partir de un lugar que no es el común en el desarrollo de una planta, por ejemplo la regeneración de una planta a partir de un segmento de hoja.

2.2.1. Morfogénesis controlada

La propagación de plantas de papa a través de cultivo de extremos meristemáticos es un procedimiento rutinario para recuperar plantas libres de virus y en la producción certificada de plantas. En cosechas propagadas vegetativamente, la infección de virus de plantas es un problema que puede reducir la producción a niveles no económicamente factibles. Los meristemas apicales de plantas infectadas están generalmente libres o tienen muy pocos niveles de virus. En papa, se escinden extremos meristemáticos midiendo 0.3 a 0.6 mm a partir de plantas desarrollándose en cámaras de crecimiento, colocándose en medios adecuados. Cuando los brotes enraícen en cerca de 3 cm o más, se transfieren a suelo y se mantienen en invernadero libre de insectos donde serán evaluados posteriormente para ausencia de virus. La multiplicación a gran escala de plantas y la producción de semillas tuberosas puede ser realizada en campos asilados donde la oportunidad de reinfección sea mínima. En muchas áreas del mundo, el efectivo control de insectos en tales localidades es casi imposible y las enfermedades sistémicas transmitidas por insectos son inevitables. Sin embargo, se han desarrollado estrategias alternativas para reducir el problema.



Una técnica que tiene relación con la re-infestación de plantas libres de virus es la producción *in vitro* de tubérculos, los cuales pueden ser distribuidos al productor con poca contaminación o sin ella. Esta técnica ha sido extensamente estudiada. Los resultados muestran la importancia de una citocinina en el medio y ciertos requerimientos medioambientales para la tuberización.

Frecuentemente en experimentos de cultivo de tejidos de plantas las principales preocupaciones son el medio de cultivo de células, las sales inorgánicas y las combinaciones y concentraciones del regulador de crecimiento. Los efectos de diferentes agentes gelificantes no son rutinariamente considerados. El agar es un polisacárido derivado de extractos de algas. El Gelrite es un agar sustituto también producido por fermentación microbiana. Este forma un gel muy claro.

El objetivo de esta sección, es el de comparar los efectos de dos diferentes agentes gelificantes sobre la formación del tubérculo en dos variedades de papa *Solanum tuberosum* L. variedades, "Russet Burbank" y "Superior". Ciertamente, la concentración de carbohidratos y cinetina tiene efectos significantes en la tuberización, y estos parámetros pueden ser también examinados.



Tuberización de papa

Propósito

Examinar los efectos de los agentes gelificantes sobre la tuberización de papa *in vitro*.

Preparación del medio

Un litro equivalente de medio para tuberización de papa.

1. En un matraz Erlenmeyer de 1000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 10 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 62.5 ml del stock de cinetina (40 mg/l)
 - c) 10 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 60 g de sacarosa
3. Ajustar al volumen de 1000 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Dividir el volumen en dos partes iguales, a cada 500 ml
 - a) Adicionar 1 g de Gelrite
 - b) Adicionar 4 g de agar Difco-Bacto
5. Fundir; distribuir 25 ml por cada tubo de cultivo (25 x 150 mm). Tapar usando un código de color para cada agente gelificante.
6. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.

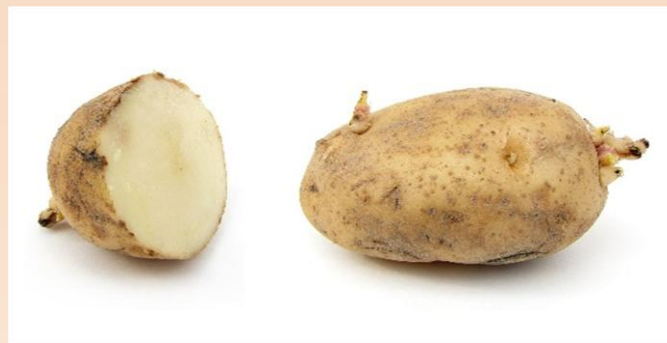


Figura 7. Papa con retoños

Tomado de:

https://en.wikipedia.org/wiki/Russet_Burbank#/media/File:Russet_potato_cultivar_with_sprouts.jpg



Tuberización de papa

Explante

Plantas de dos cultivares de papa “Russet Burbank” y “Superior” son crecidas bajo condiciones estériles en contenedores Magenta GA-7 (ver sección “Para saber más”). Estos son iniciados en el cultivo tomando retoños de brotes a partir de papas compradas en tiendas de la localidad. Los tubérculos se colocarán en una repisa cerca de una ventana con el fin de observar el desarrollo de retoños a simple vista. Retoños de $\frac{1}{2}$ pulgada de largo (1.27 cm) serán escindidos y esterilizados superficialmente a través de lavados con agua jabonosa, sumergiéndolos en alcohol al 95%, y finalmente en blanqueador por 15 min, enjuagar tres veces en agua destilada estéril. Remover el tejido quemado por el blanqueador, y cultivar el extremo de brote escindido. Los brotes son cultivados en medio MS, 100 mg/l de mioinositol, 20 g/l de sacarosa y 0.8 % de agar, colocados posteriormente en estantes de cultivo. Los retoños crecerán formando brotes en 6 semanas, y los brotes podrán ser empleados para el experimento o subcultivados en el mismo medio para mantener el cultivo de brotes.

Cultivar segmentos de brotes (dos nodos) en el medio: para el desarrollo de tubérculos, coloque los cultivos en oscuridad a 19 °C. El crecimiento es adecuado entre 22-23 °C, pero es mejor a los 19 °C.

Observaciones

Es conveniente decidir los parámetros a evaluar (peso, longitud, diámetro, etc.) sobre el explante inicial y qué mediciones se reunirán al final de las 4 a 6 semanas para determinar el efecto del agente gelificante y las condiciones de luz sobre la tuberización *in vitro*.

2.2.2 Embriogénesis somática

Como ya se estudió, la embriogénesis somática es un proceso por el cual las células somáticas experimentan diferenciación para formar una estructura bipolar que contiene ejes de raíz y brotes. Estos embriones somáticos son similares a los embriones cigóticos, que pueden madurar y germinar. El proceso se ilustra en la Figura 2.

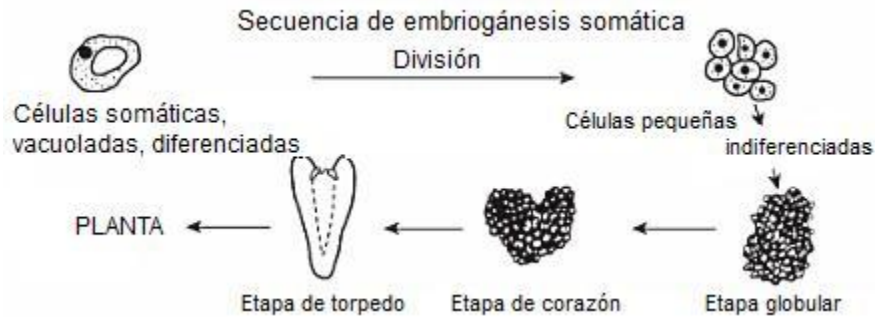


Figura 8. A través de la embriogénesis una célula somática (no gamética), se somete a la diferenciación para formar una estructura bipolar conteniendo ejes de raíz y brotes. Estos embriones somáticos pueden madurar y germinar.

Tomado de: Smith, R.H., 2013

Para inducir embriogénesis somática en zanahorias y en muchas otras especies, los callos pueden ser colocados en un medio conteniendo auxinas. Después de un pulso corto de “auxina”, las células son colocadas en un medio libre de hormonas para desarrollo de embriones. Los agregados de células de zanahorias 50-100 μm contienen 10-20 pequeñas células meristemáticas con un alto potencial para el desarrollo embrionario (Raghavan V., 1985; Sung Z.R. et al., 1984). El proceso también requiere una forma reducida de nitrógeno (glicina, glutamina, extracto de levadura o amonio). El nitrógeno solo en la forma de NO_3^- rara vez da lugar a embriones. La multiplicación de plantas a partir de cultivos celulares por embriogénesis somática tiene el potencial de altas tasas de producción de plantas. Miles de embriones somáticos pueden ser producidos de un solo frasco. Sin embargo, la maduración normal de todos estos embriones a plantas puede ser un problema. Las compañías de semillas han investigado este proceso para la producción de “semillas artificiales”.



Embriogénesis somática

Propósito

Inducir la embriogénesis somática en suspensión y cultivo de callos de zanahoria (*Daucus carota*) y observar el efecto de la densidad de inoculación y 2,4-D sobre la embriogénesis somática.

Preparación del medio

Un litro equivalente de medio, para embriogénesis somática de zanahoria.

