



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMÓN
Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias,
Forestales y Veterinarias

Convenio UMSS-CIUF
Posgrado de la FCAPFyV

Departamento de Fitotecnia y Producción Vegetal
Laboratorio de Biotecnología



APLICACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN LA MULTIPLICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS



Editores:

Gino Aguirre Villarroel
Jean Pierre Baudoin
Lilibeth Leigue Arnéz



Comisión Universitaria para el Desarrollo (CUD)
Consejo Interuniversitario de la Comunidad Francesa de Bélgica - CIUF

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMÓN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, FORESTALES, PECUARIAS Y VETERINARIAS
Departamento de Fitotecnia – Laboratorio de Biotecnología

APLICACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN LA MULTIPLICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS



2016
Cochabamba - Bolivia

Editores:
Gino Aguirre Villarroel
Jean Pierre Baudoin
Lilibeth Leigue Arnéz

2016 **Aplicación del Cultivo de Tejidos
en la Multiplicación y Conservación
de los Recursos Fitogenéticos**

Quedan reservados todos los derechos de propiedad bajo registro

Depósito Legal xxxx

ISBN xxxx

Autores

| | | | |
|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Noemí Aguilar | Janett Céspedes | Rosario Lucero | Cecilia Ugarte |
| Gino Aguirre | Nidia Coca | Katty Rojas | Claudio Vázquez |
| Teresa Ávila | Mario Coca Morante | Raúl Blas Sevillano | Carmen L. Villarroel |
| Jean Pierre Baudoin | Nelson Chávez | María State | Juan Villarroel |
| Ximena Cadima | Eva Dancé Sifuentes | Lourdes Tapia | Jazmín Yamashiro |
| Margarita Calle | Sara de la Barra | | |

Editores

Gino Aguirre Villarroel, Jean Pierre Baudoin, Lilibeth Leigue Arnéz

Producción

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMÓN - Convenio UMSS-CIUF
Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias
Posgrado de la FCAPFyV
Departamento de Fitotecnia y Producción Vegetal
Laboratorio de Biotecnología

Arte y Diagramación

María Isabel Soliz

Revisión Documento

Andrea Alemán A.

Impresión

Imprenta xxxxxxx

Cita correcta

Aguirre, Gino; Baudoin, Jean Pierre; Leigue, Lilibeth (editores). 2010. Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. Cochabamba, Bolivia. 240 p.

Dirección de contacto

Laboratorio de Biotecnología FCAPFyV
Telf./Fax: 591 4 4762752
E-mail: g.aguirre@umss.edu.bo

El contenido de cada capítulo, es de exclusiva
responsabilidad de cada uno de sus autores.

2016
Cochabamba - Bolivia

Agradecimientos

El presente documento es uno de los resultados alcanzados a través del Convenio entre la Universidad Mayor de San Simón y el Consejo Interuniversitario de la Comunidad Francesa de Bélgica (UMSS-CIUF) en la Actividad IV: “Conservación y Manejo de los Recursos Fitogenéticos”, misma que desde el año 2000 ha venido impulsando la formación e investigación en Recursos Fitogenéticos a profesionales bolivianos comprometidos con esta temática. El apoyo a esta Actividad, otorgado por la Coordinación, Gestión y Administración del CIUF, entre los cuales se destacan los profesores Yves Carlier, Faustino Torrico, Christian Duqué y la Lic. Wilma Gómez, ha sido una de las experiencias más gratas. Los responsables de este libro manifiestan su profundo agradecimiento por el constante apoyo.

La revisión de este documento ha sido realizada por la Ing. Agr. M.Sc. Lilibeth Leigue, Coordinadora de la Especialidad en Recursos Fitogenéticos, por la Dra. Ingrid Morales, docente investigadora de la UAGRM, por la Ing. M.Sc. Carmen Villarroel Vogt, docente invitada en el Posgrado de Recursos Fitogenéticos, por el Dr. Raúl Blas Sevillano, docente de la UNALM – Perú, por el Ing. M.Sc. Víctor Hugo Cardoso, Secretario Ejecutivo del Programa Cooperativo de Innovación Tecnológico Agropecuaria para la Región Andina - PROCIANDINO y por la Lic. Andrea Alemán A., Comunicadora Social, a quienes manifestamos nuestro sincero agradecimiento.

Se hace público nuestro reconocimiento a los diferentes autores, todos vinculados con la UMSS, con el posgrado en Recursos Fitogenéticos y el pregrado de la Carrera de Ingeniería Agronómica, quienes han contribuido con su tiempo y sus experiencias traducidas en los diferentes capítulos.

La participación de la Universidad Nacional Agraria La Molina del Perú, particularmente a través de los profesores Dr. Raúl Blas e Ing. M.Sc. Lourdes Tapia, ha contribuido significativamente a la realización de este documento, estamos muy reconocidos por su valioso apoyo.

El PROCIANDINO a través del Ing. M.Sc. Víctor Hugo Cardoso, Secretario Ejecutivo y Especialista Regional en Tecnología e Innovación, ha contribuido en la realización de este libro, brindando su apoyo en la diagramación a través de la Sra Mary Soliz, quien además ha diseñado la portada del presente documento. Para ambos nuestro reconocimiento.

La participación facultativa, a su turno, de los Jefes de Departamento de Fitotecnia, Ing. M.Sc. Benigno Bascopé, Ing. Agr. Freddy Espinoza e Ing. Agr. Gustavo Cárdenas; de Betty Barrionuevo, Licet Bernabé y Karina Cardona, secretarias del Posgrado Facultativo y de la Maestría en Recursos Fitogenéticos y de Simón Rojas, administrativo del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de

Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias (FCAPFyV), ha significado un importante apoyo en la construcción del posgrado en Recursos Fitogenéticos y en la elaboración de este documento.

Finalmente, el constante seguimiento del Prof. Jean Pierre Baudoin a la realización del libro, su incondicional apoyo, amistad y marcado interés en desarrollar el conocimiento en el área andina en aspectos relacionados a la conservación y uso de los recursos fitogenéticos, ha sido determinante en la concepción y realización no sólo de este documento, sino de la maestría misma; va para él nuestro más profundo agradecimiento.

Presentación

Introducción

El desarrollo de la Biotecnología Vegetal ha permitido abrir un importante número de oportunidades precisamente para los países en desarrollo. A lado de los beneficios que pueden generar estas técnicas, se plantean desafíos científicos, técnicos y sociales, los cuales son dilucidados en las universidades y en los centros nacionales de investigación e incluso en los emprendimientos privados y empresariales. Esta dinámica ha permitido un desarrollo de la biotecnología vegetal en general y más específicamente del cultivo de tejidos *in vitro*.

CULTIVOS *IN VITRO* EN BOLIVIA

En Bolivia existe cerca de 18 laboratorios inscritos en REDBIO¹, aunque el desarrollo del cultivo de tejidos vegetales no pasa de los 25 años. Su aplicación práctica en el campo agrícola es la conservación de recursos fitogenéticos y la generación de plantas de alta calidad genética y sanitaria, factibles de ser certificadas. Estas técnicas son aplicadas a la conservación de tubérculos, raíces, frutales y últimamente, especies forestales.

Los laboratorios bolivianos se aglutinan en torno a la REDBIO Bolivia, misma que permite formar parte de los 750 laboratorios de biotecnología vegetal registrados en toda Latinoamérica y el Caribe (Ávila e Izquierdo, 2006).

Actualmente, las técnicas de cultivo de tejidos más utilizadas en Bolivia son las siguientes:

- La limpieza viral para la obtención de plantas libres de patógenos.
- La micropropagación a gran escala de plantas, que genera semilla certificada de alta categoría en el caso de papa y de material vegetal con alta calidad genética y fitosanitaria en especies aún no incluidas en el proceso formal de producción certificada.
- La conservación *in vitro* como componente de la estrategia de conservación de los bancos de germoplasma de especies multiplicadas vegetativamente o de semilla recalcitrante.

Estas técnicas, impulsadas por los centros de investigación y universidades, han beneficiado a empresas, productores, comunidades campesinas y agricultores al poder ofertar materiales de alta calidad sanitaria. Esta aplicación ha fortalecido a entidades vigentes anteriormente como el Programa Nacional de Semillas y el Sistema Nacional para la Conservación de Recursos Genéticos para la Agricultura y la Alimentación (SINARGEAA).

La aplicación del cultivo de tejidos en Bolivia (VMARNDF, 1999) inicia en 1986 con la Unidad de Producción de Semilla de Papa (SEPA), que basa su estrategia para la producción de cerca de 3.000 toneladas anuales de semilla de papa, a partir de plántulas libres

1 Red Latinoamericana de Biotecnología. www.redbio.org

de enfermedades mediante el cultivo de tejidos *in vitro*. Los mecanismos de control interno de calidad, entre ellos el test de ELISA para detectar la eventual presencia de virus, están sujetos a un cronograma tanto para las plántulas de laboratorio como de invernadero.

Esta empresa tiene una producción promedio anual de 322.000 plántulas *in vitro*, que genera una producción bajo mallas antiáfidos de 1.290.000 minitubérculos (semilla pre-básica). Con este volumen SEPA provee al mercado nacional con 950.300 Kg de semilla básica. La exportación de semilla pre-básica para el Brasil y Chile es cercana a un millón de mini tubérculos/año.

La fase de remultiplicación de la semilla de papa de categorías básica y registrada se efectúa con más de 1.200 agricultores en parcelas sobre los 3.000 m de altitud. La producción anual es de 2.500 toneladas que son utilizadas por agricultores remultiplicadores de todo el país. La alta calidad de semilla de papa que se comercializa en el país proviene precisamente de laboratorios de cultivo de tejidos nacionales como es el caso de SEPA (Aguirre *et al.*, 2007).

A finales de los ochenta, el Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN) en La Paz, instala con el apoyo de la Agencia Internacional de Energía Atómica un laboratorio de Cultivo de Tejidos *in vitro* destinado a realizar mutaciones inducidas en material vegetal de diferentes especies. Actualmente, el IBTEN está produciendo plántulas *in vitro* para la obtención de semilla de alta calidad de papa, oca, isaño, haba y ajo, así como plántulas *in vitro* de piña y plátano destinados a los productores.

En 1991, la actual Fundación PROINPA² establece en la Estación Experimental de Toralapa un Laboratorio de Cultivo de Tejidos, el mismo que se especializa en la limpieza viral, habiendo saneado más de un centenar de variedades de papa y de otros tubérculos

alto andinos (oca, papalisa e isaño), con la finalidad de recuperar el potencial productivo de estas especies. En base a este material se propaga cerca a 100.000 plantas al año, para iniciar flujos de producción de semilla de papa en el sistema formal y en el sistema tradicional de semilla.

En 1994, PROINPA inicia la conservación *in vitro* de las entradas en riesgo del Banco Nacional de Germoplasma de Tubérculos y Raíces Andinas. Hasta el año 2006 se encontraban conservadas *in vitro* el 47% de la colección de papa (828 entradas) y el 97% de la colección de papalisa (192 entradas).

A principios de esta década, PROINPA produce con éxito y a 3.430 msnm más de 120.000 vitroplantas de banano para los programas de desarrollo alternativo del Trópico de Cochabamba, demostrando de este modo que un laboratorio puede ser versátil de acuerdo a las necesidades del mercado. Paradójicamente, esta es la última y única licitación en materia de producción de vitroplantas de banano que realiza una entidad de apoyo al desarrollo alternativo a una entidad local. Previa a esta licitación, en todos los años de vida de estas agencias en el país, cerca al millón de plantas fueron importadas del exterior por los programas de Desarrollo Alternativo, favoreciendo a la consolidación de laboratorios extranjeros y no así a los laboratorios nacionales.

Actualmente PROINPA realiza la generación de material de alta calidad de frutales de clima templado (duraznero, manzano, frambueso, cerezo y frutilla), así como de algunas especies ornamentales, para apoyar demandas específicas del sector público y privado.

A principios de los años 90, el Programa Agroquímico de la Universidad Mayor de San Simón con el apoyo de la Cooperación Canadiense, establece un Laboratorio de Cultivo de Tejidos de especies aromáticas, realizando importantes avances en la generación de protocolos de laboratorio y en la producción de piretro para la generación de insecticidas piretroides, sin embargo, debido a la finaliza-

² PROINPA: Fundación para la Promoción e Investigación en Productos Andinos. www.proinpa.org

ción del financiamiento, este laboratorio no se encuentra funcionando actualmente.

La Corporación Andina de Fomento en 1991 apoyó a la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno de Santa Cruz con el equipamiento de un laboratorio ubicado en el Instituto de Investigaciones Agrícolas llamado "El Vallecito"; que se dedicaba a la conservación de germoplasma de yuca (*Manihot esculenta*) y camote (*Ipomea batata*). En la actualidad se multiplican y difunden los clones producidos *in vitro* de estas especies, como también se realizan trabajos de microinjertación en cítricos. En la UAGRM³, Carrera de Biología, también funciona el laboratorio de cultivo de tejidos BIOFAN dedicado a la propagación de orquídeas y otras plantas ornamentales y forestales, el cual fue donado por FAN⁴, que estableció en 1995 un laboratorio de cultivo de tejidos, principalmente para la recuperación de especies endémicas, habiendo realizado importantes aportes en el campo de las orquídeas y de otras especies nativas durante su vigencia.

La Universidad Mayor de San Simón (UMSS), la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias es la primera unidad académica en el país en incorporar en su currícula la asignatura de Biotecnología Vegetal en 1993. En estos últimos ocho años, el laboratorio ha sido equipado gracias al apoyo del Consejo de Universidades de Bélgica bajo el Convenio UMSS-CIUF⁵ a través del programa CUI⁶. La investigación se dirige principalmente a la generación de protocolos de multiplicación y conservación en especies andinas y en especies ornamentales. A partir de este laboratorio, se ha realizado una Especialidad en Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada y dos Maestrías bajo el mismo título.

En la década de los 90, se establecen otros laboratorios, como el Laboratorio de Biotecno-

logía del IBTA Chapare, para la producción de banano, piña y otras especies tropicales y el laboratorio privado *IN VITRO* en La Paz, ambos actualmente no se encuentran en funcionamiento.

El Laboratorio de Biotecnología del Banco de Semillas Forestales (BASFOR), dependiente asimismo de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias y creado a fines de los años 90, se ha especializado en la generación de protocolos para la multiplicación de especies forestales, logrando generar más de 70 protocolos para el establecimiento de plantas forestales.

El Centro Fitoecogenético de Pairumani, dependiente de la Fundación Simón I. Patiño, establece en el año 2002 un laboratorio de cultivo de tejidos, cuyo principal objetivo es la generación de protocolos para la conservación del género *Passiflora*, el cultivo de anteras de maíz y la limpieza viral de algunas especies como habas. Actualmente, el centro cuenta con la colecta de once especies de pasifloras realizada con apoyo del IPGRI⁷ en el año 1997. Estas muestras recolectadas son conservadas en cámara fría a 0° C, en campo y en condiciones *in vitro*, continuando con la optimización de las metodologías de conservación *in vitro* y crioconservación.

La Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) de La Paz, a través del laboratorio de cultivo de tejidos del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la Carrera de Biología, ha buscado estrategias para la conservación de especies forestales alto andinas en riesgo de extinción, así como para la conservación de orquídeas endémicas del subtrópico de La Paz.

La Facultad de Agronomía de la UMSA cuenta con un laboratorio de Biotecnología Vegetal. Actualmente está realizando investigaciones en la propagación de plantas de papa, frutilla, crisantemo y microorganismos de interés agrícola. Por otro lado, la Carrera de Bioquímica

3 Universidad Autónoma Gabriel René Moreno

4 FAN: Fundación Amigos de la Naturaleza.

5 CIUF: Cooperation Universitaire Institutionnelle Universités Francophones de Belgique.

6 CUI: Cooperación Universitaria Institucional.

7 IPGRI: International Plant Genetic Resources Institute. Actualmente BIOVERSITY.

cuenta también con un laboratorio de cultivo de tejidos dedicado principalmente a la investigación en plantas aromáticas y medicinales.

La Escuela Militar de Ingeniería en La Paz cumple funciones académicas y de investigación en un laboratorio de cultivo de tejidos, entre las que se destaca el uso de reemplazantes del agar como solidificantes de medios de cultivo (información utilizada actualmente por otros laboratorios locales). Sus actividades de interacción social, se refieren a limpiar virus de variedades nativas de papa de la zona circunlacustre del lago Titicaca para la producción de tubérculo - semilla de alta calidad sanitaria.

En la Universidad Técnica de Oruro, se cuenta con un laboratorio de cultivo de tejidos que cumple funciones académicas y de investigación y trabaja con especies andinas.

En Bolivia, en los últimos veinte 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.

Las colecciones resguardadas en bancos de germoplasma han sido fortalecidas al incorporar en su estrategia a la conservación *in vitro* y la crioconservación. La Red Boliviana de Biotecnología, a través de sus asociados, ha generado cinco reuniones nacionales en estos últimos años, difundiendo más de un centenar de trabajos escritos en cada reunión. Estas acciones van fortaleciendo paulatinamente a esta asociación, que permite mostrar la capacidad tecnológica y humana existente en el ámbito nacional.

Finalmente, es posible afirmar que el desarrollo de la agricultura boliviana, tiene un valioso aliado en el uso de estas técnicas y metodologías, que son ampliamente difundidas por los diferentes laboratorios y centros

de enseñanza pertenecientes a universidades y fundaciones de apoyo al desarrollo. Las experiencias generadas por los autores, involucrados con la formación académica de la UMSS, se puede apreciar en este documento.

CULTIVOS *IN VITRO* EN PERÚ

De acuerdo a la REDBIO⁸ y a su directorio de laboratorios inscritos en esta Red, en Perú existen 56 laboratorios relacionados a la biotecnología vegetal, debidamente registrados, de los cuales 32 pertenecen a las universidades tanto nacionales como privadas en sus carreras de ciencias agrarias, bioquímicas y biológicas. Entre éstas se destaca el Instituto de Biotecnología de la UNALM⁹, que cuenta con los laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales, con actividades de investigación y docencia, con laboratorios de Biología Molecular destinados a la caracterización molecular de especies nativas tanto de animales y vegetales; y el laboratorio de Biotecnología Industrial dirigido a la identificación y uso de metabolitos secundarios, generación de vacunas e identificación de compuestos valiosos en los recursos genéticos. Para su desarrollo y equipamiento, este Instituto ha contado en los últimos diez años con el valioso apoyo del CIUF.

El Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias del Perú cuenta con 11 laboratorios distribuidos en un número similar de estaciones experimentales y centros de investigación, ubicados en las diferentes ecoregiones con que cuenta el país. Existen además, tres laboratorios de investigación que dependen directamente del CIP¹⁰, con sede en Lima.

La actividad empresarial se encuentra representada con una decena de laboratorios, misma que ha iniciado emprendimientos

8 Red de Biotecnología Vegetal para la América Latina y el Caribe. www.redbio.org

9 UNALM: Universidad Nacional Agraria La Molina. www.unalm.edu.pe

10 CIP: Centro Internacional de la Papa. www.cipotato.org

principalmente en la propagación masiva de especies de alta demanda en la agricultura peruana y regional.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre G., Villarroel C., Trujillo A., Rocabado C., Ávila T., Mendoza V.H., y Pérez J. 2007. *El Cultivo de tejidos vegetales en Bolivia. Experiencias de su actual uso en la Agricultura Boliviana*. Congreso Sudamericano de Agronomía. Cochabamba, Bolivia. 10 – 12 de Octubre de 2007.

Ávila T., Izquierdo J. 2006. "Management of the appropriate agricultural biotechnology for small

producers: Bolivia case study". *Electronic Journal of Biotechnology*. Universidad Católica De Valparaíso; 9 (1): 2-7. En: www.bioline.org.br/abstract?id=ej06001. Consultado 15 de abril 2009. En: www.REDBIO.org

VMARNDF/DGB – PNUMA/FMAN. 1999. *Proyecto GEF/1200 -98-71 Apoyo para el Establecimiento de un Marco Nacional de Bioseguridad. Diagnóstico sobre la Situación de la seguridad de la Biotecnología y la Biotecnología en Bolivia*. La Paz, Bolivia. pp. 68.

Profesionales participantes en el documento

A continuación se indica en orden alfabético la nómina de profesionales que brindaron su experiencia profesional en la edición técnica, revisión y co autoría de los diferentes capítulos de este documento.

EDITORES TÉCNICOS:

Gino Aguirre Villarroel

(g.aguirre@umss.edu.bo)

Ingeniero Agrónomo FCAyP - UMSS Cochabamba – Bolivia 1983. M.Sc. de la **Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux – Bélgica** 1990. Investigador, Co Director, Gerente Técnico y Responsable de capacitación en PROINPA años 1990 a 2007. Gestor y Responsable de la Actividad IV «Conservación de Recursos Fitogenéticos» Convenio UMSS-CIUF, de 2000 a 2007. Docente en la Carrera de Ingeniería Agronómica – UMSS desde 1993 en Biotecnología y Propagación de Plantas.

Jean Pierre Baudoin

(Jean-Pierre.Baudoin@ulg.ac.be)

Ingeniero Agrónomo. Orientación Agronomía de Regiones Tropicales y Subtropicales. **Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux** (Belgique) 1973. Doctor en Sciences Agronomiques - Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique) 1981. Profesor ordinario de la Universidad de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech. Responsable de la Actividad IV “Conservación de Recursos Fitogenéticos”. 2000 – 2007. Coordinación de la

Maestría en Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada en el marco de la Fase III CUI UMSS 2008 - 2011. Coordinación de la Actividad “Cultivos andinos” con la UNSAAC (*Universidad Nacional San Antonio Abad de Cusco, Cusco, Perú*) en el marco de la Fase I CUI Perú 2009 – 2012. Redactor en jefe Revista BASE (Biotecnología, Agronomía, Sociedad y Medio Ambiente) de la FASGX Bélgica.

Lilibeth Leigue Arnéz

(lleigue@gmail.com)

Ingeniero Agrónomo (UMSS-Bolivia), M.Sc. Recursos Naturales, con énfasis en Manejo y Conservación de Biodiversidad (CATIE- Costa Rica), especialista en Economía del Sistema Agroalimentario (Cefas-Italia). Trabajó en Cultivo de Tejidos *in Vitro* de especies aromáticas nativas, en la Universidad de Québec en Chicoutimi (Canadá), y participó en el diseño e implementación del laboratorio de cultivo de Tejidos del Centro de Tecnología Agroindustrial (CTA). Coordinadora de la Especialización y Maestría en Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada entre 2000 y 2003, y docente invitada entre 2003 y 2006.

REVISORES:

Andrea Alemán A.

(a.aleman@proinpa.org)

Comunicadora Social titulada en la Universidad Católica Boliviana “San Pablo” (Cochabamba). Realiza estudios de Sociología en la Universidad

Mayor de San Simón y consultorías para la Unidad de Comunicación de la Fundación PROINPA, además de la edición y traducciones de diversos textos.

Raúl Humberto Blas Sevillano
(rblas@lamolina.edu.pe)

Ingeniero Agrónomo y M.Sc. en Mejoramiento Genético de Plantas, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima-Perú y PhD. en Ciencias Agronómicas e Ingeniería Biológica. **Faculté de Sciences Agronomiques de Gembloux-Bélgica.** En 1997 se incorporó a la Facultad de Agronomía y Departamento de Fitotecnia de la UNALM. Actualmente es profesor asociado y dicta cursos de pre y post grado en el área de mejoramiento genético de plantas y doctorado en agricultura sustentable. Es miembro del Instituto de Biotecnología de la UNALM, área de biología molecular. Su principal área de investigación es en gestión de recursos genéticos vegetales de la región andina y mejoramiento de plantas. Ha sido docente invitado en la Maestría en Recursos Fitogenéticos de la UMSS el año 2006.

Victor Hugo Cardoso
(victor.cardoso@iica.int.bo)

Ingeniero Agrónomo/ESPOCH. Ecuador, Master in Agricultural Extension & Education NMSU.USA. Investigador Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP-Ecuador. Experto Internacional Misión de Cooperación Técnica Holandesa EUROCONSUL/CNS/PROSEMPA -Bolivia, Asesor de la Misión de Cooperación Técnica de la República de Alemania/INIAP-GTZ/Ecuador; Subsecretario/Ministerio de Agricultura y Ganadería/Ecuador; Viceministro de Agricultura y Ganadería; Director General del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-INIAP-Ecuador; Especialista Regional en Tecnología & Innovación y Biotecnología para la región Andina/IICA y Secretario Ejecutivo del Programa de Tecnología e Innovación Agropecuaria para la Región Andina.

Lilibeth Leigue Arnéz.

Ingrid Morales Benavent
(imaybe@uagrm.cotas.net,
ymorales1710@yahoo.com)

Licenciada en Biología por la UAGRM en Bolivia. Especialista en Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal. Doctorando en "Biotecnología y Recursos Genéticos de plantas y microorganismos asociados" de la Universidad Politécnica de Madrid. Docente y Coordinadora del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, BIOFAN de la Carrera de Biología de la UAGRM. Ha trabajado por 20 años en Cultivo de tejidos vegetales *in vitro* de especies agrícolas, forestales y ornamentales, especialmente en orquídeas endémicas y nativas de Bolivia.

Carmen Luz Villarroel Vogt
(c.villarroel@proinpa.org)

Ingeniera Agrónoma FCAyP - UMSS Cochabamba – Bolivia 1993. Maestría en Ciencias de la **Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux – Belgique** 2004. Becaria, Técnico, Investigadora y Responsable de Capacitación en la Fundación PROINPA desde 1990 a la fecha. Docente invitada en la Especialidad y Maestría en Conservación de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada 2000 a 2007.

AUTORES:

Gino Aguirre Villarroel

Teresa Avila
(t.avila@fundacionpatino.org,
mtereavila@hotmail.com)

Ingeniero Agrónomo, UMSS Cochabamba Bolivia 1992. Maestría en Ciencias, Especialidad Biotecnología, **Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgica** 1994. Responsable Laboratorios de Biotecnología, Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, desde 2002. Docente Carrera de Biología UMSS desde

1996. Docente Maestría Protección Vegetal (2009), Maestría Ecología y Medio Ambiente (2004, 2005 y 2006), Maestría en Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada (2000, 2001 y 2005), UMSS.

Jean Pierre Baudoin

Raúl Blas Sevillano

Ximena Rocío Cadima Fuentes

(x.cadima@proinpa.org)

Ingeniera Agrónoma, con maestría en Biotecnología. Sus áreas de especialidad son los recursos genéticos, cultivo de tejidos y biología molecular. Realizó sus estudios de licenciatura en la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Simón (UMSS), Cochabamba y la maestría en la Universidad de Wageningen, Holanda. Actualmente ocupa el cargo de Coordinadora del área temática de recursos genéticos en la Fundación PROINPA y es docente invitada en la Maestría de Recursos Genéticos y Biotecnología Aplicada en la UMSS.

Margarita Calle M.

(margaritacalle@yahoo.com)

Ingeniera Agrónoma UMSS, Cochabamba, Bolivia, **Maestría en Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada en 2009, Convenio UMSS CIUF**. Pasantía en Cultivos *in vitro* en la UNALM – IBT en 2006. Asistente del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la FCAPFyV gestiones 2005 – 2009. Investigadora del INIAF noviembre 2009.

Nelson Chávez

(nelsonchavezalcoba@hotmail.com)

Ingeniero Agrónomo FCAyP - UMSS Cochabamba – Bolivia en 2008. Consultor independiente. Trabajo de tesis realizado en el laboratorio de Biotecnología de la FCAPFyV de la UMSS en embriogénesis somática en *Violeta africana*.

Mario Coca Morante

(cocamorante.mario@gmail.com)

Ingeniero Agrónomo Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia. Pos grado (Maestría en Ciencias) en Patología Vegetal, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Docente de Fitopatología en la FCAPFyV, UMSS, Cochabamba, Bolivia.

Sara de la Barra Delgadillo

Formación en Biología Facultad de Ciencia y Tecnología, carrera de Biología – UMSS. Cochabamba – Bolivia. Diplomado en Ecología y Medio Ambiente FCyT – UMSS, 2005. Estudiante de la Maestría en Conservación y Manejo de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada. Convenio UMSS CIUF 2009 – 2011. Consultora individual en biodiversidad y recursos fitogenéticos, experiencia en técnicas de cultivos *in vitro*

Rosario Lucero León

Ingeniera Agrónoma. Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Veterinarias, Universidad Técnica de Oruro, 1992. Responsable del Laboratorio de Biotecnología IBTA Chapare, de 1994 a 2001. Posgrado en Rizobiología. Pasantía en Cultivos *in vitro* en la UNALM – IBT, Lima – Perú en 2007. Estudiante de posgrado de la **Maestría en Conservación y Manejo de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada. Convenio UMSS - CIUF 2005 – 2007.**

Katty Guadalupe Rojas Quiroga

(kattyrojas263@hotmail.com)

Licenciatura en Ingeniería Agronómica, UMSS (Cochabamba – Bolivia). **Especialidad en Conservación de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada, Convenio UMSS-CIUF** (Cochabamba-Bolivia), Diplomado CASDER, UPB (Cochabamba-Bolivia). Consultor independiente

María State Vagaón

(maria_svagaon@hotmail.com)

Ingeniero Petroquímico de la Universidad de Petróleo y Gases de Ploiesti – Rumania. Maestría en Educación, Mención Educación Superior. Escuela de Comando del Estado Mayor (ECEM), Universidad Militar de las FFAA. Docente titular en la Universidad Mayor de San Simón – FCAPFyV en la asignatura de Química General.

Maria de Lourdes Tapia y Figueroa

(ltapia@lamolina.edu.pe)

Ingeniera Agrónoma de la Universidad Nacional Hermilio Valdizan de Huanuco - Perú. Maestría en Ciencias Agronómicas. **Faculté de Sciences Agronomiques de Gembloux-Bélgica**. Estudios de Doctorado en la Universidad Ciego de Avila Cuba. Profesor principal en la Facultad de Agronomía y Departamento de Fitotecnia de la UNALM. Es Directora del Instituto de Biotecnología de la UNALM y Lider del área de cultivo de tejidos *in vitro*. Ha sido docente invitada en la Especialidad y en la Maestría en Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada de la UMSS en diferentes gestiones.

Ninfa Cecilia Ugarte Ballón

(cugarte_ballon@yahoo.fr)

Ingeniera Agrónoma FCAYP - UMSS Cochabamba – Bolivia. 1990. M.Sc. en Biotecnología, **Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux – Bélgica**. Especialidad en multiplicación *in vitro* en especies leñosas. CRA – Gembloux. Doctorante en Ciencias Agronómicas y Biotecnología (2004 a la fecha), FSAGX – Bélgica. Responsable del Laboratorio de Biotecnología “Aliso” BASFOR/ESFOR - UMSS. Curadora del Banco de Conservación de Germoplasma *in vitro* de especies forestales. Convenio MDRyMA-SIBTA-SINARGEAA/ BASFOR- ESFOR/UMSS. Docente Escuela de Ciencias Forestales ESFOR en Genética y Mejoramiento Forestal, Procesos Biotecnológicos y Técnicas de Estudio e Investigación.