1. En un matraz Erlenmeyer de 1000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 10 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 10 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 10 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 25 g de sacarosa
3. Ajustar al volumen de 800 ml.
4. Colocar 400 ml en un frasco de 1000 ml etiquetado como "A" y el restante 400 ml en un frasco de 1000 ml etiquetado como "B".
5. Adicionar 0.5 ml del stock de 2,4-D (10 mg/l) al frasco "A".
6. Diluir ambos frascos llevándolos a 500 ml. Ajustar el pH a 5.7
7. Tapar los frascos con papel aluminio y esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi. También esterilizar un matraz de 100 ml con cuatro capas de gasa cubriendo la parte superior, asegurándolas con varias bandas elásticas. Envolver el matraz en papel aluminio.
8. En campana de transferencia dispensar 20 ml en cajas de petri (100x 20 mm) etiquetadas (A y B) o 10 ml a cajas de Petri pequeñas (60x15 mm).

Preparación del explante

Cultivos en suspensión de zanahoria fueron crecidos en medio líquido MS, 30 g/l de sacarosa, 0.1 mg/l de tiamina, 0.5 mg/l de ácido nicotínico, 0.5 mg/l de piridoxina, 100 mg/l de mio-inositol y 0.3 mg/l de 2,4-D. Estos fueron incubados en una agitadora orbital (~90 rpm) a 27-30 °C, bajo 24h de luz, 240 fc (fotocandelas). Los cultivos originales fueron iniciados en "germinación aséptica de semillas" y en "iniciación de callos".

Permitir 2-3 meses para la inducción de callos y subcultivar para preparar este ejercicio.



Embriogénesis somática

Procedimiento

1. Colocar el cultivo de suspensión de zanahoria (~1 semana en subcultivo) en campana de transferencia y asperje en ella alcohol al 70%. Permitir que seque.
2. Verter asépticamente los contenidos de un cultivo en suspensión en el vaso de precipitados cubiertos con gasa. Esto depositará las células de zanahoria sobre la parte superior de la gasa. Ahora proceder a lavar las células con medio fresco sin 2,4-D para lavar el 2,4-D residual de las células.
3. Usar una cuchara dosificadora de acero inoxidable estéril para inocular las cajas de Petri (A y B) con dos o tres diferentes densidades celulares de inoculación. Generalmente una densidad de agrupamientos de 10^3 a 10^5 (50 – 100 μm de diámetro) por ml de medio es un inóculo favorable para una alta formación de embriones somáticos. Determinar un peso fresco promedio para sus densidades de inoculación para que se tenga una idea del peso fresco en miligramos. Altos rendimientos de embriones se han observado con 20-50 mg de peso fresco de callos por cada 20 ml de medio. Etiquetar las cajas de Petri y sellar con papel Parafilm®.
4. Mantener el cultivo en oscuridad a 27-30 °C en agitadora orbital.

Observaciones

Es evidente que existe un efecto de la densidad de inoculación sobre la incidencia de la formación de embriogénesis somática. Es imperativo que los cultivos sean examinados bajo el microscopio de manera semanal por 1-4 semanas.

A través de lo anterior, dibujar las etapas de la embriogénesis y observar cuando las diferentes etapas son primeramente visibles. Determinar si los embriones que se observan flotan libremente o se encuentran en agregados, así como determinar el efecto del 2,4-D empleado en el medio.



Caso de estudio

Descarga el **artículo 1**, titulado “**Influencia de la subdivisión del callo embriogénico en la formación de embriones somáticos de cocotero**” de Azpeitia Morales y colaboradores.

Lee y **responde** los siguientes cuestionamientos o indicaciones:

- a) Indica el objetivo de este trabajo.
- b) Elabora un diagrama en donde se establezca el proceso desarrollado (materiales y métodos), clasificándolo por etapas (micropropagación)
- c) ¿Cuáles son los insumos necesarios para llevar a cabo el proceso?
- d) ¿Cuáles son los principales resultados de este trabajo?



2.2.3. Regeneración de arroz

Regeneración de arroz

Propósito

Observar el potencial de regeneración de dos tipos de callos de arroz.

Preparación del medio

1 litro equivalente de medio para subcultivo de arroz. El medio es el mismo empleado en “Establecimiento de cultivos competentes de cereales” (sección 2.1.3), con excepción de la adición de 26 mg/l de ABA y de una reducción de 2,4-D a 2 mg/l. Las variaciones experimentales pueden incluir diferentes niveles de ensayo de ABA con o sin diferentes niveles de 2,4-D.

Procedimiento

Prepare explantes como en la sección de “Establecimiento de cultivos competentes de cereales” usando dos tipos de callos iniciados a partir de explantes. Cultivar ambos tipos de callos usando pequeñas piezas de 10 mg. Cultivar en oscuridad. Al final de las 3 semanas, los callos pueden ser subcultivados en el mismo medio o trasladados a un medio de regeneración de plantas.

Regeneración

Preparación del medio

1 litro equivalente de medio de regeneración de plantas de arroz. Este medio es el mismo que le procedimiento excepto eliminar ABA y 2,4-D. Adicionar 0.5 mg/l de BA y 0.5 mg/l de ANA.

Procedimiento

Colocar los cultivos en oscuridad por una semana, posteriormente transferir a los estantes de cultivo. En cuatro semanas las plantas podrán estar listas para ser transferidas al suelo.

Observaciones

Determinar cuál es la frecuencia de la formación de plantas y cuál es la función que el ABA desarrolla en la regeneración de plantas. Determinar igualmente si los callos obtenidos regeneran plantas.



2.2.4. Requerimientos de latencia de explantes

Requerimientos de latencia de explantes

Propósito

Observar los efectos de la refrigeración sobre el desarrollo de plantas a partir de bulbos de narcisos.

Preparación del medio

1. En un matraz Erlenmeyer de 2000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 10 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 10 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 10 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 30 g de sacarosa
 - e) 1.0 ml del stock de vitaminas
 - f) 100 ml del stock de BA (10 mg/100 ml)
 - g) 10 ml del stock de ANA (10 mg/100 ml)
 - h) 2 mg de glicina
 - i) 16 ml del stock de sulfato de adenina (1 g/100 ml)
3. Ajustar al volumen de 1000 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Adicionar 8 g/l de agar TC o agar Difco-Bacto, disolver.
5. Distribuir 25 ml por cada tubo de cultivo (25x100 mm) dentro de una campana de transferencia y tapar.
6. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.
7. Enfriar con inclinaciones.

Preparación del explante

Remover las escamas del bulbo de los narcisos que han terminado la floración. Comparar los explantes a partir de bulbos que han sido tratados durante 6 a 8 semanas a 11 °C con los no tratados. Lavar las escamas con agua jabonosa y enjuagar en agua de la llave. Esterilizar la superficie con etanol al 95% por 10 s. A continuación, con un agente blanqueador al 10% por 20 min. Enjuagar tres veces en agua estéril. Remover las regiones distales y proximales de las escamas del bulbo y cortar secciones de la base de la hoja inmadura de 2 mm de ancho y 10 mm de largo. Insertar el extremo basal en el agar (ver figura 3). Colocar en el estante de cultivo. Las variaciones del experimento pueden incluir probar los efectos del hidrolizado de caseína en el medio y/o variar las concentraciones de BA v ANA en el medio.



Requerimientos de latencia de explantes

Los brotes pueden ser transferidos al mismo medio como en lo anterior con 2 mg/l de BA y 2 mg/l de ANA para el desarrollo de brotes. Los brotes pueden tener sus raíces en un medio con la mitad de las sales MS y concentración de sacarosa, sin reguladores de crecimiento de plantas. Seabrook J.E.A. et al. (1976) reportó haber obtenido 2620 plantas a partir de dos explantes base de hoja; sin embargo, con métodos convencionales, un máximo de 50 bulbulletes en dos años han sido reportados.



Figura 9. Indicación del extremo basal a plantar de un bulbo escamoso.
Tomado de: Smith R.H., 2013.

Observaciones

Determinar cuántos brotes por explante se desarrollarán, observar de qué área del explante se desarrollan los brotes, determinar si existen diferencias en el número de brotes formados en los diferentes tratamientos con o sin frío. Si nuevamente la contaminación ha sido un problema, determinar las causas posibles de ello.



Caso de estudio



Descarga el **artículo 2**, titulado “**Evaluación y selección de un protocolo para la regeneración *in vitro* de la variedad de tomate Unapal-Arreboles**” de Ramírez H y colaboradores. Lee, elabora o responde los siguientes cuestionamientos o indicaciones:

- a) Indica el objetivo de este trabajo.
- b) Elabora un diagrama en donde establezca el proceso desarrollado (materiales y métodos), clasificándola por etapas (micropropagación)
- c) ¿Cuáles son los insumos necesarios para llevar a cabo el proceso?
- d) ¿Cuáles son los principales resultados de este trabajo?

2.3. Arbustos leñosos y árboles

El micro-cultivo se ha utilizado con cada vez más frecuencia en la manipulación de arbustos y árboles ornamentales; sin embargo, el uso de esta técnica ha registrado aplicaciones paralelas para cultivos herbáceos. La razón de esta diferencia es generalmente debido a la relativa dificultad de micro-cultivar plantas leñosas perennes en comparación con plantas herbáceas. Muchos de estos problemas pueden ser colocados bajo el término de “recalcitrancia” y se pueden remontar a una serie de factores, el principal de los cuales es el complejo ciclo de vida vegetativo y lento crecimiento de plantas leñosas. La capacidad de respuesta y la previsibilidad del micro-cultivo se complican debido al fuerte letargo de las yemas de temporada, a los periodos limitados y predeterminados de crecimiento de los brotes estacionales y al marcado cambio en las características de crecimiento cuando las plantas pasan de la fase juvenil a la fase adulta. Por ejemplo, árboles y arbustos pueden ser exitosamente micro-cultivados solo en la fase juvenil de su ciclo de vida; la misma planta en su fase adulta podrá ser difícil o quizás imposible de establecer en micro-cultivos. Por lo tanto, (ya sea que las fuentes de tejidos para el establecimiento del cultivo sean de plántulas o de un largo periodo de “rejuvenecimiento”) antes de que los micro-cultivos se establezcan, deben llevarse a cabo manipulaciones de las plantas madre o stock o mediante cuidadosos y secuenciales subcultivos *in vitro* de crecimiento de brotes.

Las tasas de crecimiento de brotes y otros tejidos tales como callos de plantas leñosas perennes en micro-cultivo suelen ser más lentos que los observados con plantas herbáceas. Este lento crecimiento complica todas las etapas del micro-cultivo. La



contaminación de los tejidos aislados es más difícil de superar, ya que el organismo contaminante puede superar y abrumar fácilmente los tejidos de la planta que responden lentamente. La producción de micro-brotes puede requerir meses de crecimiento en lugar de semanas, haciendo la economía de la clonación *in vitro* menos sostenible.

La mayoría de los cultivos leñosos se establecen por primera vez en micro-cultivos usando el enfoque de cultivo de brotes, donde la estimulación de brotes axilares es el primer objetivo. Una vez que se logra un cultivo de brotes vigoroso, el cultivo de brotes mismos se convierte en una fuente conveniente que proporcione tejidos para manipulaciones biotecnológicas o micro-brotes para clonación. Esta dependencia de los cultivos de brotes como fuente general de tejidos, tiene la ventaja de eliminar los problemas asociados con el crecimiento estacional, de latencia y de largos tiempos para el establecimiento *in vitro*, que tienen que enfrentar cada uno de los nuevos explantes re-aislados de especies leñosas para cualquier aplicación.

Un aspecto prominente del establecimiento de cultivo de brotes de plantas perennes leñosas en “micro-cultivos” es la “estabilización”. La estabilización se refiere al periodo donde los brotes se mantienen activamente en micro-cultivo y durante el cual las características de crecimiento de los brotes cambian a un tipo de crecimiento más aclimatado al ambiente de cultivo. Al inicio de la estabilización (después del éxito en el aislamiento inicial de yemas o brotes), el crecimiento temprano de brotes caracterizado por oleadas de crecimiento irregular, a menudo producen brotes que aparecen de forma anormal con hojas grandes distorsionadas. La producción de abundantes callos es también frecuentemente observada en la etapa temprana de estabilización. Como nuevos brotes se subcultivan sobre una base regular, la apariencia del crecimiento de brotes cambia progresivamente a uno caracterizado por un crecimiento reproducible y continuo de brotes uniformes con hojas pequeñas, idealmente la formación de callo es evidente. La indicación más obvia que la fase de estabilización se ha completado, es que cada subcultivo produce el mismo tipo de brotes con tasas de crecimiento semejante y continuo con apariencia uniforme. Los micro-brotes cosechados de estos cultivos de brotes estabilizados responden de manera más uniforme y con éxito al enraizamiento y aclimatación para cosechar micro-brotes de cultivos madre de brotes no estabilizados. Del mismo modo, tejidos, células y protoplastos aislados a partir de cultivo de brotes estabilizados son más sensibles. El periodo requerido para completar la estabilización puede variar ampliamente dependiendo de la planta, su historia y otros factores. Algunos cultivos pueden ser estabilizados después de dos a cinco sub-cultivos. Otros cultivos han requerido de más de 20 sub-cultivos (más de dos años); algunas plantas (tales como muchas especies de *Quercus*) nunca han sido estabilizadas con éxito como cultivos de brotes. Por lo que ha sido limitada la aplicación de la biotecnología y de la micro-propagación a estos cultivos. Incluso con estas desventajas obvias, el micro-cultivo ha sido aplicado con éxito a una amplia gama de árboles y arbustos.



Las sales minerales del medio de cultivo más ampliamente usado para el micro-cultivo de cultivos leñosos es el Medio para Plantas Leñosas (MPL) (Lloyd G.B. y McCown B.H., 1980), mostrado en la Tabla 1. La formulación fue desarrollada después de descubrir que muchas plantas leñosas no pueden tolerar cantidades relativamente altas de sales, altos niveles de cloro relacionados en las formulaciones de medios, tales como el MS.

El siguiente ejercicio está basado en protocolos de micro-propagación exitosos empleados en aplicaciones comerciales. Los dos principales problemas que pueden complicar el uso de perennes leñosos en entrenamientos de tipo académico son los siguientes:

- La dificultad de obtención de materiales vegetales adecuados para la aislación. De manera óptima, el material debe estar en crecimiento activo y obtenerlos a partir de semillas, plántulas o de nuevos propagados de plantas. Los ejemplos posteriores fueron escogidos ya que los materiales pueden ser disponibles todo el año en distintas localidades.
- Los tejidos pueden responder lentamente al cultivo. Por ello y con la finalidad de comprender todas las etapas del proceso de micro-propagación, es adecuado iniciar con cada una de estas etapas del proceso de micro-propagación al mismo tiempo. Por ejemplo, la aislación, el subcultivo, la optimización usando ya sea cultivo de brotes establecidos y el enraizado y aclimatación de brotes.



Tabla 1. Medio para plantas leñosas (Lloyd, G.B. y McCown, B.H., 1980).

Stock	Constituyentes	g/L ^a	ml/L ^b	mg/L ^c
A	NH ₄ NO ₃	20.0	20	400
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	27.8		556
B	K ₂ SO ₄	49.5	20	990
C	CaCl ₂ ·2H ₂ O	19.2	5	96
D	KH ₂ PO ₄	34.0	5	170
	H ₃ BO ₃	1.24		6.2
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05		0.25
E	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74.0	5	370
	MnSO ₄ ·H ₂ O	3.38		16.9
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.72		8.6
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005		0.025
F ^d	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.57	5	27.8
	Na ₂ EDTA	7.45		37.3
G ^e	Tiamina·HCl	0.2	5	1.0
	Ácido nicotínico	0.1		0.5
	Piridoxina·HCl	0.1		0.5
	Glicina	0.4		2.0
H	Mio-inositol	20.0	5	100
Otros constituyentes			g/L	
	Sacarosa		20	
	Gluconato de calcio		1.3	
	Agar		3.0	
	Geltite		1.1	

Nota: Todos los stocks (excepto el G) son autoclaveados una vez elaborados para asegurar la esterilidad. El pH del medio es generalmente ajustado al nivel deseado (comúnmente 5.6) empleando KOH después de la adición de agentes gelificantes.

^a Concentración de la solución stock.

^b Volumen de la solución stock adicionada al medio.

^c Concentración final del medio.

^d Este stock es preparado disolviendo cada componente de manera separada en la mitad del volumen final de agua destilada (se requiere calentarlo) y posteriormente combinar las dos soluciones para obtener un stock amarillo.

^e Esta solución stock es esterilizada por filtración y mantenerlo en refrigeración en alícuotas de 10 a 20 ml.



2.3.1. Azaleas

Los miembros de Ericaceae fueron algunos de los primeros arbustos leñosos a ser exitosamente propagados a escala comercial. *Kalmia*, *Rhododendron* y *Vaccinium* son en la actualidad ampliamente micro-propagados; algunas de estos cultivos pueden ser solamente clonados por medio de la micro-propagación. Una razón para este éxito relativo con micro-propagación es la facilidad con la cual estas plantas pueden ser estabilizadas en el cultivo. El grupo Ericaceae es intolerante a BA y la medio MS, ambos producen crecimiento de brotes atrofiados. Por esta razón, 2Pi en MPL es comúnmente empleado (imagen de *Rhododendron* obtenida de PhotoSci, 2014).