Claudio Vázquez

(claudioanibal04@yahoo.es)

Ingeniero Agrónomo FCAYP – UMSS en 2002. Diplomado en Ecología y Medio Ambiente. UMSS en 2005. Primer Premio en Biodiversidad en la II Feria de Ciencias de la Universidad Mayor, Real y Pontificia San Francisco Xavier de Chuquisaca, con su trabajo sobre multiplicación *in vitro* de orquídeas en 2006. Alumno de la Maestría en Conservación y Manejo de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada. Convenio UMSS – CIUF gestión 2009 - 2011. Consultor individual en temáticas relacionadas a la agrobiodiversidad, certificación orgánica y conservación de recursos fitogenéticos.

Carmen L. Villarroel Vogt.

Juan Villarroel Solíz

(je.villarroel@agr.umss.edu.bo)

Ingeniero Agrónomo Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias – UMSS. Posgrado en Biotecnología en la Universidad Internacional de Andalucía, España. Docente de la FCAPFyV en las asignaturas de Morfología Vegetal, Sistemática Vegetal y Biotecnología.

Jazmín Yamashiro Q.

(minyamashiro@hotmail.com)

Ingeniero Agrónomo de la Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno el año 2001 en Santa Cruz, Bolivia. Postgrado en Protección Vegetal en la Universidad de Pelotas en Brasil (2004), Estudios superiores a nivel de Maestría en Ciencias, en el marco del Convenio UMSS CIUF en **Manejo y Conservación de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada** en la Universidad Mayor de San Simón de Cochabamba en el año 2009. Con experiencia en Biotecnología, Biología Molecular y desarrollo de proyectos en estas áreas.

Contenido

| | |
|--|-----------|
| Agradecimientos | 3 |
| Presentación | 5 |
| Introducción | 7 |
| Profesionales participantes en el documento | 13 |
| PARTE I. FUNDAMENTOS TEÓRICO PRÁCTICOS DEL CULTIVO DE TEJIDOS <i>IN VITRO</i> | 27 |
| CAPÍTULO 1. ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> | 29 |
| <i>Gino Aguirre, Margarita Calle & Jean Pierre Baudoin</i> | |
| 1.1. Introducción | 29 |
| 1.2. Principios botánicos para el cultivo <i>in vitro</i> | 31 |
| 1.3. Métodos de regeneración <i>in vitro</i> | 31 |
| 1.3.1. Cultivo de órganos | 31 |
| 1.3.2. Explantes primarios | 31 |
| 1.3.3. Cultivo celular | 31 |
| 1.4. Ventajas del cultivo <i>in vitro</i> | 32 |
| 1.5. Limitaciones del cultivo <i>in vitro</i> | 32 |
| 1.6. Aplicaciones del cultivo de tejidos | 32 |
| 1.7. Bibliografía | 33 |
| CAPÍTULO 2. ESTABLECIMIENTO DE UN LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS | 35 |
| <i>Gino Aguirre & Margarita Calle</i> | |
| 2.1. Introducción | 35 |
| 2.2. Localización de un laboratorio de cultivo de tejidos | 35 |
| 2.3. Organización de un laboratorio | 36 |
| 2.3.1. Antesala o vestíbulo | 36 |
| 2.3.2. Área de oficina | 36 |
| 2.3.3. Área de lavado y esterilización | 36 |
| 2.3.4. Área de preparación de medios | 37 |
| 2.3.5. Área de repicaje o siembra | 37 |
| 2.3.6. Área de crecimiento | 38 |
| 2.3.7. Áreas de observación y examen | 39 |
| 2.3.8. Área destinada a la cámara de termoterapia | 39 |
| 2.3.9. Áreas de cuarentena y control fitosanitario | 39 |
| 2.3.10. Áreas frías | 39 |
| 2.3.11. Almacén | 39 |
| 2.3.12. Invernaderos y áreas de aclimatación | 39 |
| 2.4. Equipos y materiales | 40 |
| 2.5. Medidas de seguridad del personal | 41 |
| 2.6. Bibliografía | 41 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 3. NORMAS DE SEGURIDAD EN LABORATORIOS DE CULTIVO DE TEJIDOS | 43 |
| <i>Margarita Calle & Gino Aguirre</i> | |
| 3.1. Introducción | 43 |
| 3.2. Áreas del laboratorio | 43 |
| 3.2.1. Área del vestíbulo | 43 |
| 3.2.2. Área de lavado y esterilización | 43 |
| 3.2.3. Señalización | 44 |
| 3.2.4. Espacio y seguridad en los ambientes | 44 |
| 3.2.5. Área de preparación de medios de cultivo | 45 |
| 3.2.6. Área de cámara de flujo laminar | 46 |
| 3.2.7. <i>Reglas de manejo en el área de cámara de flujo laminar</i> | 46 |
| 3.3. Almacén | 47 |
| 3.3.1. <i>Almacenamiento de los reactivos o sustancias químicas</i> | 47 |
| 3.3.2. <i>Incompatibilidad de sustancias para el almacenamiento</i> | 48 |
| 3.3.3. <i>Reglas de almacenamiento</i> | 48 |
| 3.3.4. <i>Descripción y manipulación de reactivos</i> | 48 |
| 3.3.5. <i>Principales medios de penetración de los agentes químicos</i> | 50 |
| 3.3.6. <i>Efectos de los agentes químicos en el organismo</i> | 50 |
| 3.3.7. <i>Cámaras de seguridad biológica</i> | 50 |
| 3.3.8. <i>Agentes biológicos</i> | 51 |
| 3.3.9. <i>Riesgo eléctrico</i> | 51 |
| 3.3.10. <i>Manejo de residuos</i> | 52 |
| 3.3.11. <i>Cámara de crecimiento</i> | 52 |
| 3.4. Procedimientos y medidas de primeros auxilios | 52 |
| 3.5. Procedimientos para prevenir o eliminar riesgos de accidentes | 54 |
| 3.6. Equipos de seguridad | 54 |
| 3.7. Invernadero | 54 |
| 3.8. Bibliografía | 55 |
| | |
| CAPÍTULO 4. CONTAMINANTES EN CULTIVO <i>IN VITRO</i> | 57 |
| <i>Gerónimo G. F., Pérez B. L. F., Plata G. & Aguirre V. J. G</i> | |
| 4.1. Introducción | 57 |
| 4.2. Principales fuentes de contaminación | 57 |
| 4.3. Microorganismos contaminantes introducidos en el laboratorio de cultivo <i>in vitro</i> | 57 |
| 4.4. Métodos de detección de vitropatógenos | 59 |
| 4.5. Uso de sustancias antimicrobianas | 60 |
| 4.6. Identificación de microorganismos contaminantes de hongos y bacterias en medio de cultivo con vitroplantas | 61 |
| 4.7. Aspectos a considerar en la contaminación en Laboratorio de Biotecnología Vegetal | 62 |
| 4.8. El laboratorista | 63 |
| 4.9. Los equipos y el instrumental | 63 |
| 4.10. Efecto de las condiciones ambientales y la fisiología de las plantas | 63 |
| 4.11. Eliminación de los contaminantes de los explantes | 64 |
| 4.12. Tratamiento a las plantas madres | 64 |
| 4.13. Desinfección de los explantes | 64 |
| 4.14. Detección de contaminantes latentes | 64 |
| 4.15. Prevención y tratamiento de la contaminación en el laboratorio | 65 |
| 4.16. Pruebas de sensibilidad bacteriana para cultivo de tejidos vegetales | 66 |
| 4.17. Bibliografía | 67 |
| | |
| CAPÍTULO 5. ASEPSIA Y TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN | 69 |
| <i>Margarita Calle, Mario Coca Morante & Gino Aguirre</i> | |
| 5.1. Introducción | 69 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.2. | Fuentes de contaminación | 69 |
| 5.2.1. | <i>Microorganismos del explante</i> | 69 |
| 5.2.2. | <i>Contaminantes introducidos en laboratorio</i> | 70 |
| 5.3. | Prevención de contaminantes de los cultivos | 70 |
| 5.3.1. | <i>Tratamiento de material de origen</i> | 70 |
| 5.3.2. | <i>Esterilización de medios e instrumentos de cultivo</i> | 70 |
| 5.3.3. | <i>Asepsia de personal y ambientes</i> | 70 |
| 5.3.4. | <i>Cultivo de los explantes en cámara de flujo laminar</i> | 71 |
| 5.3.5. | <i>Incubación de los cultivos en cámaras de crecimiento estéril</i> | 71 |
| 5.4. | Técnicas de esterilización | 71 |
| 5.4.1. | <i>Métodos físicos</i> | 71 |
| 5.4.2. | <i>Filtración</i> | 72 |
| 5.4.3. | <i>Rayos Ultravioleta</i> | 72 |
| 5.5. | Medios prácticos para el control de fuentes de contaminación | 75 |
| 5.6. | Bibliografía | 75 |

CAPÍTULO 6. MEDIOS DE CULTIVO **77**

Cecilia Ugarte, Carmen L. Villarroel, Gino Aguirre & María State

| | | |
|---------|---|----|
| 6.1. | Introducción | 77 |
| 6.2. | Composición de los medios de cultivo | 77 |
| 6.2.1. | <i>Sales minerales</i> | 77 |
| 6.2.2. | <i>Reguladores de crecimiento</i> | 78 |
| 6.2.3. | <i>Agentes quelatos</i> | 81 |
| 6.2.4. | <i>Carbohidratos</i> | 81 |
| 6.2.5. | <i>Vitaminas</i> | 81 |
| 6.2.6. | <i>Aminoácidos</i> | 81 |
| 6.2.7. | <i>Potencial osmótico</i> | 82 |
| 6.2.8. | <i>Estabilizadores osmóticos</i> | 82 |
| 6.2.9. | <i>Suplementos no definidos utilizados en la composición de medios de cultivo</i> | 82 |
| 6.2.10. | <i>Carbón activo</i> | 82 |
| 6.2.11. | <i>pH</i> | 83 |
| 6.2.12. | <i>Modificación del Potencial Redox</i> | 83 |
| 6.2.13. | <i>Material de soporte</i> | 83 |
| 6.2.14. | <i>Agua</i> | 84 |
| 6.3. | Preparación de medios de cultivo | 84 |
| 6.3.1. | <i>Conceptos básicos para la preparación de soluciones</i> | 84 |
| 6.3.2. | <i>Precauciones en el laboratorio</i> | 85 |
| 6.3.3. | <i>Preparación de soluciones madre</i> | 85 |
| 6.4. | Preparación del medio de cultivo | 86 |
| 6.4.1. | <i>Ajuste de pH</i> | 86 |
| 6.4.2. | <i>Adición de la fuente de energía</i> | 86 |
| 6.4.3. | <i>Cantidad y distribución del medio</i> | 86 |
| 6.4.4. | <i>Esterilización del medio</i> | 86 |
| 6.4.5. | <i>Vida de anaquel del medio</i> | 86 |
| 6.5. | Bibliografía | 87 |

CAPÍTULO 7. MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS **89**

Carmen L. Villarroel & Ximena Cadima

| | | |
|--------|---|----|
| 7.1. | La propagación vegetativa <i>in vitro</i> | 89 |
| 7.2. | Principales aplicaciones | 90 |
| 7.3. | Tipos de multiplicación <i>in vitro</i> | 90 |
| 7.3.1. | <i>Multiplicación a través de la proliferación de yemas o brotes axilares</i> | 91 |
| 7.3.2. | <i>Multiplicación a través de la inducción de yemas adventicias</i> | 91 |

| | | |
|---|--|------------|
| 7.3.3. | <i>Multiplicación a través de embriogénesis somática</i> | 91 |
| 7.4. | Fases de la micropropagación | 93 |
| 7.4.1. | <i>Fase 1: Establecimiento</i> | 93 |
| 7.4.2. | <i>Fase 2: Multiplicación</i> | 95 |
| 7.4.3. | <i>Fase 3: Enraizamiento</i> | 99 |
| 7.4.4. | <i>Fase 4: Aclimatación</i> | 100 |
| 7.5. | Principales problemas de la micropropagación | 102 |
| 7.5.1. | <i>Contaminaciones fungosas y bacterianas</i> | 102 |
| 7.5.2. | <i>Oxidación fenólica</i> | 103 |
| 7.5.3. | <i>Vitrificaciones</i> | 103 |
| 7.5.4. | <i>Variación somaclonal</i> | 103 |
| 7.5.5. | <i>Otros</i> | 103 |
| 7.6. | Bibliografía | 104 |
| CAPÍTULO 8. LIMPIEZA VIRAL EN ESPECIES VEGETALES | | 107 |
| <i>Gino Aguirre & Mario Coca Morante</i> | | |
| 8.1. | Introducción | 107 |
| 8.2. | Selección del material vegetal a sanear | 108 |
| 8.3. | Técnicas de limpieza viral | 108 |
| 8.3.1. | <i>Cultivo de meristemas</i> | 108 |
| 8.3.1.1. | <i>Distribución de los virus en la planta</i> | 109 |
| 8.3.1.2. | <i>Factores que determinan el cultivo de meristemas</i> | 110 |
| 8.3.1.3. | <i>Fases del cultivo de meristemas</i> | 111 |
| 8.3.1.4. | <i>Aplicaciones del cultivo de meristemas</i> | 113 |
| 8.3.1.5. | <i>Técnicas complementarias al cultivo de meristemas</i> | 113 |
| 8.3.2. | <i>Técnicas avanzadas de diagnóstico de virus</i> | 115 |
| 8.4. | Conclusiones y perspectivas | 115 |
| 8.5. | Bibliografía | 116 |
| CAPÍTULO 9. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y MUTAGÉNESIS | | 117 |
| <i>Juan Villarroel & Nelson Chávez</i> | | |
| 9.1. | Introducción | 117 |
| 9.2. | Multiplicación vegetativa | 117 |
| 9.3. | Morfogénesis | 118 |
| 9.4. | Diferencia entre organogénesis y embriogénesis | 118 |
| 9.5. | Embriogénesis somática | 118 |
| 9.6. | Características de la embriogénesis somática | 118 |
| 9.7. | Embriogénesis somática directa | 119 |
| 9.8. | Embriogénesis somática indirecta | 119 |
| 9.9. | Fases de la Embriogénesis Somática (ES) | 120 |
| 9.10. | Factores que influyen en la embriogénesis somática | 123 |
| 9.11. | Inducción mutagénica | 123 |
| 9.12. | Tipos de Mutaciones | 123 |
| 9.13. | Mutación espontánea e inducida | 124 |
| 9.13.1. | <i>Mutación espontánea</i> | 124 |
| 9.13.2. | <i>Mutación inducida</i> | 124 |
| 9.14. | Niveles mutacionales | 125 |
| 9.14.1. | <i>Mutación génica</i> | 125 |
| 9.14.2. | <i>Mutación cromosómica</i> | 125 |
| 9.14.3. | <i>Mutación genómica</i> | 126 |
| 9.14.4. | <i>Especificidad mutacional</i> | 126 |
| 9.15. | Bibliografía | 126 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 10. CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i> DE ESPECIES VEGETALES | 129 |
| <i>Ximena Cadima & Carmen L. Villarroel</i> | |
| 10.1. Conservación de germoplasma | 129 |
| 10.2. Conservación <i>in vitro</i> | 130 |
| 10.2.1. Definición de conservación <i>in vitro</i> | 131 |
| 10.2.2. Géneros (cultivos) que se pueden conservar <i>in vitro</i> | 131 |
| 10.2.3. Ventajas y limitaciones de la conservación <i>in vitro</i> | 131 |
| 10.2.4. Requerimientos para la conservación <i>in vitro</i> | 132 |
| 10.3. Procedimientos para inhibir o frenar el desarrollo <i>in vitro</i> | 133 |
| 10.3.1. Conservación a corto y mediano plazo | 133 |
| 10.3.2. Conservación a largo plazo | 134 |
| 10.3.3. Ventajas de la conservación <i>in vitro</i> a bajas temperaturas | 134 |
| 10.4. Banco genético <i>in vitro</i> activo | 134 |
| 10.4.1. Etapas para el establecimiento de un banco genético <i>in vitro</i> activo | 134 |
| 10.4.2. Renovación o refrescamiento del material (transferencia a condiciones de crecimiento normal) | 136 |
| 10.4.3. Monitoreo de la estabilidad genética | 136 |
| 10.4.4. Documentación y sistematización de la información | 136 |
| 10.5. Banco genético <i>in vitro</i> básico | 137 |
| 10.5.1. Requisitos para la crioconservación | 137 |
| 10.5.2. Etapas de la crioconservación | 137 |
| 10.6. Conclusiones | 138 |
| 10.7. Bibliografía | 138 |
| | |
| CAPÍTULO 11. LA DIVERSIDAD MICROBIANA Y LOS SERVICIOS AMBIENTALES DE LAS MICORRIZAS A LA AGRICULTURA | 141 |
| <i>Noel Ortuño, Fátima Rojas, Deyby Felipez.</i> | |
| 11.1. Diversidad microbiana del suelo | 141 |
| 11.2. La diversidad micorrizica | 141 |
| 11.2.1. Plantas simbiotas | 142 |
| 11.3. Tipos de micorrizas | 143 |
| 11.4. Sinergismo con otros microorganismos | 145 |
| 11.5. Importancia en la nutrición vegetal | 146 |
| 11.6. Beneficios para la agricultura | 146 |
| 11.6.1. Beneficios de las micorrizas en el crecimiento de las plantas | 146 |
| 11.7. Factores del suelo que afectan el desarrollo de las micorrizas | 148 |
| 11.8. Referencias bibliográficas | 149 |
| | |
| PARTE II. APLICACIONES PRÁCTICAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS <i>IN VITRO</i> | 151 |
| | |
| CAPÍTULO 12. LA APLICACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN LA MULTIPLICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS | 153 |
| <i>Jean Pierre Baudoin</i> | |
| 12.1. Introducción | 153 |
| 12.2. Contribución del cultivo <i>in vitro</i> en la conservación de los recursos fitogenéticos | 154 |
| 12.3. Conservación a corto, mediano y largo plazo | 155 |
| 12.4. Cultivo <i>in vitro</i> de crecimiento lento | 156 |
| 12.5. Criopreservación o suspensión total del crecimiento y metabolismo | 157 |
| 12.6. Integridad y estabilidad en cultivo <i>in vitro</i> | 159 |
| 12.7. Bibliografía | 159 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 13. CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i> Y EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA | 161 |
| <i>Raúl Blas Sevillano, Carmen L. Villaroel & Gino Aguirre</i> | |
| 13.1. Introducción | 161 |
| 13.2. Conservación <i>in vitro</i> de germoplasma | 161 |
| 13.3. Variación somaclonal | 165 |
| 13.4. Estabilidad genética | 166 |
| 13.5. Monitoreo de la estabilidad genética y epigenética | 167 |
| 13.5.1. Marcadores RAPDs | 167 |
| 13.5.2. Marcadores AFLPs | 169 |
| 13.6. Estrategias para reducir variación somaclonal | 171 |
| 13.7. Bibliografía | 172 |
| | |
| CAPÍTULO 14. MICROPROPAGACIÓN DE ACHIRA (<i>CANNA EDULIS</i>) | 173 |
| <i>Eva Dancé Sifuentes, María de Lourdes Tapia & Rosario Lucero</i> | |
| 14.1. Introducción | 173 |
| 14.2. Origen y distribución | 173 |
| 14.3. Taxonomía | 174 |
| 14.4. Morfología | 174 |
| 14.5. Ecología de la achira | 174 |
| 14.6. Usos de la achira | 175 |
| 14.7. Cultivo <i>in vitro</i> de achira | 175 |
| 14.8. Desinfección y establecimiento de los explantes | 176 |
| 14.9. Aclimatación | 177 |
| 14.10. Conservación por crecimiento mínimo | 177 |
| 14.11. Bibliografía | 177 |
| | |
| CAPÍTULO 15. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE PASIFLORAS | 179 |
| <i>Teresa Ávila, Sara de la Barra, Nidia Coca, Noemí Aguilar & Janett Céspedes</i> | |
| 15.1. Introducción | 179 |
| 15.2. Establecimiento <i>in vitro</i> | 180 |
| 15.3. Multiplicación <i>in vitro</i> –micropropagación | 180 |
| 15.4. Aclimatación de las plántulas | 181 |
| 15.5. Conservación <i>in vitro</i> | 182 |
| 15.6. Crioconservación | 183 |
| 15.6.1. Crioconservación de semillas | 183 |
| 15.6.2. Crioconservación de ápices por vitrificación | 183 |
| 15.7. Crioconservación de ápices por encapsulación-desecación | 184 |
| 15.8. Bibliografía | 185 |
| | |
| CAPÍTULO 16. EL CULTIVO <i>IN VITRO</i> EN CHILTO (<i>PHYSALIS PERUVIANA</i>) | 187 |
| <i>Katty Rojas, Gino Aguirre & Ximena Cadima</i> | |
| 16.1. Introducción | 187 |
| 16.2. Descripción taxonómica y morfológica de uchuva <i>Physalis peruviana</i> | 187 |
| 16.3. Distribución geográfica de <i>P. peruviana</i> | 189 |
| 16.4. Uso e importancia económica de <i>P. peruviana</i> | 189 |
| 16.5. Propagación | 189 |
| 16.5.1. Reproducción Sexual | 189 |
| 16.5.2. Reproducción asexual | 190 |
| 16.6. Conservación <i>in vitro</i> de Germoplasma | 190 |
| 16.7. Multiplicación <i>in vitro</i> | 193 |
| 16.8. Bibliografía | 194 |

| | |
|---|------------|
| CAPÍTULO 17. LA APLICACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN ESPECIES FORESTALES ANDINAS KEWIÑA (<i>POLYLEPIS BESSERI</i> HIERON) | 197 |
| <i>Cecilia Ugarte</i> | |
| 17.1. Introducción | 197 |
| 17.2. Información general y descripción de kewiña | 197 |
| 17.2.1. Descripción taxonómica | 197 |
| 17.2.2. Descripción morfológica | 198 |
| 17.3. Micropropagación | 199 |
| 17.3.1. Recolección de material vegetal | 199 |
| 17.3.2. Desinfección y establecimiento | 199 |
| 17.3.3. Multiplicación y enraizamiento | 199 |
| 17.4. Bibliografía | 200 |
| | |
| CAPÍTULO 18. MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> DE ORQUÍDEAS NATIVAS BOLIVIANAS | 201 |
| <i>Claudio Vázquez, Gino Aguirre, Cecilia Ugarte, Juan Villarroel & Jazmín Yamashiro</i> | |
| 18.1. Introducción | 201 |
| 18.2. Orquídeas endémicas de Bolivia | 201 |
| 18.3. Orquídeas nativas de Bolivia | 202 |
| 18.3.1. <i>Epidendrum</i> ssp. | 203 |
| 18.3.2. <i>Huntleya meleagris</i> | 203 |
| 18.4. Las orquídeas en Bolivia. Importancia y conservación | 204 |
| 18.4.1. Importancia biológica | 204 |
| 18.4.2. Importancia de la conservación de germoplasma | 204 |
| 18.5. Procedimiento para el establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de orquídeas (<i>Góngora ileniana</i> , <i>Epidendrum</i> ssp. y <i>Huntleya meleagris</i>) mediante protocormos | 205 |
| 18.5.1. Zona de recolección del material vegetal | 205 |
| 18.5.2. Método de secado y almacenamiento | 206 |
| 18.5.3. Fases para la multiplicación <i>in vitro</i> de orquídeas | 206 |
| 18.6. Conclusiones y perspectivas | 212 |
| 18.7. Bibliografía | 212 |
| | |
| CAPÍTULO 19. ELEMENTOS PRÁCTICOS DE ESTADÍSTICA Y DISEÑO EXPERIMENTAL PARA INVESTIGACIÓN EN CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TEJIDOS VEGETALES | 215 |
| <i>Sergio Daniel Moreira Ascarrunz Ph.D.</i> | |
| 19.1. Introducción | 215 |
| 19.2. Prácticas asociadas a la investigación científica | 215 |
| 19.2.1. Establecimiento de la hipótesis y de los objetivos experimentales | 215 |
| 19.2.2. Selección del diseño experimental | 216 |
| 19.2.2.1. Tratamientos, factores y niveles | 216 |
| 19.2.2.2. Unidades Experimentales y unidades observacionales | 216 |
| 19.2.2.3. Diseños experimentales | 217 |
| 19.3. Submuestreo | 219 |
| 19.4. Repetibilidad | 219 |
| 19.4.1. Selección de datos y planificación del análisis estadístico | 220 |
| 19.4.2. Conducción del experimento | 221 |
| 19.4.3. Toma de datos | 221 |
| 19.5. Análisis e interpretación de datos | 222 |
| 19.5.1. Análisis de datos continuos | 222 |
| 19.5.2. Análisis de datos de conteo | 223 |
| 19.5.3. Análisis de datos binomiales | 223 |
| 19.5.4. Análisis de experimentos con sub muestreo | 224 |
| 19.6. Métodos de comparación de medias | 224 |
| 19.6.1. Error estándar de la media (EEM) | 225 |

| | |
|--|-----|
| 19.6.2. Pruebas comparación múltiple y pruebas de rango múltiple | 225 |
| 19.6.3. Contrastes ortogonales | 227 |
| 19.6.4. Análisis de tendencias | 227 |
| 19.7. Conclusiones | 228 |
| 19.8. Referencias | 228 |

| | |
|---------------|------------|
| ANEXOS | 229 |
| Anexo I | 231 |
| Anexo II | 236 |
| Anexo III | 238 |

I PARTE



FUNDAMENTOS TEÓRICO PRÁCTICOS DEL CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO*



Capítulo 1

Aspectos Generales del Cultivo *in vitro*

Gino Aguirre, Margarita Calle & Jean Pierre Baudoin

1.1. INTRODUCCIÓN

Como toda técnica científica, el cultivo *in vitro* de explantes vegetales es el resultado de innovaciones, observaciones y experimentaciones que han permitido acumular conocimientos cada vez más profundos, constituyéndose en una valiosa fuente de progreso (Seilleur, 1989).

Ovando (2004) define al cultivo de tejidos vegetales como una herramienta de la biotecnología vegetal que aísla partes de una planta y las hace crecer en un medio de cultivo artificial *in vitro* en condiciones de asepsia para obtener metabolitos, tejidos, órganos o plantas completas. El mismo autor menciona que el concepto ***in vitro***, presente en casi todos los reportes de biotecnología de plantas, es una forma de indicar que las plantas o partes de plantas estudiadas fueron cultivadas dentro de un contenedor de vidrio (del latín *in*: dentro, *vitro*: vidrio), es decir, en un frasco de vidrio, en una placa Petri, en un matraz Erlenmeyer, etc. La utilización del término ayuda a entender que las plantas no fueron estudiadas en la naturaleza o en el campo, para lo cual se utiliza el término *in situ* (en el sitio).

Es así que los orígenes del cultivo de tejidos *in vitro*, se remontan a principios del siglo XX, cuando Haberlandt percibe el concepto de

sustancias de crecimiento al intentar cultivar células aisladas de plantas, postulando así el principio de la totipotencia vegetal, que se refiere a la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa bajo ciertas condiciones químicas y físicas a partir de cualquier parte aislada de la planta, misma que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas de cultivo *in vitro* actuales.

White en 1934 logra el crecimiento continuo de raíces de tomate en un medio rico en sales minerales y vitaminas del grupo B. Por otro lado, Gautheret en 1939 establece en cortes de zanahoria el primer cultivo a crecimiento continuo.

En la década del 50 estuvieron disponibles los conocimientos sobre los reguladores de crecimiento y los medios de cultivo que hicieron posible el rápido desarrollo de estas herramientas. Es así que Miller y sus colaboradores, en 1955, separan la kinetina cuya función en la inducción de las divisiones celulares ya era conocida.

Morel y Martin en 1952 inician el cultivo de meristemas, regenerando plantas libres de virus a partir de dalias virósicas.

Murashige y Skoog en los años 60 contribuyen a popularizar las técnicas del cultivo *in vitro* desarrollando métodos que han permi-

tido la propagación de diversas especies vegetales.

Carlson en 1972 inicia la fusión de protoplastos obteniendo el primer híbrido interéspecífico en el género *Nicotiana*.

Lepoivre y Quoirin, en 1977 difunden un medio de cultivo para el cultivo de *Prunus*.

Boxus en los años 80 impulsa la propagación masiva de frutilla con resultados muy halagadores en condiciones de campo, aspecto que fundamenta aún más el aporte de la propagación masiva a la agricultura.

A partir de los avances alcanzados en la regeneración de plantas *in vitro* se ha desarrollado toda una industria de micro propagación que se inició 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, Jiménez & Agramonte, 1998).

En la actualidad, el uso de técnicas como el sistema de inmersión temporal desarrollado en Francia y en Cuba y utilizado en diversos países, como en la UNALM en el Perú, ha permitido elevar las tasas de multiplicación de manera significativa, misma que se incrementa aún más si es suplementada con el uso de diferentes inhibidores de la síntesis de las giberelinas.

El cultivo *in vitro* es un método considerado rutinario en la propagación vegetativa, el cual permite la disponibilidad de un gran número de plantas en tiempos relativamente reducidos. Este proceso ha salido de la investigación y permite trabajar apoyando el progresivo desarrollo del productor. Por este método cualquier planta iniciada a partir de un tejido puede ser cultivada, si se ha desarrollado la fórmula correcta y los procesos para su cultivo (Kyte, 1987).

Algunos autores definen al cultivo de tejidos *in vitro* como una tecnología con facilidades de

producción y propagación de plantas útiles en la agricultura. Comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante o parte separada de un vegetal (por ejemplo: célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones controladas, debido a que éstas tienen células totipotenciales.

Ashmore (1997), indica que los cultivos *in vitro* ofrecen la oportunidad para la propagación, almacenamiento y distribución de germoplasma sano. En Bolivia, Cadima *et al.* (1996), establecen las pautas para iniciar en el país la conservación a mediano plazo de tubérculos andinos; posteriormente, Coca *et al.* (2004), Morales *et al.* (2004) y Vázquez *et al.* (2006) utilizan las técnicas *in vitro* para la recuperación de diferentes especies, incluyendo pasifloras y orquídeas, muchas de ellas endémicas de Bolivia.

En la actualidad, las técnicas de cultivo *in vitro* constituyen uno de los métodos biotecnológicos que han aportado al desarrollo de una nueva agricultura, basándose en la ya mencionada totipotencialidad celular, sean tejidos, ápices meristemáticos e incluso células aisladas, genéticamente idénticas a la planta madre en un periodo corto con el objetivo de multiplicar, mejorar y conservar a mediano y largo plazo diferentes especies como hortalizas, frutales, ornamentales y forestales de interés alimenticio, medicinal y/o económico para el ser humano.