Azaleas

Propósito

Propagación de *Rhododendron* sp. a través de la proliferación de yemas axilares.

Preparación del medio

MPL con 1 μ M 2Pi (Tabla 1).

Preparación del explante

1. Obtener una planta con crecimiento activo o brotes de una azalea u hoja ancha de *Rhododendron*. Estos pueden ser obtenidos de un jardín o de una planta en maceta (invernadero). Idealmente, deberán seleccionarse brotes juveniles originados a partir de regiones de interfaz raíz/brote. Aislar el extremo del brote (1 pulgada) y varias secciones de 1 a 2 pulgadas por debajo de este extremo (imagen muestra brotes de flor de cardenal, *Lobelia cardinalis* [PhotoSci, 2014]).
2. Remover todas las hojas que puedan ser fácilmente cortadas del tallo.
3. Esterilizar superficialmente (con agitado vigoroso) por 10 a 15 minutos en blanqueador a base cloro 10% (v/v) con dos gotas por cada 100 ml de Tween-20 y enjuagar tres veces en agua estéril.
4. Cortar el tallo en piezas individuales conteniendo cada una, un brote o uno o tres nodos.
5. Colocar cada explante con el extremo basal hacia abajo sobre el medio de cultivo a una profundidad de al menos $\frac{1}{4}$ de su longitud.
6. Colocarlos con intervalos de luz entre 16 a 24 h.
7. Una vez los brotes emerjan de las yemas desarrolladas sobre los explantes, removerlas tan pronto alcancen cerca de 1 cm de longitud y colocarlas en medio fresco. La remoción de estos extremos de brotes incrementará la ramificación. Repita este procedimiento tan rápido como sea posible y observe el cambio en la calidad de brotes y receptividad (estabilización) cuando incremente el número de subcultivos.

Una vez que el crecimiento de cultivo de brotes haya sido generado, experimentos empleando la curva dosis-respuesta de 2Pi (0, 0.1, 1, 10 y 40 μ M) puede ser conducido subcultivando brotes en cada uno de estos medios.

Micro-brotes no menores a 2 cm de longitud pueden ser cosechados, puestos en agua, y colocados en un medio para enraizado (ejemplo, 1:1 turba/vermiculita o turba/arena) en cajas de plástico claro cerradas para mantener humedad. Colocar bajo luz indirecta a temperatura ambiente y asperjar (neblina) agua sobre los esquejes tanto como sea necesario (NO sature el medio). El enraizado debe ser observado dentro de un mes.



2.3.2. Rosas

En general la micro-propagación no es usada extensamente para rosas, ya que pueden ser rápidamente clonadas por esquejes convencionales o por injertos. Sin embargo, la micro-propagación es usada para incrementar rápidamente el stock de nuevas selecciones. Estos stocks de plantas micro-propagadas pueden ser usados en propagaciones convencionales.

Rosas

Propósito

Propagar *Rosa* sp por medio de la proliferación de yemas axilares (cultivo de brotes).

Preparación del medio

Sales inorgánicas del medio MS, 30 g/l de sacarosa, 100 mg/l de mio-inositol, vitaminas MS, 8 g/l de agar TC con 1 μ M de BA.

Explante

1. Obtener brotes con crecimiento activo. Estos pueden ser obtenidos a partir de un jardín, invernadero o plantas en macetas (imagen obtenida de PhotoSci, 2014).
2. Proceder con estos brotes como se describieron para *Rhododendron*.

Una vez obtenido el cultivo de brotes con crecimiento activo, los experimentos demostrando el efecto de la curva dosis-respuesta de BA (0, 1, 4 y 10 μ M) pueden ser llevados a cabo subcultivando brotes en cada uno de estos medios.

Cosechar micro-brotes no menores a 2 cm de longitud, y ponerlos en agua, posteriormente colocarlos en un medio de enraizamiento limpio (ejemplo, 1:1 turba/vermiculita o turba/arena) en cajas cerradas para contener la humedad de plástico claro. Colocarlas bajo luz indirecta a temperatura ambiente y asperjar los explantes tanto como sea conveniente (NO saturar el medio). El enraizado debe ser observado en un mes.



Caso de estudio

Descarga el **artículo 3**, titulado “**Micropropagación clonal de tres genotipos *mortiño*, *Vaccinium meridionales sw.*, por proliferación de yemas axilares**” de Castro-Restrepo y Álvarez-Guzmán. Lee, elabora o responde los siguientes cuestionamientos o indicaciones:

- a) Indica el objetivo de este trabajo.
- b) Elabora un diagrama en donde establezca el proceso desarrollado (materiales y métodos), clasificándola por etapas (micropropagación)
- c) ¿Cuáles son los insumos necesarios para llevar a cabo el proceso?
- d) ¿Cuáles son los principales resultados de este trabajo?

2.3.3. Árboles de Birch (Abedul)

Los abedules de corteza blanca fueron unos de los primeros árboles a ser propagados comercialmente. Sin embargo los árboles frecuentemente requieren largos tiempos de estabilización, una vez que esto ha sido alcanzado, el subcultivo fiel de brotes puede mantenerse productivo indefinidamente. Un cultivar de abedul se ha mantenido en producción comercial como cultivo de brotes por más de una década.



Árboles de Birch (Abedul)

Propósito

Propagar *Betula* sp. A través de la proliferación de brotes axilares (cultivo de brotes).

Preparación del medio

MPL con 4 μ M de BA

Explante

Pueden ser tomados dos procesos para establecer el abedul en micro-cultivo:

1. Brotes a partir de plantas establecidas: plántulas de plantas jóvenes pueden responder más rápidamente. Idealmente, brotes selectos originados a partir de regiones de interfaz raíz/brote. Obtener brotes de crecimiento activo a partir de árboles de abedul joven. Si esto no es posible, obtener ramas sin crecimiento (pero no en estado de letargo) de 30 a 60 cm de árboles de abedul joven. Colocarlos a una profundidad de 10 a 15 cm en agua limpia y constantemente aireada; emplear un área con 18-24 h de luz y a temperatura ambiente. En varias semanas, los brotes serán forzados a un nuevo crecimiento y formarán pequeños brotes.
2. Germinación *in vitro* de semillas de abedul. Desafortunadamente, las semillas de abedul no se preservan por mucho tiempo y por lo que no es posible obtener semillas viables de alrededor de un año. Un método general es el siguiente:
 - a) Colocar 150 mg de semillas en una bolsa de red construida con mallas o pantimedias. Sellar el extremo abierto con un clip.
 - b) Tratar por 30 s en etanol al 70%
 - c) Tratar por 30 min en blanqueador al 10%
 - d) Enjuagar con agua estéril
 - e) Remover las semillas de la bolsa y colocarlas en la superficie del medio (sales inorgánicas MS sin RCP). La germinación generalmente ocurre en 4 a 7 días y los brotes útiles pueden ser obtenidos en varias semanas.
3. Proceder con los brotes aislados de acuerdo con alguno de los procedimientos antes expuestos y seguir el procedimiento para *Rhododendron*. Obviamente, los brotes obtenidos de la germinación *in vitro* no requieren ser esterilizados.
4. Una vez obtenido el cultivo de brotes con crecimiento activo, los experimentos demostrando el efecto de la curva dosis-respuesta de BA (0, 1, 4 y 10 μ M) pueden ser llevados a cabo subcultivando brotes en cada uno de estos medios.
5. Cosechar micro-brotes no menores a 2 cm de longitud, y ponerlos en agua, posteriormente colocarlos en un medio de enraizamiento limpio (ejemplo, 1:1 turba/ vermiculita o turba/arena) en cajas cerradas para contener la humedad de plástico claro. Colocarlas bajo luz indirecta a temperatura ambiente y asperjar los explantes tanto como sea conveniente (NO saturar el medio). El enraizado debe ser observado en un mes.



2.3.4. Cedro blanco

Las gimnospermas son raramente aisladas de manera fácil y crecer de manera exitosa en micro-cultivos. *Thuja* es una excepción, sin embargo, los aislados pueden tomar algún tiempo antes de observar el crecimiento activo de brotes.

Cedro blanco

Propósito

Propagar una angiosperma por estimulación de yemas axilares (cultivo de brotes).