Asimismo, su contribución como herramienta en la conservación de germoplasma es innegable, al permitir conservar a mediano o largo plazo, y en espacios reducidos y exentos de patógenos, un sinnúmero de entradas, precautelando de esta manera los recursos fitogenéticos, contribuyendo a la seguridad alimentaria de las poblaciones y favoreciendo a la revalorización de especies nativas en riesgo de pérdida definitiva (Iriarte *et al.*, 1998).

1.2. PRINCIPIOS BOTÁNICOS PARA EL CULTIVO *IN VITRO*

La multiplicación asexual o vegetativa ocurriéndose fue dando naturalmente o a través de la intervención humana, y se ha ido especializando en invernaderos y viveros. El procedimiento de propagación vegetativa en la mayoría de los casos es a partir de cortes de tallos, raíces y hojas (Kyte, 1987).

Los tallos, porción de las plantas vasculares con hojas y yemas, tienen el potencial para la regeneración de plantas. Hay tallos subterráneos, como el rizoma del lirio o los estolones de fresa; el tubérculo de la papa y de otros tubérculos andinos como la oca, papalisa e isaño o cormos¹¹ que sirven como estructuras en la reproducción vegetativa.

Las raíces son órganos de las plantas superiores, casi siempre subterráneas, que tienen funciones de absorber, conducir agua, minerales disueltos, acumular nutrientes y fijar la planta firmemente en la tierra. También ellas sirven como estructuras reproductoras vegetativas, por ejemplo en manzano y rosa.

Las hojas son los principales órganos fotosintéticos de la gran mayoría de plantas. Bajo determinadas condiciones, pueden producir nuevas plantas a partir de cortes de las hojas, por ejemplo en begonia, tuna o violeta africana. En algunos casos, crecen de las hojas nuevas plantas sin estar separadas de la planta materna.

La multiplicación *in vitro* de plantas no crea nuevos procesos de crecimiento, simplemente dirige y ayuda al potencial natural de la planta para regenerar y multiplicar de una manera muy eficaz y predecible, en contraste con la propagación vegetativa convencional que requiere más espacio y más tiempo en la producción de plantas. A continuación describiremos algunos métodos de regeneración del cultivo *in vitro* y las aplicaciones de las mismas.

1.3. MÉTODOS DE REGENERACIÓN *IN VITRO*

Los métodos de regeneración *in vitro* son:

1.3.1. Cultivo de órganos

La organogénesis es un evento morfogénico que se caracteriza por el desarrollo en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente enraizados. Los brotes pueden formarse a partir del explante o callo (Pérez, Jiménez y Agramonte, 1998).

1.3.2. Explantes primarios

Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos (Roca & Mroginski, 1991). En estos fragmentos de tejidos o de órganos proliferan las células de acuerdo al medio de cultivo utilizado.

1.3.3. Cultivo celular

Supone previamente una disgregación celular, ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar en un medio de cultivo adecuado. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento. Este tipo de cultivo, aplicado al mejoramiento de plantas, permite superar incompatibilidades sexuales en la cruce p. e. entre *S. acaule* y *S. andigenum* al realizar fusiones protoplásmicas, obteniendo de esta manera híbridos interespecíficos.

¹¹ Tallos modificados.

1.4. VENTAJAS DEL CULTIVO *IN VITRO*

En comparación con los sistemas convencionales, la mayoría de los autores coinciden en que 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 con respecto a los sistemas tradicionales.
- Mejor control sobre la sanidad del material vegetal que propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existen pocos individuos.
- Propagación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales.
- Posibilidad de conservar germoplasma a mediano y largo plazo.

1.5. LIMITACIONES DEL CULTIVO *IN VITRO*

- Estabilidad genética débil en algunos sistemas de propagación *in vitro*.
- Aclimatación de las plántulas, como un proceso difícil con mayores probabilidades de pérdidas en esta etapa.
- Poca respuesta inicial de algunas especies y genotipos.
- Alto costo de establecimiento de un laboratorio, lo que incide indirectamente en el precio final de la planta producida.
- Alto costo de los reactivos, aspecto que influye incluso en el desarrollo de la investigación en esta área.
- Necesidad de mano de obra especializada.
- Alta dependencia de energía eléctrica.

1.6. APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS

Pierik (1987) y Roca & Mroginski (1991), mencionan que los objetivos perseguidos por el cultivo de tejidos vegetales son numerosos y brevemente describen las posibilidades de aplicación de tales objetivos de la siguiente manera:

- Estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal.
- Propagación masiva de plantas utilizando las técnicas de germinación de semillas, cultivo de ápices, cultivo de nudos e inducción de brotes, microinjertación.
- Establecimiento y/o mantenimiento de plantas libres de virus y patógenos mediante la utilización del cultivo de meristemas, como componente inicial de cualquier programa nacional de certificación de semilla.
- Conservación de germoplasma, para lo cual se utilizan las técnicas de: microtuburización, crioconservación y crecimiento mínimo.
- Mejoramiento genético mediante la aplicación individual o conjunta de técnicas de: cultivo de embriones, cultivo de anteras, variación somaclonal, cultivo de callos, cultivo de suspensiones celulares, fusión de protoplastos y como herramienta en la ingeniería genética (transformaciones o transferencia de genes).

Fruto de la experiencia boliviana “en terreno”, una de las más interesantes aplicaciones del cultivo de tejidos en el componente de la conservación y uso de los recursos fitogenéticos es su contribución a la revalorización y/o recuperación de especies nativas, dado que permite inicialmente una multiplicación masiva y favorece a la redistribución de estas especies con el aditamento de ser materiales sanos y de identidad genética conocida.

1.7. BIBLIOGRAFÍA

- Ashmore S.E. 1997. *Status report on the development and application and use of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources*. Rome, Italy. IPGRI, pp. 67.
- Berthouly M. & Ethiene H. 2005. *Temporary immersion System: a new concept for use liquid medium in mass propagation*. In: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer. Netherlands, pp. 165 – 195.
- Cadima X.; Aguirre G. & Villarroel C. 1996. *Conservación in vitro a mediano plazo de papa (Solanum spp.)*. IV Reunión Nacional de la Papa. Cochabamba, Bolivia.
- Coca, N., Ávila, T., Guzmán, L. 2004. *La conservación in vitro como una alternativa para las pasifloras andinas*. IV Reunión Nacional de Biotecnología. Santa Cruz, Bolivia.
- Iriarte V.; Badani A.; Villarroel C.; Aguirre G. & Fernández E. 1998. *Priorización, Limpieza viral, Producción y Devolución de Cultivares Nativos de papa Libres de Virus a sus zonas de origen*. Revista Latinoamericana de la Papa 2000 - 2001. Vol 12. pp. 73 – 95.
- Jiménez G.E. 1998. *Generalidades del cultivo in vitro*. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Juan N. Pérez (ed.). Las villas, Cuba, ed. GEO, pp. 14-17.
- Kyte L. 1987. *Plants from test tubes: An introduction to micropropagation*. Hong Kong, Lehmann, Timber Press, Inc., pp. 160.
- Mejia, R. s/f. *Alternativas de Equipamiento de laboratorio in vitro y técnicas de Micropropagación de Plantas*. Dirección de Comunicación Técnica INIA, UNALM. Lima, Perú, pp. 100.
- Morales, I., Penacho, E., Quispe, F., Nogales, S. 2004. *Producción in vitro y conservación de las orquídeas en Bolivia*. IV Reunión Nacional de biotecnología, Santa Cruz, Bolivia.
- Ovando, M.I. 2004. "Manual de Cultivo de Tejidos Vegetales para Ingenieros Biotecnólogos". Consulta: 19 enero 2009: En: <http://exa.unne.edu.ar/depar/areas/biologia/fisiologia.vegetal/public-htm/>
- Pérez, J. Jiménez, E. Agramante, D. 1998. *Aumento de la eficiencia en la micropropagación*. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Juan N. Pérez (ed.). Las villas, Cuba, ed. GEO. pp. 179 - 191.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht, Boston, Martinus Nyghof. pp. 344.
- Roca W. M. & Mroginski A.L. 1991. *Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales*. Mroginski, A.L., Roca, W. M. (ed.) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia. Ed CIAT, pp. 1-12.
- Seilleur, P. 1989. *Culture in vitro d explants vegetaux*. Faculté des Sciences Agronomiques del' Etat. Bélgica, pp. 132.
- Vázquez, C.; Villarroel, J.; Ugarte, C. & Aguirre G. 2006. *Multiplificación in vitro mediante protocolos de orquídeas nativas (Epidendrum spp., Gongora ileniana, Huntleya meleagris), del distrito biogeográfico del Chapare (Cochabamba)*. 2007. II Feria de Ciencia y Tecnología USFX Sucre, Bolivia, pp. 98.

Capítulo 2

Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos

Gino Aguirre & Margarita Calle

2.1. INTRODUCCIÓN

La decisión de establecer un laboratorio de cultivo de tejidos debe responder a los propósitos del mismo, ya sea de enseñanza, de investigación o de producción; requiere además de un análisis crítico previo acerca de las necesidades, objetivos, proyecciones, recursos humanos y capacidades financieras, dentro de un contexto integral enfocado hacia el desarrollo de la investigación como base para la producción agrícola. Las limitadas capacidades financieras de nuestros centros de investigación deben ser optimizadas adecuadamente, sin necesidad de construir complejos laboratorios muy ambiciosos cuyo uso es mínimo, ni tampoco estableciendo laboratorios exageradamente simples sin proyección alguna.

2.2. LOCALIZACIÓN DE UN LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS

La ubicación de un laboratorio debe realizarse en lo posible lejos de potenciales fuentes de contaminación, como es el caso de zonas contaminadas tanto en agua como en aire, lejos de granjas, porquerizas o establos o de zonas de reciclaje de residuos. Se debe tomar en cuenta variadas medidas de asepsia si la instalación se ubica cerca de laboratorios de

patología (entomología, bacteriología, virología), ahí normalmente se trabaja con muestras enfermas para prevenir posibles fuentes de contaminación.

Si el laboratorio es nuevo, para la localización debe tomarse en cuenta la topografía del terreno, la facilidad de acceso, la infraestructura circundante, las zonas susceptibles a inundaciones y la posibilidad de ampliar áreas complementarias al laboratorio como el área de aclimatación y de invernaderos.

En la repartición de las áreas de un laboratorio es importante separar el área administrativa del área de laboratorios. En relación a los servicios de agua, teléfono, energía eléctrica, gas, acceso a Internet, servicios de correo y otros, es imprescindible contar con los mismos. En pleno siglo XXI, cuando es posible contar con plantas *in vitro* provenientes de Europa, Africa o Asia en menos de 60 horas, el establecer un laboratorio en zonas alejadas, con abastecimiento irregular de energía eléctrica, con clima excesivamente húmedo y caluroso, no es del todo justificado al significar un mayor costo en su mantenimiento y un mayor riesgo a contaminaciones bacterianas y fúngicas.

2.3. ORGANIZACIÓN DE UN LABORATORIO

Varios autores, Biondi & Thorpe (1981), Merino (1987), Pierik (1987), Boccon (1989) y Roca & Mroginsky (1991), mencionan la organización de un laboratorio de acuerdo a la secuencia de las fases del cultivo *in vitro* y a la facilidad en el manejo de los cultivos en cuestión a la asepsia. A continuación se hace la descripción de las áreas más importantes de un laboratorio:

2.3.1. Antesala o vestíbulo

Parte principal de entrada a un laboratorio donde se encuentran percheros y gabinetes para guardar ropa de calle. En esta área el personal debe cambiar su ropa de calle por guardapolvos y zapatos de uso exclusivo en laboratorio. En laboratorios de enseñanza es importante que esta área cuente con casilleros individuales para que los estudiantes guarden su ropa de laboratorio y utensilios más importantes como pinzas, escalpelos, marcadores, cuadernos de notas y otros. En laboratorios de mayor magnitud esta área consiste en toda una infraestructura que contempla duchas y áreas de aseo para el personal.

2.3.2. Área de oficina

Contempla el equipo y mobiliario de oficina como teléfono, fax, computadoras, fotocopiadora y escritorios, archivos y almacenamiento de datos, libros de referencia, catálogos y otros documentos. En esta área es conveniente incluir una biblioteca especializada, ambientes para los estudiantes o investigadores y en lo posible contar con una sala destinada a reuniones.

2.3.3. Área de lavado y esterilización

Puede estar constituida por dos áreas conectadas entre sí, o por un sólo ambiente. En esta área se lleva a cabo el lavado de todo



Área de lavado. Laboratorio de Biotecnología, FCAPFyV.

el equipo de vidrio y el acondicionamiento del material vegetal previo al establecimiento *in vitro*. El área de lavado requiere poseer una instalación eléctrica de 220V con varias tomas; el equipo con corriente a 110V, debido a su voltaje diferente debe ser visiblemente identificado.

El lavadero debe ser lo necesariamente grande; con agua caliente y fría y con sus respectivos escurrideros; requiere contar con una fuente de agua destilada para el enjuague correspondiente del material lavado. Para garantizar la provisión constante de agua de alta calidad, es imprescindible tener un destilador, en lo posible con condensador de vidrio y un desionizador de agua colocado entre el destilador y el lavadero.

Esta área debe disponer de gabinetes para el material de vidrio; de preferencia con puertas, para evitar que se llenen de polvo y un espacio para almacenar agua destilada en botellas de plástico; también debe contar con recipientes para residuos adecuados para el material orgánico, inorgánico, de plástico y de vidrio que se deseche.

En el área de esterilización se ubica la autoclave para esterilizar tanto el medio de cultivo como el material y los tubos y frascos con material contaminado. Además debe incluir un espacio para las estufas u otro equipo de esterilización con calor seco.

2.3.4. Área de preparación de medios

Esta área se utiliza principalmente para preparar los diversos medios de cultivo que serán utilizados en las diferentes fases de desarrollo de los cultivos. Esta área debe contar con recipientes con agua destilada y desionizada y debe tener varias tomas de electricidad para el equipo existente (balanzas, pHmetro, refrigeradores, agitadores, horno microondas y otros).



Área de preparación de medios. Laboratorio de Biotecnología, FCAPFyV.

El equipamiento mínimo consta de: el área de preparación de medios, que debe contar con mesas de trabajo separadas, adecuadas para la preparación, ubicar las balanzas analítica y de precisión, para el medidor de pH, los platos con agitación, y otros elementos. También debe incluir vitrinas, estanterías y espacio para los refrigeradores y el horno microondas. Además debe tener estantes destinados para almacenar materiales de vidrio o de plástico y para almacenar los reactivos químicos que puedan ser conservados a temperatura ambiente.

2.3.5. Área de repicaje o siembra

En esta área del laboratorio se realiza el trabajo de introducción o establecimiento a condiciones *in vitro*, escisión o aislamiento, inoculación y transferencia de los explantes a

los medios de cultivo. Esta área debe estar lo suficientemente aislada para evitar fuentes de contaminación externas, debe contar con varias tomas de electricidad (220V) para el equipo existente.

El equipamiento mínimo consta de: cámaras de flujo laminar horizontal o vertical de aire filtrado bajo presión, estereoscopios para la escisión de meristemas, equipos para el filtrado de medios de cultivo, gabinetes para guardar desinfectantes, alcohol, medios de cultivo e instrumentos estériles. El personal debe trabajar en este ambiente aséptico con mucha pulcritud, utilizando barbijos y gorras (Roca & Mroginski, 1991). Asimismo, el sistema de apertura de puertas, debe contar con gomas sellantes para evitar corrientes de aire.