Preparación del medio

MPL con 1 μ M de BA

Explante

1. Obtener de secciones longitudinales (5 a 8 cm) de nuevos crecimientos estacionales. Los stocks de plantas más jóvenes, tienen más probabilidad de éxito.
2. Cortar los extremos de los nuevos crecimientos en secciones de 1.2 a 2.54 cm.
3. Esterilizar superficialmente (con agitación vigoroso) por 10 a 15 minutos en blanqueador a base cloro 10% (v/v) con dos gotas por cada 100 ml de Tween-20 y enjuagar tres veces en agua estéril.
4. Colocar cada explante con el extremo basal hacia abajo sobre el medio de cultivo a una profundidad de al menos $\frac{1}{4}$ de su longitud.
5. Colocarlos con intervalos de luz entre 16 a 24 h.
6. Una vez los brotes emerjan de las yemas desarrolladas sobre los explantes, removerlas tan pronto alcancen cerca de 0.5 cm de longitud o más y colocarlas en medio fresco. Repita este procedimiento tan rápido como sea posible y observe el cambio en la calidad de brotes y receptividad (estabilización) cuando incremente el número de subcultivos.



Caso de estudio

De la lectura del **artículo 4**, titulado “**Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC)**”, de Suarez E.I., y colaboradores. Lee, elabora o responde los siguientes cuestionamientos o indicaciones:

- a) Indica el objetivo de este trabajo.
- b) Elabora un diagrama en donde establezca el proceso desarrollado (materiales y métodos), clasificándola por etapas (micropropagación)
- c) ¿Cuáles son los insumos necesarios para llevar a cabo el proceso?
- d) ¿Cuáles son los principales resultados de este trabajo?

2.4. Propagación comercial in vitro de ornamentales

Las flores son usadas en todo tipo de ocasión. La industria de la floricultura está valuada en más de 50 billones de Euros (información del 2005) e incrementa anualmente entre un 8-10%, especialmente en los países en vías de desarrollo tales como India, Kenia, Colombia, Ecuador y Tailandia. Aunque existen otros países que buscan entrar a este lucrativo mercado (Vietnam, Malasia y Filipinas). Concomitantemente, se ha notado un descenso a nivel mundial de la producción de la floricultura, debido principalmente a los altos costos de producción y a la mano de obra; como resultado, más inversiones han fluido para estimular la industria de la floricultura. Los principales cultivos de flores tales como rosas, tulipanes, clavel y crisantemo son producidos en los países ya mencionados. El mercado de corte de flores está valuado en 20 billones de Euros; la mitad de este mercado es producido en los Países Bajos, los Estados Unidos de América y Japón, en ellos las flores más redituables son las rosas, tulipanes, crisantemos, gerbera y clavel. En la floricultura, la introducción de nuevos cultivares en el mercado es esencial (por ejemplo, en la industria de la moda, nuevas o inusuales características incrementan la demanda). Además, la producción de nuevos cultivares es requerido para satisfacer las demandas medioambientales, en particular en la reducción de químicos usados para el control de enfermedades y plagas (Rout G.R. y Jain S.M., 2005).

En la actualidad, los principales productores de flores son unos pocos países en vías de desarrollo, los Países Bajos y Japón. La distribución de los principales productores son Los Países Bajos (33%), Japón (24%), Italia (11%), USA (12%), Tailandia (10%) y otros



(14%). El principal país exportador son los Países Bajos (59%), Colombia (10%), Italia (6%), Israel (4%), España (2%), Kenia (1%) y otros (18%). Los cuatro líderes exportadores (Holanda, Colombia, Italia e Israel) constituyen el 80% del mercado mundial, mientras que en los países en vías de desarrollo de África, Asia y Latino América tal que Tailandia, Ecuador e India corresponden a menos del 20%. Los principales países importadores de flores son Alemania, USA, Francia, Reino Unido, Los Países Bajos, Japón y Suiza. El mercado mundial de productos elaborados con flores es de cerca de 8 billones de dólares. Sin embargo el mercado es más concentrado en Europa occidental (Rout G.R. y Jain S.M., 2005).

La propagación *in vitro*, o micro-propagación, tiene ventajas sobre la propagación convencional para muchas, aunque no todas las plantas. El principal beneficio de la propagación clonal o reproducción asexual, es el de obtener **copias idénticas** genéticamente del cultivar. Por ello se deben escoger stock de plantas deseables para que cientos de clones sean producidos. Esto es particularmente importante donde un **color específico de flor es deseado** ya que la propagación por semillas puede resultar en una variación del color.

Otros beneficios de la propagación *in vitro* incluye una más **rápida propagación**, el mantener un stock de plantas libres de patógenos, mejorar la producción de ramificaciones axilares de plantas derivadas *in vitro* (resultando en mejor follaje), **floración temprana, producción uniforme de cosechas, producción en todo el año y clonación de solo las plantas femeninas deseables** (palma de dáttil) **o plantas masculinas** (espárragos) (Smith R.H., 2013).

Los párrafos anteriores proveen las bases de los casos de éxito comercial del Cultivo de Tejidos Vegetales, relacionados directamente con ornamentales o plantas de interés económico como papa o caña de azúcar.

Los ejercicios que siguen permitirán demostrar algunas de la diferentes técnicas de la propagación *in vitro*.



2.4.1. Helechos

Muchas especies de helechos son comercialmente importantes para su uso en paisajismo, como plantas de interior y en arreglos florales. De manera clásica, los helechos han sido propagados a partir de esporas o por división. Aunque la propagación de esporas puede resultar en la formación de muchas plantas, es un proceso muy lento. Los helechos tienen dos fases, conocidos como alteración de generaciones, en su ciclo de crecimiento vegetativo y reproductivo. La germinación de esporas resulta en una capa de pequeños montones parecidos a musgo, que contienen órganos masculinos y femeninos. La fertilización de estos gametofitos resulta en la formación de esporofitos o plantas productoras de esporas. En general toman 2-4 meses a partir de la germinación de esporas al desarrollo de plantas esporofíticas.

La división puede ser usada para propagar especies que desarrollan rizomas y formar acodos. Este es un procedimiento fácil; sin embargo, el número de propágulos es limitado, y muchas especies no tienen este tipo de crecimiento.

El helecho de Boston (*Nephrolepis exaltata* Schott cv. *Bostoniensis*) pertenece a la familia de las Polypodiaceae, un género que incluye aproximadamente 30 especies de áreas tropicales del Nuevo y Viejo Mundo. El helecho de Boston es originario de un helecho silvestre en forma de espada de Florida. Es cultivado ampliamente y es una planta popular de interiores. Generalmente, los helechos son propagados en largas camas de cultivo. Los brotes delgados y rastreros (runners), forman numerosas plantas sobre la superficie de la cama. Desafortunadamente, las plantas propagadas de esta forma muestran una falta de uniformidad y frecuentemente son presa de parásitos.

La propagación del helecho de Boston por técnicas *in vitro* tiene varias ventajas. Las plantas resultantes son idénticas a la planta madre y por lo tanto son uniformes en tamaño y apariencia. Los helechos cultivados *in vitro* tienden a formar matas y ser más atractivos que los propagados en camas de cultivo.



Etapa 1

Propósito

Iniciar un cultivo aséptico de extremos de brotes (*runners*) de helechos de Boston y observar principios de una propagación clonal rápida.

Medio de cultivo

150 ml equivalentes del Medio para Helecho de Boston Etapa 1.

1. En un matraz Erlenmeyer de 250 ml colocar 60 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 1.5 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 1.5 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 1.5 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 4.5 g de sacarosa
3. Ajustar al volumen de 150 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Distribuir alícuotas de 5 ml a 30 tubos de cultivo (25x150 mm)
5. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.

Preparación del explante

Los cultivos de extremos de brotes de helechos de Boston son menos propensos a ser contaminados que los cultivos de otros explantes. Esta diferencia es principalmente debida a que los extremos de brotes (*runners*) no están en contacto con el suelo, y por lo tanto, están relativamente no contaminados antes del cultivo de iniciación. Para minimizar la posibilidad de la contaminación del cultivo, colocar la planta stock en un medio ambiente fresco y seco por varias semanas antes de remover el explante. Los cuartos con aire acondicionado, son perfectos para este propósito.

Siempre manipular los extremos de brotes con cuidado, ya que el material dañado no crecerá en el medio de cultivo.

Escoger una planta saludable que contenga numerosos brotes (*runners*) a partir de la corona del helecho frondoso. Remover extremos de brotes (*runners*) de crecimiento activo cubiertos con pelos blanquecinos a una longitud de cerca de 3 cm de la planta. Lavar con agua tibia y jabonosa, enjuagar. En lotes de 12, envolver los extremos de brotes (*runners*) en gasa para que no floten fuera del contenedor durante la desinfección superficial y enjuagar. Esterilizar los extremos en agente blanqueador al 10% por 10 min y enjuagar tres veces con agua estéril. Con la ayuda de una pinza y bisturí, remover 1.5 cm de la porción terminal y plantarla, uno a tres brotes (*runners*) por tubo de ensayo (ver Figura 4).



Etapa 1

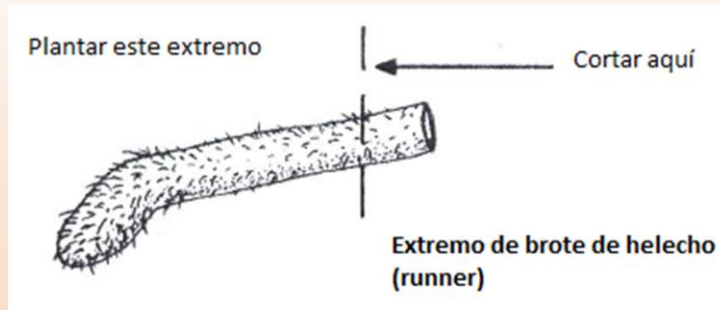


Figura 10. Extremo terminal de 1.5 cm, de un extremo de brote (*runner*) de helecho de Boston, tome cuidado de no pellizcar, magullar o aplastar con las pinzas.

Tomado de: Smith R.H, 2013.

Observaciones

- Después de una semana registrar y eliminar el número de cultivos contaminados.
- Después de 6-8 semanas registrar el número de plantas producidas por extremo de brote (*runner*). Cada una de estas plantas individuales se subcultivarán en la Etapa II para multiplicación y crecimiento posterior de raíz.
- Las hojas de helechos proliferan mejor en medio líquido Etapa I. Como una ventaja adicional, la omisión del agar reduce el costo de la preparación del medio y agiliza la limpieza del tubo.
- Después de 6-8 semanas estará listo para ir a la Etapa 2.



Etapa 2

El objetivo de la Etapa 2 es la proliferación de brotes. En esta etapa es importante seleccionar cultivos saludables de la Etapa 1 y subcultivar para una rápida multiplicación. Los brotes con lento crecimiento o débiles deben ser desechados ya que las plantas derivadas de ellos no son fuertes. Si el material obtenido de la Etapa 2 es subcultivado en el Medio de Etapa 2 para lograr un aumento en el número de plantas, esto no debe de hacerse por más de cuatro veces porque subcultivos repetidos pueden producir plantas anormales. El fosfato de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) es adicionado al Medio de la Etapa 2 para mejorar el desarrollo de brotes.

Propósito

Subcultivar extremos de brotes de helechos de la Etapa 1 a Medio de Etapa 2 y observar las tasas de multiplicación.

Preparación del medio

1 litro equivalente de Medio Etapa 2 para helechos de Boston.

1. En un matraz Erlenmeyer de 2000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 10 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 10 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 10 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 30 g de sacarosa
 - e) 1.0 ml del stock de ANA (10 mg/l)
 - f) 10 ml del stock de cinetina (10 mg/l)
 - g) 10 ml del stock de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (17g/l)
3. Ajustar al volumen de 1000 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Adicionar 8 g de agar TC. Derretir.
5. Distribuir alícuotas de 25 ml por tubo de cultivo (25x150 mm)
6. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.

Preparación del explante

Usar explantes de la Etapa 1. Transferirlos a cajas de Petri y dividirlos



Etapa 2

Observaciones

- En 3-5 semanas se debe observar el crecimiento de más brotes para cada subcultivo. En 4 a 6 semanas los brotes deben desarrollar rizomas (tallos subterráneos marrones). Durante estas semanas, los cultivos pueden sufrir proliferación de brotes y elongación de la fronda (hojas).
- Si se desean muchas plantas, la Etapa 2 puede repetirse tres o cuatro veces. Después de la semana 7 de crecimiento dividir cada grupo de rizomas en dos partes y recortar frondas en longitudes de 15-20 mm. Es muy importante dejar algún material sin dividir de cada grupo. Colocar cada grupo en un tubo conteniendo medio fresco de Etapa 2. Cada cultivo sucesivo producirá material vegetal adicional.



Etapa 3

El objetivo de la Etapa 3 es la preparación del material vegetal para trasplante a suelo. Cuando se trabaje con helecho de Boston es posible omitir esta etapa preparatoria y transferir los brotes directamente del Medio de Etapa 2 a una mezcla de tierra. Incluyendo este paso se asegura un fuerte desarrollo radicular.

Propósito

Cultivar en Etapa 3 el helecho de Boston.

Preparación del medio

Un litro equivalente de Medio Etapa 3 de helecho de Boston.

1. En un matraz Erlenmeyer de 2000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 10 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 10 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 10 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 30 g de sacarosa
3. Ajustar al volumen de 1000 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Adicionar 6 g de agar TC. Derretir.
5. Distribuir alícuotas de 25 ml por tubo de cultivo (25x150 mm)
6. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.

Preparación del explante

Remover grupos de rizomas del Medio Etapa 2 y cortarlas en cubos de 1 cm de ancho. Podar las frondas a una longitud de 15-20 mm. Colocar el material vegetal en tubos de cultivo o jarras conteniendo Medio Etapa 3. El número de plantas colocadas en cada contenedor es determinado por el tamaño del contenedor mismo. Un frasco tipo Mason apoyado sobre su base, puede contener 50 plantas, mientras que un tubo de ensayo solo puede contener 1 o dos plantas. Empuje el extremo del rizoma por debajo de la superficie del medio, dejando la fronda por encima de la superficie. Los requerimientos de temperatura y luz, son los mismos que para las Etapas 1 y 2.

Después de que el material vegetal ha sido recultivado en el Medio Etapa 3, el enraizado y desarrollo de la planta se completa generalmente en 2-3 semanas, en ese momento las plantas pueden ser transferidas a una mezcla de tierra. Las plantas estarán listas para el trasplante, cuando las raíces sean claramente visibles en el agar.



Etapa 3

Trasplante

Ya sea que el trasplante de brotes sea a una mezcla de tierra de la Etapa 2 o del Medio Etapa 3, el procedimiento es el mismo. Cuidadosamente elimine el agar de las plantas con agua de la llave. Si algo del agar se aferra a los helechos, promoverá el crecimiento de hongos, matando posiblemente a las plantas.

Existe muy poca información disponible sobre el establecimiento de plántulas cultivadas en un medio no estéril para el endurecimiento y acabado. Se prefiere un medio orgánico, tal como la turba de Sphagnum (musgo). Puede ser empleada una relación 1.1 de turba de Spahgnum y fibra de helechos. La turba sola puede ser empleada. Las plántulas pueden inicialmente permanecer húmedas para evitar la desecación. La frecuencia de la nebulización puede ser manipulada para que las plántulas soporten las condiciones más secas (endurecimiento) al final del ciclo de producción.

Por lo tanto, cuando los brotes estén libres de agar, podrán ser trasplantados en una mezcla de tierra (una planta por maceta), haciendo un hoyo en la mezcla con un objeto, tal como una pluma, y coloque la plántula firmemente en la mezcla de tierra, presione la tierra alrededor del tallo. Después del trasplante, riegue las plantas.

Las plantas en macetas deberán ser protegidas por cerca de 2 semanas hasta que las raíces estén visibles en los hoyos del fondo de la maceta. Durante este tiempo las macetas deberán estar cubiertas con paño de cortina o gasa y colocarla cerca de la ventana o bajo luz artificial con intensidades de 500 a 1000 fc. La humedad deberá mantenerse durante este periodo, colocando las macetas sobre una cama de grava húmeda o simplemente cubriendo la maceta con una bolsa plástica asegurando la bolsa con una banda elástica.

Después de 2 semanas iniciar la aclimatación de plantas disminuyendo la humedad, aflojando la banda elástica permitiendo una mayor circulación de aire. Después de 8 semanas una gran cantidad de raíces serán visibles por toda la maceta. Ahora cada helecho puede ser trasferido a una maceta más grande. A partir de las 3 semanas, después de que los helechos se han sometido a un trasplante final, las plantas deben ser nutridas semanalmente con un fertilizante equilibrado.



2.4.2. Ficus

El árbol de *ficus elástica*, también es conocido como ficus de hoja grande, árbol de goma o árbol de caucho (Herb, 2014). Aunque no es común observarlo en las calles debido a su tendencia a romperse por los fuertes vientos, los paisajistas emplean este árbol por su fácil manipulación, reduciendo su talla de tal manera que pueda emplearse como una planta de interior (Forest, 2014).

Propósito

Desarrollar el cultivo de extremos de brotes para la multiplicación de yemas axilares de *Ficus elástica* "Decora" (imagen obtenida de PhotoSci, 2014).

Etapa 1

Preparación del medio

1 litro equivalente de Medio Etapa 1 para Ficus

1. En un matraz Erlenmeyer de 2000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 7.5 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 10 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 10 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 30 g de sacarosa
 - e) 10 ml del stock de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (17g/l)
 - f) 8 ml del stock de sulfato de adenina (1 g/100 ml)
 - g) 3 ml del stock de AIA (50 mg/500 ml)
 - h) 3 ml del stock de 2Pi (50 mg/500 ml)
3. Ajustar al volumen de 1000 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Adicionar 8 g de agar TC. Derretir.
5. Distribuir alícuotas de 25 ml por tubo de cultivo (25x150 mm)
6. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.