Área de siembra. Laboratorio de Biotecnología, FCAPFyV.

Los principios de trabajo de una cabina de flujo laminar, son bastante simples: un extractor de aire atrae el aire de la habitación a la unidad, a través de un filtro que elimina las partículas en suspensión más grandes; el aire pasa a través de una cámara de presión, en la que acumula suficiente presión para que sea expedido a la velocidad deseada. Ese aire pasa a través de un filtro HEPA, que no permite pasar partículas mayores a 0,2 micras y

proporciona corrientes paralelas constantes en la zona de trabajo, (FUDESA¹², 1999), brindando de esa manera un área libre de potenciales contaminantes. La cámara, puede disponer de elementos accesorios como: fuente de luz, lámpara de esterilización U.V., contador de horas de funcionamiento, indicador de presión interior y otros.

Su función es la de mantener un área libre de partículas, especialmente de posibles contaminantes como bacterias, levaduras y hongos que puedan acceder al cultivo. Las cabinas de flujo laminar deben ubicarse en un lugar alejado de puertas y con un mínimo de corriente de aire con el fin de prolongar la vida útil de los filtros y de garantizar una mínima contaminación en el trabajo.

Los estantes en la cámara de crecimiento pueden ser de dimensiones variables, ancho entre 0,30 m y no mayores a 1,00 m; largo de acuerdo a las dimensiones del ambiente, con una altura total de 1,80 a 2,20 m; la distancia entre estantes es de 0,20 a 0,50 m de acuerdo a la ubicación de las fuentes de luz.

2.3.6. Área de crecimiento

El área de crecimiento o incubación de los explantes *in vitro* debe contar con un buen control de temperatura de acuerdo al tipo de plantas, sean éstas de clima templado o tropical, de iluminación variable según las necesidades y con un fotoperíodo controlado. Estas condiciones se logran incorporando sistemas de aire acondicionado en las cámaras de crecimiento, una buena y uniforme circulación de aire en el interior, dotados de un buen sistema de alarma para interrumpir la iluminación en caso de no funcionar el aire acondicionado (Mroginski *et al.*, 2004).

La colocación de los estantes obedece a brindar las mejores condiciones de luminosidad a las plantas, con dimensiones y altura

¹²FUDESA: Fundación para el desarrollo de la Esterilización en la Argentina. www.drwebsa.com.ar/fudesa



Área de crecimiento. Laboratorio de Biotecnología, FCAPFyV.

fáciles de manejar y de variar. Es posible construir los estantes con base de vidrio o de rejilla metálica para facilitar el paso de luz. Cuando se usa tubos fluorescentes, éstos emiten calor, tanto que el cuarto de cultivo necesita ser enfriado. El control de la temperatura se logra con la ayuda del termostato conectado al aire acondicionado (Pierik, 1987). El suministro de energía de cada estante debe estar individualizado, de manera que sea posible interrumpir el suministro de luz en estantes libres o vacíos. Es importante ubicar las reactancias de los tubos fluorescentes fuera del área de crecimiento para no sobrecargar el sistema de aire acondicionado en el mismo ambiente.

La intensidad luminosa en las salas de crecimiento habitualmente varía de 5 a 25 W/m² (1.000 a 5.000 lux) a veces se puede incrementar la intensidad luminosa en la fase III para ayudar a fortificar y preparar a la planta para transferir al suelo; el foto período generalmente es de 16 h/luz. La calidad de la iluminación es dada por tubos fluorescentes blanco brillante o Gro lux generalmente. La temperatura en las salas de crecimiento es constante de 22-25°C en muchas especies. Sin embargo, existe variación en especies de clima templado de 20±1°C y en especies tropicales de 28±1°C (Boccon, 1989).

El control de la temperatura para que se desarrolle el cultivo *in vitro* se efectúa me-

diante un sistema de refrigeración-calefacción controlado a través de un termostato. La homogeneidad de la temperatura se puede lograr haciendo circular el aire dentro de la cámara mediante un sistema de ventilación (Pelacho & Closas, 2004). En cualquier caso, es necesario tomar precauciones para evitar el calentamiento excesivo, instalando alarmas y controles para cortar la iluminación cuando falle el aire acondicionado. Esta área debe incluir, además, un espacio para cultivos en agitación (células en suspensión) y para cultivos estáticos que requieren previo tratamiento en oscuridad.

2.3.7. Áreas de observación y examen

Las áreas de observación están consideradas en función a la actividad que se realiza en el laboratorio (Roca & Mroginski, 1991). Generalmente los microscopios, estereoscopios, compuesto, invertido y otros, se localizan tanto en el área de crecimiento como en el de siembra, pero pueden estar en áreas separadas. El objetivo de esta área es realizar observaciones periódicas de los cultivos, tanto en medios semisólidos como en líquidos.

2.3.8. Área destinada a la cámara de termoterapia

Esta área es imprescindible en un laboratorio que utiliza técnicas para la obtención de plantas libres de virus; debe estar ubicada cerca al área de siembra y, en lo posible, debe estar destinada exclusivamente para plantas ya establecidas *in vitro*, debido a que el manejo de plantas en maceta, en este tipo de cámaras, demanda un mayor espacio y un mayor equipamiento. Dada la necesidad de las plantas en maceta de requerir una alta humedad relativa para poder soportar temperaturas de 36°C, es imprescindible incorporar en este caso de un medidor de humedad conectado a un humidistato, que permita regular la humedad ambiente a un mínimo del 80%.

2.3.9. Áreas de cuarentena y control fitosanitario

Cuando la función del laboratorio es la producción de materiales élite de sanidad certificada, se hace necesario contar con un área para la recepción de las muestras o plantas destinadas a la limpieza clonal, generalmente protegida contra insectos. Esta área de cuarentena debe estar separada del resto del laboratorio pero cercana al área de control fitosanitario.

2.3.10. Áreas frías

Son áreas destinadas al almacenamiento de los medios de cultivo que va generalmente de 4°C a -20°C. En laboratorios pequeños pueden ser reemplazadas por refrigeradores y congeladores ubicados en el área de siembra.

2.3.11. Almacén

Esta área debe comprender un cuarto suficientemente grande para el almacenamiento de productos químicos, cristalería y otros artículos de repuesto en una cantidad suficiente para prevenir cualquier retraso en las entregas del suministro. Los reactivos deben estar almacenados ya sea a temperatura ambiente o entre 4°C de acuerdo a los requerimientos de cada caso, mismos que están indicados en su etiqueta (Jona & Menine, 1987 y Boccon, 1989).

2.3.12. Invernaderos y áreas de aclimatación

Son muy importantes las condiciones de los invernaderos a los cuales se van a transferir las plantas provenientes del laboratorio, pues si no existen las mínimas facilidades para aclimatar las plántulas, además de un buen manejo, éstas se pueden recontaminar, sufrir pérdidas por deshidratación, o daños por insectos, roedores y otros. Lo adecuado e indispensable es contar con un ambiente de ingre-

so previo al invernadero, un control de humedad adecuado, pisos de concreto, la estructura con mallas anti áfidos, sistema de nebulización, áreas de almacenamiento para los implementos del invernadero, mezclas de sustratos desinfectados, sistema de desinfección de sustratos.

2.4. EQUIPOS Y MATERIALES

En el cuadro 1 se presentan los equipos y materiales necesarios según Pierik (1987), Merino (1987), Roca & Mroginski (1991), de acuerdo a las áreas y en base a la experiencia en los laboratorios locales:

Cuadro 1. Áreas, equipos y materiales de laboratorio

| Áreas de laboratorio | Equipos más recomendados | Materiales necesarios |
|---------------------------------|---|--|
| Área de lavado y esterilización | <ul style="list-style-type: none"> • Destilador de agua con condensador de vidrio. • Desionizador de agua. • Autoclave para la esterilización por vapor de sólidos y líquidos. • Estufa a calor seco para la esterilización de cristalería, pinzas, escalpelos y otros. | <ul style="list-style-type: none"> • Detergentes. • Esponjas de lavado. • Colas de zorro de diferentes dimensiones. • Recipientes de almacenamiento para agua destilada y/o desionizada. • Recipientes para eliminación de residuos de laboratorio. |
| Área de preparación de medios | <ul style="list-style-type: none"> • Balanzas de 0,1 gr y 0,1 mg de precisión. • Refrigerador y congelador. • Agitadores magnéticos. • Estufa agitadora. • Horno micro ondas. • pHmetro. | <ul style="list-style-type: none"> • Bandejas de plástico para transporte. • Gradillas autoclavables para tubos de ensayo. • Dosificador automático de medios de cultivo. • Probetas de diferentes volúmenes. • Pipetores y pisetas. • Cuadernos de registro. • Jeringas desechables. |
| Área de siembra | <ul style="list-style-type: none"> • Cámara de flujo laminar. • Microscopio. • Estereoscopio. • Cronómetros. • Contador de células. | <ul style="list-style-type: none"> • Estuche de disección. • Bisturís. • Navaja. • Tijeras. • Pinzas. • Lámpara de alcohol. |
| Área de crecimiento | <ul style="list-style-type: none"> • Agitadores de medios de cultivo en suspensión. • Estanterías para incubación. • Sistema de programación horaria. • Acondicionador de aire. | <ul style="list-style-type: none"> • Frascos de diferentes dimensiones para cultivo de explantes. • Tubos de neón y reactancias |
| Área de aclimatación | <ul style="list-style-type: none"> • Caldero a vapor. • Sistema de riego por nebulización. • Bomba de agua. | <ul style="list-style-type: none"> • Mallas semisombra. • Cajas de cultivo. • Maceteros. • Mesones. • Cámaras de aclimatación. • Detergentes. • Mangueras de riego. • Sustratos. |

2.5. MEDIDAS DE SEGURIDAD DEL PERSONAL

Una de las primeras medidas de seguridad para el personal es el de facilitarles el desempeño en el laboratorio mediante una adecuada señalización en cada una de sus áreas, incorporando en lugares visibles explicaciones sobre el funcionamiento de los diferentes equipos de manera que el personal nuevo no intente “descubrir” el manejo de éstos. Estas señalizaciones, incluyendo las normas mínimas de desempeño en laboratorio, son también un valioso instrumento de orientación y guía para visitantes o estudiantes debutantes en laboratorio.

Asimismo, la seguridad física del personal del laboratorio es sumamente importante; por esta razón se deben tomar todas las precauciones necesarias para ubicar estratégicamente en el laboratorio equipos de primeros auxilios, extintores de incendios y frazadas contra fuego, así como duchas para baños del cuerpo entero y de los ojos (Roca & Mroginski, 1991).

Es recomendable establecer reuniones informativas al inicio de cada gestión, en donde se analicen y socialicen las medidas de seguridad en caso de riesgo.

2.6. BIBLIOGRAFÍA

- Biondi S. & Thorpe T.A. 1981. *Requirements for a tissue culture facilities. In Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture.* California, USA Ed. Academic Press; Inc (London) Ltd., pp. 2-3.
- Boccon G.J. 1989. *La technologie de la culture in vitro. La culture in vitro et ses applications horticoles.* Ed. H. Vidalie. 3 ed. Paris, Francia, Jb. Bailliee, pp. 31-46.
- Dodds J.H. & Roberts, L.W. 1985. *Experiments in plant tissue culture.* 2^{da} ed. New York, USA, Syndicate of the University Press, Cambridge, pp. 21-33.
- FUDESA. 1999. “FUDESA Fundación para el desarrollo de la Esterilización en la Argentina”. Consultado 14 de abril 2009. En: http://www.drwebsa.com.ar/fudesa/info_10.htm
- Jona R. & Menine U.G. 1987. *Tissue culture of selected tropical fruits.* Italia, Roma. FAO, pp. 103.
- Kyte L. 1987. *Plants from test tubes: An introduction to micropropagation.* Hong Kong, Lehmann, Timber Press, Inc., pp. 160.
- Merino M.M. 1987. *Consideraciones generales que deben tomarse en la plantación de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.* Daniel, Hurtado; y Maria E. Merino Manzanares. Cultivo de tejidos vegetales. México DF., ed. Trillas, pp. 35-43.
- Mroginski et al. 2004. “Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales (Capítulo II)”. Consultado 14 de abril 2009. En: http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap2.pdf -
- Pelacho A.M. & Closas L.M. 2004. “Medios de cultivo nutritivos para un crecimiento *in vitro*”. Consultado 14 de abril 2009. En: <http://www.etsea2.udl.es/invitro/medios.htm> - 6k
- Pierik R.L.M. 1987. *In vitro culture of higher plants.* Dordrecht, Boston, Martinus Nyghof publisher, pp. 344.

Capítulo 3

Normas de Seguridad en Laboratorios de Cultivo de Tejidos

Margarita Calle & Gino Aguirre

3.1. INTRODUCCIÓN

Los laboratorios (Funes *et al.*, 2005) son áreas físicas, expuestas a riesgos potenciales, que hacen necesario el cumplimiento de normas para ofrecer seguridad a su personal. El no contar con mínimas normas de seguridad puede ocasionar el deterioro de equipo e instrumental y, lo que es peor, puede poner en riesgo la salud o vida misma del operador.

El término accidente es todo acontecimiento no programado, extraño al desenvolvimiento normal del trabajo del cual podrá resultar algún daño físico o económico (Ferreira da Costa, 1996). Un acto inseguro es aquel que reside exclusivamente en el factor humano, debido a la ejecución de una tarea realizada de manera contraria a las normas de seguridad, como ejemplo, el no utilizar Equipo de Protección Individual (EPI) que es de uso obligatorio.

Es así que la seguridad en laboratorio depende de la protección cotidiana, uso eficiente de materiales, equipos y atención cuidadosa a los procedimientos y reglas al tratar con situaciones que son potencialmente arriesgadas. En todo caso, es esencial que el personal esté alerta a lo que sucede a su alrededor (Jona & Menine, 1987 & Argote, 1998).

A continuación se describen las buenas prácticas en cada área del laboratorio tomando en

cuenta aspectos concernientes a la limpieza, seguridad del personal, manejo de equipos y almacenamiento de reactivos químicos.

3.2. ÁREAS DEL LABORATORIO

3.2.1. Área del vestíbulo

En esta área se advierten los siguientes aspectos:

- Uso de guardapolvo tanto para el personal como para visitantes.
- Uso de zapatones protectores.
- No es recomendable el uso de prendas de laboratorio en otros ambientes como: bibliotecas, comedores, salas de reunión, oficinas administrativas y otras áreas comunes.
- La ropa protectora no debe ser guardada en los mismos casilleros que la ropa de calle.
- Se recomienda llevar zapatos cerrados y no sandalias.

3.2.2. Área de lavado y esterilización

El área de lavado o esterilización está relacionada con todos los aspectos concernientes a la asepsia como:

a) *Limpieza personal*

- Quitarse anillos, relojes y otros artículos de las manos.
- Lavarse las manos y antebrazo con agua y jabón antes de empezar y luego de terminar cualquier trabajo dentro el laboratorio.
- Usar toallas de papel para el secado y no toallas de paño, pues éstas, al igual que las jaboneras, crían bacterias (*Pseudomonas spp.*).

b) *Limpieza de áreas de laboratorio*

- La limpieza física se realiza por vía húmeda mediante el uso de paños. No es recomendable usar vapor ni aerosoles.
- Para desinfectar las áreas del laboratorio se puede usar productos desinfectantes como formaldehído al 2% de 15 a 30 min, hipoclorito de sodio o calcio al 1% de 3-20 min.
- Los mesones deben ser lavados y desinfectados antes de iniciar la rutina de trabajo.
- La limpieza debe ser realizada siempre con guantes de goma.
- No dejar objetos esparcidos por el suelo y evitar que se derramen líquidos por las mesas de trabajo y el piso.
- Los contenedores y herramientas de limpieza deben tener un lugar específico.

c) *Limpieza de materiales de laboratorio*

- Siempre debe comenzarse por el material no contaminado.
- El material debe ser lavado con agua jabonosa, enjuagado con abundante agua corriente, y luego lavado con agua destilada antes de secar por escurrimiento.
- Los recipientes con cultivos contaminados, deben ser esterilizados en autoclave.

3.2.3. Señalización

La señalización es uno de los aspectos más importantes. Como medida educacional aumenta la percepción del riesgo a la que están expuestos los profesionales, incluyendo las etiquetas de productos riesgosos (Camacho, 1997). Todas las áreas de laboratorio deben estar señalizadas para facilitar la orientación de los usuarios y advertir acerca de los riesgos existentes. Es importante asimismo colocar en lugares visibles el croquis del laboratorio, mostrando claramente las salidas de emergencia.

Los colores pueden ser utilizados como factores de seguridad (Matos, 1992), el color da un confort visual para la identificación, y es un complemento de medidas de higiene, advertencia de riesgos, delimita áreas, equipos e instalaciones (Cuadro 1).

Considerando los riesgos más frecuentes en el laboratorio, los símbolos pictográficos o señales más utilizadas en general sirven para representar: riesgos biológicos, riesgos químicos, protección de sustancias químicas o microorganismos peligrosos, prevención o prohibición, los cuales son esenciales para la seguridad del personal (Figura 1).

3.2.4. Espacio y seguridad en los ambientes

Según la Universidad Politécnica de Valencia¹³ (2004), las dimensiones y condiciones ambientales de los espacios de trabajo deben permitir al personal realizar sus actividades sin riesgos para su seguridad, salud y en condiciones ergonómicas aceptables. Las dimensiones que deben reunir tales espacios son: altura hasta el techo 3 m y superficie por trabajador 2 m².

La iluminación dentro del laboratorio debe ser cercana a los 300 lux/m² y el área de trabajo específico de 500 lux/m². En laboratorios

13 UPV: Universidad Politécnica de Valencia.

básicos con un nivel de seguridad 1, utilizados en enseñanza, se recomienda el 20% de aire externo, el mismo que debe ser filtrado antes de ingresar. La ventilación tiene relación directa con la temperatura y humedad relativa del ambiente (Rodríguez, 1999).

3.2.5. Área de preparación de medios de cultivo

Para la seguridad del personal se debe considerar lo siguiente:

- Leer atentamente los pasos para la preparación de la solución.
- Prever todo antes de comenzar. Preparar la vidriería, reactivos, agua destilada, equipos. Verificar si se requieren equipos o materiales especiales, ejemplo: microscopio invertido.
- Conocer todo respecto a los reactivos que se van utilizar. Su grado de toxicidad y cómo proceder en caso de intoxicación.
- Transportar los frascos con cuidado. Nunca intentar abrir puertas apretando los frascos contra el cuerpo.
- Cuando sea necesario, utilizar guantes de goma y protector facial con filtro químico.
- Limpiar todos los frascos externamente antes de abrirlos para proceder al pesado o medida del volumen necesarios.
- Los reactivos sólidos o en polvo nunca deben pesarse sobre papel estañado aunque se este trabajando con protector y guantes.
- Los reactivos sólidos deben ser manipulados con una espátula, tratando de extraer del recipiente sólo la cantidad requerida.

Cuadro 1. Seguridad en base a colores para el uso en laboratorio

| Color | Significado | Uso |
|------------|---------------------------|--|
| Rojo | Peligro | <ul style="list-style-type: none"> • Protección contra incendios • Combate de fuego |
| Amarillo | Precaución | <ul style="list-style-type: none"> • Luces de advertencia de peligro • Escaleras, Pasamanos, • Pisos en desnivel, Espejos |
| Anaranjado | Alerta | <ul style="list-style-type: none"> • Partes móviles peligrosas de máquinas y equipos |
| Azul | Cuidado | <ul style="list-style-type: none"> • Avisos de equipos fuera de servicio |
| Verde | Seguridad | <ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de peligro cajas de equipos de seguridad • Cuadros y avisos de seguridad |
| Blanco | Corredores de circulación | <ul style="list-style-type: none"> • Franjas y señales de localización |
| Negro | Colectores de residuos | <ul style="list-style-type: none"> • Colectores de residuos para descarte o tratamiento |
| Lila | Radiación | <ul style="list-style-type: none"> • Zonas de exposición de radiaciones electromagnéticas penetrantes. |

Fuente: Matos 1992



Figura 1. Símbolos pictográficos de riesgo, de protección y de prohibición más utilizados en laboratorio

Una vez extraído el reactivo, debe taparse el frasco inmediatamente.

- No mezclar sustancias para ver que sucede, puede ocasionar un accidente.
- Los frascos que contienen líquidos, deberán ser manejados con mucha cautela para que la sustancia no se escurra por las paredes externas y dañe el rótulo. Si esto ocurriera, es necesario que éste sea reemplazado por otro que contenga la misma información que el original. Un frasco jamás puede quedarse sin identificación.
- Después de su utilización, retornar el frasco a su lugar, limpio y bien cerrado.
- Cuando se utilicen guantes de protección no realizar otras actividades que pongan en riesgo la salud de los demás.
- Tener mucho cuidado con la vidriería. La mayoría de químicos generan calor. Tener cuidado al manejar grandes volúmenes de soluciones principalmente si estuvieran calientes. Aguardar a que la temperatura se estabilice.
- El vidrio caliente debe dejarse encima de una plancha aislante hasta que se enfríe, caso contrario se causará la rotura del mismo debido al choque térmico.
- Todas las soluciones preparadas deben ser rotuladas debidamente, indicando el nombre del producto, la concentración, la fecha y el nombre del operador.
- No pipetear nunca con la boca líquidos corrosivos o venenosos. Los reactivos líquidos se manipulan con pipetas adaptadas a una perilla o bomba de succión.
- No dejar nunca soluciones en el agitador durante la noche.
- Colocar los aparatos y reactivos lejos del borde de la mesa.
- Mantener el orden. Acomodar todo en su lugar y dejar los mesones y el piso limpios.
- No utilizar los frascos vacíos de reactivos para guardar otros productos.

3.2.6. Área de cámara de flujo laminar

La asepsia es de mucha importancia en esta área para lograr resultados adecuados en los cultivos.

3.2.7. Reglas de manejo en el área de cámara de flujo laminar

Para los procedimientos correctos en la manipulación de la cámara de flujo laminar es imprescindible que el usuario conozca las siguientes reglas:

- Usar barbijos, gorros protectores y anteojos de seguridad.
- La cámara de flujo laminar debe encenderse 15 minutos antes de empezar el trabajo.
- No abrir ni cerrar puertas en el mismo ambiente.
- Desinfectar las manos con alcohol al 70%.
- Limpiar con alcohol al 70% el frontis y la mesa de la cámara de flujo laminar.
- Las herramientas deben colocarse de tal forma que los brazos no se crucen sobre el área de trabajo cuando sea necesario usarlas.
- No usar llama muy alta ni muy cerca de la pared donde se ubica el filtro.
- Los instrumentos de trabajo (pinzas, escalpelos) deben ser flameados en alcohol al 95% antes y después de cada uso.
- Limpiar con etanol al 70% la superficie externa del material a introducir.
- Flamear la boca de los recipientes que contienen los medios de cultivo antes y después de cultivar el explante y antes de cerrarlos.
- Los materiales deben reducirse al mínimo indispensable dentro la cámara.
- En el caso de que se averíe un equipo, informar inmediatamente al supervisor, evitando utilizarlo hasta su completa reparación.

- Después de concluir el trabajo en el interior de la cámara, el ventilador de la misma debe permanecer en funcionamiento por lo menos durante 5 minutos.
- Al terminar el trabajo se debe limpiar toda el área.
- Limpiar mensualmente todas las superficies exteriores con un paño húmedo, a fin de eliminar el polvo acumulado y realizar pruebas de calidad del filtro.
- Se recomienda limpiar y/o cambiar de pre filtro cada seis meses.

3.3. ALMACÉN

El laboratorio debe disponer de salas o áreas con espacio suficiente para el almacenamiento de los suministros y los equipos (OBA, 1997).

3.3.1. Almacenamiento de los reactivos o sustancias químicas

Las sustancias químicas son particularmente peligrosas y deben manejarse con el cuidado especial y según los procedimientos recomendados (Jona & Menine, 1987). Para almacenar sustancias químicas, según Ferreira da Costa (1996) se debe considerar:

- Incompatibilidad entre materiales almacenados (Cuadro 2).
- Sistemas de ventilación.
- Señalización correcta.
- Disponibilidad de Equipo de Protección Individual o Común- EPI ó EPC.
- El área administrativa debe estar separada del área técnica del almacén.

Cuadro 2. Incompatibilidad de algunas sustancias químicas

| | |
|-------------------------|--|
| Acetileno | Cloro, bromo, flúor, cobre, plata, mercurio y sus compuestos |
| Acido acético | Óxido de cromo VI, ácido nítrico, ácido perclórico, compuestos hidroxilados, peróxidos y permanganatos |
| Acido nítrico | Ácido acético, ácido crómico, ácido cianídrico, líquidos y gases combustibles. |
| Acido oxálico | Plata y sales de mercurio. |
| Ácido sulfúrico | Cloratos, percloratos, permanganatos y agua |
| Cobre | Acetileno, agua oxigenada |
| Acido perclórico | Anhídrido acético, alcoholes, papel, madera, clorato de potasio, perclorato de potasio. |
| Carbón activado | Hipoclorito de calcio, oxidantes |
| Cloratos | Sales de Amonio, acetileno, hidrogeno, bencina y otras fracciones de petróleo |
| Líquidos inflamables | Nitrato de amonio, peróxido de hidrógeno, ácido nítrico, peróxido de sodio, halógenos. |
| Metales alcalinos | Agua, tetraclorato de carbono, halógenos |
| Mercurio | Acetileno, Amoniaco. |
| Nitratos de amonio | Ácidos, metales en polvo, sustancias orgánicas y combustibles finamente divididos. |
| Peroxido de hidrogeno | Cu, Br, Cr, Fe, casi todos los metales y sus sales respectivas. |
| Permanganato de potasio | Glicerina, Etileno glicol, acido sulfúrico. |

Fuente: Ferreira da Costa, (1996).

3.3.2. Incompatibilidad de sustancias para el almacenamiento

En la siguiente tabla se observa algunos ejemplos de reactivos químicos incompatibles en el almacenamiento.

Cárdenas & Mondeja (2004) indican que en el almacenamiento no se deben colocar juntos:

- Explosivos con: ácidos fuertes, oxidantes fuertes, bases fuertes, aminas, material combustible.
- Oxidantes con derivados halogenados, compuestos halogenados, reductores, inflamables, ácidos fuertes, metales.
- Ácidos con: oxidantes, bases fuertes, metales.
- Bases y sales básicas con: ácidos, derivados halogenados, metales.
- Metales activos con: agua, ácidos, derivados halogenados.

3.3.3. Reglas de almacenamiento

Leer siempre la advertencia escrita en la etiqueta y continuar de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- a) Los reactivos no deben ser almacenados en orden alfabético debido a las posibles incompatibilidades.
- b) Las sustancias más peligrosas no deben ser guardadas en la parte superior de los anaqueles.
- c) Todo reactivo debe llevar su etiqueta correspondiente de identificación para evitar confusiones y accidentes.
- d) Verificar periódicamente la caducidad de los reactivos, tiempo de uso y validez.
- e) Las soluciones de peróxidos deben ser aisladas de material orgánico y almacenadas a bajas temperaturas, en áreas frescas con ventilación y en frascos de polietileno con tapa rosca, jamás en frascos de vidrio. Los frascos deben ser debidamente identificados.

- f) El almacén de productos inflamables debe tener ventilación adecuada y sistemas de control de incendios, con avisos de advertencia de no fumar y acceso restringido. En el interior de los ambientes de trabajo, estos productos deben estar en mínimas cantidades, en armarios específicos o en refrigeradores debidamente protegidos. Los materiales inflamables no deben ser guardados en heladeras, ya que una centella eléctrica proveniente de una lámpara puede generar explosión.
- g) Almacenar los cilindros de gases colocando en locales externos, amplios, cubiertos, naturalmente ventilados y debidamente protegidos; deben ser observadas las incompatibilidades químicas entre los diversos tipos de gas.
- h) Los recipientes de productos corrosivos deben ser cuidadosamente manipulados, conservados, fechados y etiquetados. Frascos grandes de muchas sustancias, principalmente de ácidos y álcalis, deben ser guardados al nivel del piso en bandejas con orificios para posibles drenajes. Algunos grupos funcionales son explosivos potenciales en el laboratorio: amida, nitrato perclorato, peróxido.

3.3.4. Descripción y manipulación de reactivos

El personal de laboratorio (Funes *et al.*, 2005) utiliza sustancias químicas, ya sea como reactivos o como productos de desinfección. Las sustancias químicas o reactivos son potencialmente peligrosos y pueden ser muy variados y complejos, con propiedades tóxicas, corrosivas, inflamables o explosivas, necesitando de un manejo especial sin el cual el riesgo para el personal que las manipula es elevado. La clasificación de las sustancias químicas es variable, la más conocida es de acuerdo al riesgo, clasificada por la National Fire Protection Association¹⁴. En síntesis se

14 NPFA: National Fire Protection Association. www.nfpa.org

describen los siguientes grupos de sustancias químicas, explosivas, inflamables, corrosivas y gases comprimidos, mencionados por Ferreira da Costa (1996):

a) Sustancias explosivas. Son agentes químicos que por la acción de un choque, percusión, fricción producen centellas o calor suficiente para iniciar un proceso destructivo a través de violenta liberación de energía, por lo que es importante evitar fuentes de calor cercanas. Dentro de este grupo se encuentran los peróxidos que son compuestos químicos extremadamente inestables. En general estas sustancias son irritantes para el aparato respiratorio, piel y ojos.

El uso de estas sustancias debe ser limitado a cantidades mínimas necesarias. Cualquier salpicadura debe ser inmediatamente limpiada. Es recomendable manipular peróxidos con espátulas de madera o cerámica, no así de metal.

b) Sustancias inflamables. Son sustancias que envuelven solventes orgánicos inflamables. Algunos son extremadamente peligrosos por presentar una alta presión de vapor a temperatura ambiente.

Según la NFPA citado por Ferreira da Costa (1996) son considerados líquidos inflamables los que en condiciones normales de temperatura y presión tienen punto de fulgor debajo de 93° C. Dentro de este grupo se encuentran el benceno, estireno, metanol, tolueno, xileno, acetona, etanol y éter etílico.

Con estas sustancias se debe trabajar con las debidas medidas de seguridad, donde la utilización de máscaras es imprescindible. Asimismo, éstas deben ser manipuladas en locales ventilados y lejos de las fuentes de calor.

c) Sustancias corrosivas. Son agentes químicos que desintegran tejidos vivos o mate-

riales inertes. Entre las sustancias corrosivas están incluidos los ácidos, anhídridos, y álcalis. Estos compuestos generalmente destruyen sus recipientes y contaminan la atmósfera del área de almacenamiento. Algunos son volátiles, otros reaccionan con sulfitos, sulfatos, cianatos y otros, liberando otras sustancias tóxicas. Algunos ejemplos de estos productos son el ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido pícrico, ácido sulfúrico, hidróxido de sodio y potasio.