Preparación del explante

Remover brotes de 5 a 8 cm de longitud de un stock de plantas. Lavar los extremos en agua tibia y jabonosa, desinfectar con blanqueador a base cloro al 10% durante 10 min, enjuagar tres veces. Remover asépticamente las hojas exteriores y cortar el tejido de tallo estéril. Cultivar los extremos sobre un anaquel de cultivo. Después de 4-6 semanas los cultivos limpios pueden ser movidos al Medio Etapa 2.



Etapa 2

Preparación del medio

1 litro equivalente de Medio Etapa 2 para Ficus.

Este medio es el mismo que la Etapa 1 para Ficus excepto que el AIA es omitido.

Etapa 3

Preparación del medio

200 ml equivalente de Medio Etapa 3 para Ficus

1. En un matraz Erlenmeyer de 1000 ml colocar 300 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 5 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 5 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 5 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 15 g de sacarosa
 - e) 4 ml del stock de sulfato de adenina (1 g/100 ml)
 - f) 2 ml del stock de AIA (10 mg/100 ml)
3. Ajustar al volumen de 500 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Adicionar 4 g de agar TC. Derretir.
5. Distribuir alícuotas de 25 ml por tubo de cultivo (25x150 mm)
6. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.

Preparación del explante

Separar individualmente brotes de los cultivos de la Etapa 2 y cultivar en Medio Etapa 3 para enraizamiento. Cuando las raíces se desarrollen, el brote enraizado se puede quitar del cultivo, lavando el agar y transferir a una mezcla de tierra. Cubrir la planta para mantener la humedad por aproximadamente 2 semanas para endurecerlas.

Observaciones

- Determinar cuál es la diferencia entre la Etapa 1 y Etapa 2, tomando en cuenta la respuesta del crecimiento a partir del explante.
- Evaluar si se forman callos en el cultivo Etapa 2, y qué área del explante da lugar a nuevos brotes, finalmente determinar la tasa de crecimiento potencial de multiplicación en la Etapa 2.



2.4.3. Violeta africana

La violeta africana, conocida botánicamente como *Saintpaulia* es tal vez la más popular planta ornamental de interiores. Existen muchas especies por lo que fácilmente satisface a cualquier comprador, por otra parte, su fácil crecimiento atrae a los jardineros principiantes. Podemos encontrar plantas miniaturas (15 cm o menos de diámetro) a muy grandes (41 cm de diámetro). Las flores pueden ser azules, púrpuras, lavanda, rosa, rojo y blanco, estas pueden ser bicolors o multicolors (DepHor, 2014).

Violeta africana

Propósito

Iniciar cultivos asépticos para propagación clonal rápida y aislar varios fenotipos a partir de secciones de hojas y peciolas de violeta africana quimérica (imágenes obtenidas de PhotoSci, 2014).

Preparación del medio

1 litro equivalente de Medio para violeta africana

1. En un matraz Erlenmeyer de 2000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él lo siguiente:
 - a) 10 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
 - b) 10 ml del stock de tiamina (40 mg/l)
 - c) 10 ml del stock de mio-inositol (10 g/l)
 - d) 30 g de sacarosa
 - e) 20 ml del stock de AIA (10 mg/100 ml)
 - f) 20 ml del stock de cinetina (10 mg/100 ml)
 - g) 10 ml del stock de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (17g/l)
 - h) 8 ml del stock de sulfato de adenina (1 g/100 ml)
3. Ajustar al volumen de 1000 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Adicionar 8 g de agar TC. Derretir.
5. Distribuir alícuotas de 25 ml por tubo de cultivo (25x150 mm)
6. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.
7. Enfriar tubos inclinados.



Violeta africana

Preparación del explante

1. Remover hojas jóvenes y saludables a partir del stock de plantas de violeta africana con un bisturí. Usar diferentes variedades abigarradas con sectores de hojas blancas, rojas, o verde claro. Registrar el nombre de la variedad de cada planta.
2. Lave el explante de hoja con agua tibia y jabonosa, enjuague. El tejido de hojas puede ser fácilmente magullada, sea cuidadoso.
3. Envuelva el explante en gasa y colóquelo en un vaso de precipitados de 250 ml cubierto con una caja de Petri.
4. Desinfecte el tejido con blanqueador al 10% durante 15 min.
5. Enjuague el tejido tres veces con agua destilada y estéril.
6. Escinda explantes de 1 cm² a partir de las hojas y secciones de 1 cm del peciolo. Tome los seis sectores de la hoja tal como se muestran en la Figura 5. Corte el sector claro de la hoja e incluya toda la vena principal de la hoja adyacente al sector mutante (siempre que la vena sea verde).
7. Coloque estos explantes sobre el Medio de violeta africana.
8. Incube los explantes sobre el anaquel de cultivo.

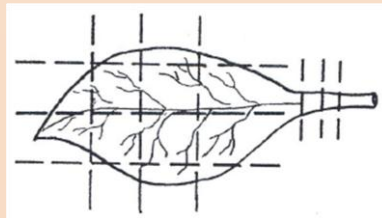


Figura 11. Escisión de seis explantes a partir de una hoja de violeta africana: cuatro secciones de hoja de 1 cm² y dos secciones de peciolo de 1 cm. Corte el sector claro de la hoja e incluya toda la vena principal de la hoja adyacente al sector mutante.

Tomado de: Smith R.H, 2013.

Observaciones

- Observar el progreso semanal de los explantes. Notar diferencias en el desarrollo de las secciones.
- Hacer anotaciones en la bitácora, respondiendo a las siguientes interrogaciones:
 - ¿Existe alguna diferencia en la respuesta morfogénica entre el tejido de hoja y el tejido de peciolo? Si es así, ¿Cuál es la diferencia?
 - ¿Qué es una quimera? Notar la ubicación y color de plántulas derivadas de los diferentes sectores.
 - ¿Para qué podrán servir las líneas puras albinas en la investigación de cultivo de tejidos?
 - ¿Hubo diferencias en la respuesta entre los diferentes cultivares? ¿A qué lo atribuye?



2.4.4. Cactus

La especie de cactus *Corynphata*, tiene su hábitat en la zona sureste de nuestro país, generalmente Puebla, encontrándose de manera escasa más al norte. Las flores del cactus son regulares, cuando la planta ha alcanzado cierta madurez. Entre los cactus, este género es el más fácil a ser cultivado (Dicht y col. 2003).

Cactus

Propósito

Establecer un cultivo aséptico de plántulas de cactus *Coryphantha* sp. u otra especie de cactus (imagen obtenida de PhotoSci, 2014).

Preparación del medio

1 litro equivalente de Medio Etapa 1 para cactus.

1. En un matraz Erlenmeyer de 2000 ml colocar 500 ml de agua desionizada-destilada.
2. Mezclar en él 10 ml de cada una de las sales Murashige y Skoog: nitratos, haluros, sulfatos, NaFeEDTA, PBMo
3. Ajustar al volumen de 1000 ml. Ajustar pH a 5.7
4. Adicionar 8 g de agar TC. Derretir.
5. Distribuir alícuotas de 25 ml por tubo de cultivo (25x150 mm)
6. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C ó 15 psi.
7. Enfriar tubos inclinados.

Preparación del explante

- Esterilizar superficialmente semillas en blanqueador al 10% durante 10 min y enjuagar con agua estéril. Colocar las semillas sobre la superficie del medio Etapa 1 para cactus. Cultivar en estantes de cultivo.
- Explantes de brotes a partir de plántulas crecidas asépticamente son subcultivadas en medio MS suplementado (por litro) con 4 mg de tiamina, 100 ml de mio-inositol, 20 g de sacarosa, 44 μM de BA y 0.5 μM de 2,4-D a pH 5.7. Los callos pueden proliferar en cuatro semanas y ser subcultivados en el medio antes descrito.
- Para la proliferación de brotes, subcultivar callos de 10 mm de diámetro sobre el medio antes mencionado sin BA ni 2,4-D.
- Múltiples brotes pueden ser desarrollados en 8 semanas. Los brotes pueden ser aislados y cultivados en medio MS a la mitad de su concentración, 0.4 mg/l de tiamina, 20 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar TC. El medio (10 ml por contenedor) debe ser vertido en vasos Magenta GA-7. Al secarse el medio, el enraizado se fortalece, y en 8 semanas la mayoría de los brotes serán enraizados.



Caso de estudio

De la lectura del **artículo 5**, titulado “**Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose cactácea ornamental y recurso fitogenético del desierto chihuahuense**” de Villavicencio-Gutiérrez EE y colaboradores.

Lee, elabora o responde los siguientes cuestionamientos o indicaciones:

- a) Indica el objetivo de este trabajo.
- b) Elabora un diagrama en donde establezca el proceso desarrollado (materiales y métodos), clasificándola por etapas (micropropagación)
- c) ¿Cuáles son los insumos necesarios para llevar a cabo el proceso?
- d) ¿Qué diferencia muestra este protocolo de micropropagación con los últimos tres casos de estudio?
- d) ¿Cuáles son los principales resultados de este trabajo?

Actividades

La elaboración de las actividades estará guiada por tu figura académica, mismo que te indicará, a través de la **Planificación de actividades de la figura académica**, la dinámica que tú y tus compañeros (as) llevarán a cabo, así como los envíos que tendrán que realizar.

Para el envío de tus trabajos usarás la siguiente nomenclatura: BCTV2_U2_A1_XXYZ, donde BCTV2 corresponde a las siglas de la asignatura, U2 es la etapa de conocimiento, A1 es el número de actividad, el cual debes sustituir considerando la actividad que se realices, XX son las primeras letras de tu nombre, Y la primera letra de tu apellido paterno y Z la primera letra de tu apellido materno.

Autorreflexiones

Para la parte de **autorreflexiones** debes responder las *Preguntas de Autorreflexión* indicadas por tu figura académica y enviar tu archivo. Cabe recordar que esta actividad tiene una ponderación del 10% de tu evaluación. Para el envío de tu autorreflexión utiliza la siguiente nomenclatura: BCTV2_U2_ATR_XXYZ, donde BCTV2 corresponde a las siglas de la asignatura, U2 es la unidad de conocimiento, XX son las primeras letras de tu nombre, y la primera letra de tu apellido paterno y Z la primera letra de tu apellido materno



Cierre de la unidad

Hemos concluido con la revisión de protocolos de cultivo. Estos no son los únicos, pero proveen mucha información que sustenta el trabajo en laboratorio. Es de comprender que se requiere ahora esfuerzo práctico para poner en marcha lo aprendido, por lo que se espera que sea el punto de inicio a un proceso más complejo.

Como comprenderás el trabajo en el laboratorio implica no sólo destreza manual, sino también el saber registrar los aspectos sobresalientes del trabajo, recordar los pasos realizados con el fin de evaluar las inconsistencias obtenidas (generalmente en lo referente a la contaminación del cultivo) o la razón de sus logros.

Los cinco casos de estudio en los que participaste presentan una forma diferente de abordar una necesidad referente a la micro-propagación, pero con un fin único: la propagación en masa de plantas.

La evidencia del aprendizaje atendida, ha cumplido con generar en Ustedes, alumnos, los mecanismos que generan los casos de éxito en la micro-propagación de especies (generalmente de importancia económica), de tal manera que cierre el ciclo de comercialización.

La última unidad que nos espera, provee alternativas que van de la mano a lo anteriormente descrito, nos referimos al “emprendurismo” definido como iniciativa empresarial. Este tópico espera poner en cada uno de Ustedes, los pasos necesarios para involucrarse en este tipo de aspectos.



Para saber más



Cada una de estos enlaces web, tienen en su formato fotografías, recomendamos entonces acceder a ellas.

Ramírez H, Lentini Z, Vallejo-Cabrera FA (2009) “Evaluación y selección de un protocolo para la regeneración *in vitro* de la variedad de tomate Unapal-Arreboles”. Acta Agronómica, Universidad Nacional de Colombia (Palmira) 58(1) 29-33.

Colección de artículos de biotecnología. Preparación del medio Y3 para cultivo de plantas.
<http://www.biotecharticles.com/Others-Article/Preparing-Y3-Medium-For-Culturing-Plants-in-Vitro-845.html>

Revista de biología tropical. Valdez M. y col. (2004). *Un método de transformación genética de maíz para conferirle resistencia ulterior a enfermedades virales.*
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442004000300039&script=sci_arttext
(Consultado el 14 de enero 2014)



Fuentes de consulta



Abe T. y Futsuhara Y., (1985). *Efficient plant regeneration by somatic embryogenesis from root callus tissue of rice (Oryza sativa L.)*. Journal of Plant Physiology, 121:11-118.

Azpeitia M.A., Chan JL, Carbonell LS y Oropeza SC, 2009. *Influencia de la subdivisión del callo embriogénico en la formación de embriones somáticos de cocotero*. Agricultura técnica en México (35): 39-48.

Bhaskaran S. y Smith R.H. (1988). "Enhanced somatic embryogenesis in Sorghum bicolor from shoot tip culture" In *Vitro Cellular and Developmental Biology*, 24:65-70.

Bhaskaran S. y Smith R.H., (1990). *Regeneration in cereal tissue culture: A review*. Crop Science, 30: 1328-1337.

Close K.R. y Gallagher-Ludeman L.A., (1989). *Structure-activity relationships of auxin-like plant growth regulators and genetic influences on the cultura induction responses in maize (Zea mays L.)*. Plant Science, 61:245-252.

DepHor, 2014. *Department of horticulture, Africam violet care*.

<https://web.archive.org/web/20220306064528/https://ag.purdue.edu/hla/pubs/HO/HO-10.pdf> (Consultado el 15 de marzo 2014)

Dicht, Reto, Lüthy, Adrian, 2003. *Coryphantha, cacti of Mexico and Southern USA*. Germany: Springer.

Forest, 2014. Hoja de datos, Ficus elástica. *Environmental horticulture*, University of Florida

https://web.archive.org/web/20210418134444/http://hort.ufl.edu/database/documents/pdf/tree_fact_sheets/ficelaa.pdf



- Gisbert, D.C., 2014. *Morfogénesis, la ruta organogénica versus la ruta embriogénica*. Artículo docente de la Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de biotecnología. Riunet [en línea] <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/11526/Microsoft%20Word%20-%20art%C3%ADculo%20docente%20cgisbert%20sept2010.pdf?sequence=1> (consultado el 15 de febrero 2014).
- Herb, 2014. *Herbario virtual del Mediterráneo occidental*. Comunidad de Valencia, España. [en línea] <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/especie/4957.html> (consultado el 18 de marzo de 2014).
- Heyser J.W. y Nabors M.W., (1982). *Long term plant regeneration, somatic embryogenesis and green spot formation in secondary oat (Avena sativa) callus*. Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie, 107:153-160.
- Hodges T.K., Kamo K.K., Imbrie C.W. y Becwar M.R. (1986). *Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize*. Biotechnology, 4:219-223.
- Lloyd G.B. y McCown B.H., (1980). *Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture*. Combined Proceedings of the International Plant Properties Society, 30: 421-427.
- Ma H., Gu M. y Liang G.H. (1987). *Plant regeneration from cultured immature embryos of Sorghum bicolor L. Moench*. Theoretical and Applied Genetics, 73:389-394.
- McCown B.H. (2013). Woody shrubs and trees En: Smith R.H. (Ed.). *Plant tissue culture: Techniques and experiments*. USA: Academic Press. ISBN: 978-0-12-415920-4.
- Nabors M.W., Heyser J.W., Dykes T.A. y DeMott K.J. (1983). *Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures*. Planta, 157:385-391.
- Peng J. y Hodges T.K. (1989). *Genetic analysis of plant regeneration in rice (Oryza sativa L.)*. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 25:91-94.
- Raghavan V. (1985). *Embryogenesis in angiosperms: A developmental and experimental study*. New York: Cambridge Univ. Press.
- Rout G.R. y Jain S.M. (2005). "Micropropagation of floricultural crops". En Murch S.J. y Saxena P.K. (Ed.) *Journey of a single cell to a plant*. USA: Science Publishers, Inc. ISBN: 1-57808-352-4.



- Seabrook J.E.A., Cumming B.G. y Dionne L.H. (1976). *In vitro induction of adventitious shoot and root apices on Narcissus (daffodil and narcissus) cultivar tissue*. Canadian Journal of Botany, 54:814-819.
- Smith R.H. (2013). *Plant tissue culture: Techniques and experiments*. USA: Academic Press. ISBN: 978-0-12-415920-4.
- Sung Z.R., Feinberg A. Chorneau R., Borkird C., Furner I., Smith J., Terzi M., LaShiavo R, Giulliano G., Pitto L. y Nutti-Ronchi V. (1984). *Developmental biology of embryogenesis from carrot culture*. Plant Molecular Biology Reports, 2:3-14.
- Tome D.T. y Smith O.S. (1985). *The effect of parental genotype on initiation of embryonic callus form elite maize (Zea mays L.) germoplasm*. Theoretical and Applied Genetics, 70:505-509.
- Wernicke W. y Brettell R. I. S., 1982. *Morphogenesis from cultured leaf tissue of Sorghum bicolor-culture initiation*. Protoplasma, 111:19-27.