Tanto los ácidos como los álcalis causan serias quemaduras y daños en los ojos. Por tanto debe usarse protección como lentes, guantes y delantales cuando se manipula estos productos en el laboratorio o en almacén. El piso de estos locales debe ser conservado lo más seco posible.

Cuando se diluyen ácidos con agua, los ácidos deben ser adicionados lentamente al agua, agitando continuamente la mezcla y nunca debe procederse a la inversa. Un derrame de líquidos corrosivos no debe ser absorbido por medio de material orgánico como aserrín o pedazos de tela; debe neutralizarse con algún absorbente granulado como la arena.

d) Gases comprimidos. El manejo de gases a presión requiere mucho cuidado, pues cualquier defecto en el equipamiento puede provocar una difusión de éstos en el ambiente. Un gas difundido puede tener efecto anestésico, asfixiante, tóxico o formar mezclas extremadamente explosivas con el aire. Una gran mayoría de los gases son inodoros e incoloros, dificultando así su identificación. Por ello es recomendable:

- Procurar informarse sobre las características del gas en uso tales como riesgo de explosión y toxicidad.

- Jamás utilizar grasas, óleos o glicerinas en cilindros que contengan gases oxidantes, debido al riesgo de explosión (Ej.: Oxígeno).
- Utilizar solamente cilindros equipados con válvulas que faciliten el manipuleo.
- No colocar los cilindros en lugares con fuentes de calor.

3.3.5. Principales medios de penetración de los agentes químicos

Según Ferreira de Costa (1996), las principales vías de penetración de las sustancias son por inhalación, absorción e ingestión; además menciona los efectos que pueden causar estas sustancias.

- **Inhalación.** Mayor grado de riesgo debido a la rapidez con que las sustancias químicas son absorbidas por los pulmones.
- **Absorción:** Contacto de las sustancias químicas con la piel.
- **Ingestión:** Por vías secundarias de ingreso y por incumplimiento de normas de higiene y seguridad.

3.3.6. Efectos de los agentes químicos en el organismo

- **Efectos mutagénicos.** Efectos de cambio que determinadas moléculas provocan directamente sobre el genoma. Se estima que el 80% de ellas son también cancerígenas. Ejemplos: Azida sódica, hidroxilamina o bromuro de ethidium (BET).
- **Efectos cancerígenos.** Estimulan la aparición de tumores cancerígenos. Ejemplos: asbesto, benceno, benzidina, cloreto de vinilo, acrilonitrila, formaldehído, silica cristalina, etc.
- **Efectos teratogénicos.** Causa daños directamente al feto por vía transplacentaria por la exposición a sustancias tóxicas. Ejem-

plos: dimetil mercurio, sales de litio, entre otros.

- **Efectos órgano tóxicos:** causados directamente a determinados órganos generando efectos neuro, hema, hepa, nefrotóxicos o sobre el aparato reproductor.
- **Efectos inmunotóxicos:** Causan daño directo al sistema inmunológico, generando hipersensibilidad, inmunodepresión y procesos autoinmunes.

3.3.7. Cámaras de seguridad biológica

Las cámaras de flujo laminar son las zonas de protección de volumen reducido que permiten efectuar diversas manipulaciones de microorganismos y controlar la contaminación (Matos, 1992). Las funciones de la cámara de flujo laminar son:

- Aportar en la zona un aire filtrado y aséptico.
- Evitar la sedimentación de partículas emitidas por la manipulación en las actividades.
- Proteger al operador de compuestos tóxicos.

Las cabinas de flujo laminar horizontal son muy adecuadas para una buena protección del producto, pero no son adecuadas para el trabajo con materiales peligrosos o con algún tipo de riesgo pues el operador queda completamente expuesto. En las cabinas de flujo vertical se asegura una buena protección del producto, y una protección total del operador, son por ello más adecuadas para el trabajo con agentes peligrosos.

Las cámaras de flujo laminar deben ser instaladas en áreas libres de corrientes de aire, puertas y zonas de mucho tránsito de personas como los pasillos, que puedan crear perturbaciones en el flujo laminar. Las mismas se instalarán sobre superficies sólidas y no móviles. Las áreas de flujo laminar deben ser de acceso restringido para evitar la contami-

nación. Las ventanas del laboratorio deben permanecer siempre cerradas.

3.3.8. Agentes biológicos

El riesgo ocasionado por agentes biológicos dentro el laboratorio está dado generalmente por bacterias y hongos, que se caracterizan por pocas probabilidades de causar una enfermedad, tienen una supervivencia limitada en el medio ambiente y riesgos mínimos para el personal del laboratorio.

Según Camacho (1997), un caso particular es el de los hongos, que se comportan como parásitos saprófitos. Al trabajar en laboratorio con material contaminado, es necesario saber que cualquier hongo puede contaminar mucosas, dependiendo del nivel inmunitario del trabajador. Las micotoxinas son cancerígenas y causan desarreglos nerviosos.

Los microorganismos pueden ser clasificados en categorías de riesgo 1 a 4 (según la OMS, 1994; citado por Argote, 1998):

- **Grupo 1.** Esta clase posee riesgo individual y colectivo. Son microorganismos que nunca fueron descritos como agente casual para el hombre y no constituyen riesgo para el medio ambiente. Ejemplos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli K12*. En general, todos los agentes bacterianos, fúngicos, virales, rickettsias y clamidias no incluidos en clases superiores.
- **Grupo 2.** Esta clase posee riesgo individual moderado y riesgo colectivo limitado. Estos microorganismos pueden provocar dolencias al hombre, con poca probabilidad de alto riesgo para profesionales de laboratorio. Ejemplos: Virus, hepatitis B, *Salmonella typhi*.
- **Grupo 3.** Esta clase posee riesgo individual elevado y riesgo colectivo bajo. Pueden causar enfermedades graves a profesionales de laboratorio. Ejemplos: *Micobacterium tuberculosis*, HIV, *Tripanosoma cruzi*, *Brucella sp.*
- **Grupo 4.** Esta clase agrupa a los agentes que causan dolencias graves para el hombre y representan un serio riesgo para los profesionales de laboratorio y para la colectividad. Posee agentes patogénicos altamente infecciosos que se propagan fácilmente, pudiendo causar muerte. Ejemplos: Virus Ébola y Marburg (*Filovirus*); Lassa (*Arenavirus*), priones de la vaca loca.

Existen agentes biológicos susceptibles de transmitirse por diferentes vías como:

- **Vía aérea.** En forma de aerosoles producidos por centrifugación de muestras o agitación de tubos.
- **Vía oral.** Ocurre por malos hábitos de trabajo, como pipetear con la boca, beber, comer o fumar.
- **Vía ocular.** ocurre por proyección de gotitas de material infectante, con oculares de microscopio, aparatos ópticos.
- **Vía cutánea.** Ocurre en general por cortes y salpicaduras.

3.3.9. Riesgo eléctrico

El riesgo eléctrico puede ocurrir por diferentes causas o efectos, con los cuales uno debe tener precaución para evitar accidentes. La prevención de los riesgos eléctricos se logra:

- Siguiendo las instrucciones de funcionamiento y manipulación de los equipos.
- No enchufar nunca un equipo con las conexiones en mal estado.
- Al manipular en el interior de un aparato, comprobar siempre que se encuentre desconectado de la fuente de alimentación.
- Nunca improvisar instalaciones eléctricas. Solo personas autorizadas deben reparar una instalación.
- Nunca colocar aparatos eléctricos sobre las superficies mojadas o húmedas.

- La instalación debe hacerse en locales secos.
- Informe cualquier quemadura eléctrica inmediatamente al técnico de laboratorio.

3.3.10. Manejo de residuos

La manipulación y evacuación de los residuos se debe llevar a cabo con objeto de no poner en peligro la integridad de los ensayos. Para ello es preciso disponer de instalaciones que permitan coleccionar, almacenar y evacuar los residuos de forma adecuada, y asimismo, definir los procedimientos de descontaminación y de transporte (OBA, 1997). La eliminación e identificación de los residuos, es causa frecuente de accidentes dentro el laboratorio, y de contaminación ambiental. Para minimizar los residuos se debe seguir los siguientes procedimientos:

a) Residuos Químicos

- Los residuos de sustancias inflamables deben descartarse en recipientes adecuados y no en el lavadero.
- Los productos químicos tóxicos se almacenan temporalmente en contenedores especiales para este fin.
- No descartar residuos de reactivos en el lavadero. Las sustancias líquidas o las disoluciones que puedan verterse al lavadero, se diluirán previamente, sobre todo si se trata de ácidos y de bases.
- Los residuos de sustancias peligrosas deben ser colocados en recipientes metálicos, debidamente cerrados, identificados y recogidos por equipos de seguridad o por servicios de terceros, transportados en vías apropiadas y descargados en áreas predeterminadas por la autoridad ambiental municipal.

b) Residuos comunes

- Los residuos comunes tipo papeles y cartones se dispondrán en la papelera y posteriormente se seleccionarán y embolsarán debidamente.

- El material de vidrio roto, con fisuras, así como hojas de bisturí usadas deben colocarse en recipientes destinados especialmente a este fin para evitar cortaduras.

c) Residuos sólidos y líquidos

Los residuos sólidos (biológicos) de plantas contaminadas (hongos, bacterias) de frascos o tubo de ensayo deben ser esterilizados durante el periodo de trabajo en autoclaves. Los residuos líquidos como agua destilada contaminada deben ser esterilizados en autoclave de la misma manera que los sólidos.

3.3.11. Cámara de crecimiento

Las medidas preventivas o cuidados del área de crecimiento son las siguientes:

- Ubicar los cultivos en cámaras de cultivo cerrado, libre de corrientes de aire.
- El acceso debe ser restringido para evitar la presencia de contaminantes en el área.
- Los recipientes con cultivos contaminados deben ser rápidamente eliminados.

3.4. PROCEDIMIENTOS Y MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS

En caso de accidente por derrame de productos químicos o incendio, actuar con serenidad y rapidez, examinando la situación del entorno y avisar inmediatamente a los servicios de emergencia.

Es importante contar en un lugar visible, la lista de teléfonos más importantes para este tipo de casos, el croquis de evacuación y la ubicación del botiquín de primeros auxilios en el croquis.

Las medidas de primeros auxilios (UPV, 2004) deben ser aplicadas de la siguiente manera:

a) Derrame de productos químicos sobre la piel. Si los productos químicos son vertidos sobre la piel deben ser lavados inmediatamente con abundante agua durante 15 minutos. Si la zona afectada es grande se utilizará la ducha instalada en laboratorio. Es necesario quitarle toda la ropa contaminada a la persona afectada lo antes posible mientras esté bajo la ducha. Procurar inmediatamente ir al médico.

Algunas veces el agua es suficiente pero en otras ocasiones, como en el caso de quemaduras con fenoles, se debe limpiar primero con alcohol etílico.

Si se producen contactos irritantes por ácidos en la piel, lavar rápidamente las zonas afectadas con solución de bicarbonato sódico al 5-10% y si la irritación fue causada por un álcali, lavar rápidamente las zonas afectadas con una solución saturada de ácido bórico o de ácido acético al 1% y posteriormente lavar con abundante agua en ambos casos. Todos estos preparados deben estar ubicados en sitios específicos y claramente enunciados en el manual de primeros auxilios del laboratorio.

En los casos de salpicaduras de ácidos o bases en los ojos, el tiempo para el lavado es de vital importancia. Cuanto más rápido se lave el ojo afectado, más leves serán los daños producidos. Lavar la parte afectada con abundante agua durante no menos de 10 minutos con agua corriente. Cuando se trate de irritaciones en los ojos, es preferible recibir asistencia médica inmediata. Si acontece una intoxicación grave debe llamarse inmediatamente al médico.

b) Incendios en laboratorio. Si el incendio es de pequeñas proporciones, tratar de apagarlo con una manta protectora de fuego, un guardapolvo o paño húmedo o con un extintor de fuego que debe existir

en laboratorio. No se debe utilizar nunca agua para extinguir el fuego provocado por la inflamación de un disolvente.

En caso de que los incendios sean de proporciones grandes mantener la calma y dar alarma de fuego, realizar la evacuación de acuerdo con la señalización, avisar al servicio de emergencia.

- Si una persona se quema se debe pedir auxilio inmediato.
- Si es una segunda persona socorrer de inmediato prosiguiendo de la siguiente manera:
 - Apagar las llamas con una manta protectora de fuego.
 - Conducir a la persona hasta la ducha de seguridad.
 - No se debe utilizar nunca un extintor de fuego sobre una persona.
 - No quitar la ropa que haya podido quedar pegada a la piel.
 - Las pequeñas quemaduras producidas por material caliente, se tratarán lavando la zona afectada con agua fría durante 10-15 minutos.
 - Colocar un apósito limpio sobre la quemadura.
 - No romper las ampollas que se hayan podido formar.
- Si las quemaduras son graves solicitar ayuda médica inmediatamente.

c) Cortes. Los cortes producidos por la rotura de material de vidrio o bisturís son un riesgo común en los laboratorios. Cuando se producen estos cortes se debe lavar la herida con abundante agua y jabón, y luego cubrir las heridas y lesiones con apósitos impermeables antes de comenzar el trabajo. Si las lesiones no pueden cubrirse adecuadamente, no exponerse hasta que curen.

3.5. PROCEDIMIENTOS PARA PREVENIR O ELIMINAR RIESGOS DE ACCIDENTES

La seguridad del laboratorio depende de la protección cotidiana y atención cuidadosa de las normas de trabajo. A continuación se menciona algunos aspectos a tomar en cuenta:

- a) Nunca debe trabajar una persona sola en laboratorio.
- b) Muchos accidentes ocurren a través de la inexperiencia, cualquier duda que se tenga en cualquier técnica debe superarse pidiendo ayuda y consejo.
- c) Orden y seguimiento de las normas son fundamentales para evitar accidentes en laboratorio.
- d) Utilizar los Equipos de Protección Individual (EPI) - protector facial, anteojos de seguridad, guantes, pipetor automático para minimizar la exposición a riesgos individuales.
- e) No guardar alimentos o líquidos para el consumo humano en los refrigeradores ni en ninguna de las áreas de trabajo del laboratorio.
- f) A las áreas de trabajo sólo tiene acceso el personal autorizado.
- g) Colocar indicadores de riesgos o señalización de las áreas de riesgo en el laboratorio.
- h) Verificar las condiciones de seguridad de los equipos.
- i) No comer, beber, ni fumar, en las zonas de trabajo.
- j) Orientar a personal nuevo y leer manuales de seguridad.
- k) Mantener y anunciar condiciones de inseguridad.
- l) Las instalaciones de energía eléctrica, ventilación, y de equipos de laboratorio

deben ser revisadas periódicamente y mantenidas en perfectas condiciones.

- m) Mantener el orden y los pasillos limpios y libres de materiales.
- n) Contar con procedimientos escritos de primeros auxilios de forma clara y directa.
- o) Contar con teléfonos de emergencia en lugares visibles.
- p) Tener instalada una sirena de alerta y un responsable de activarla.

3.6. EQUIPOS DE SEGURIDAD

Los laboratorios que utilizan sustancias o reactivos químicos según Jona & Menine (1987) y Ferreira da Costa (1996) deben poseer:

- Duchas que deben ser fácilmente accesibles.
- Lavamanos de emergencia cerca a las duchas para lavar los ojos.
- Todo el laboratorio debe contar con dispositivos de protección tales como extintores de incendio (compatibles con la naturaleza de trabajo, debidamente localizados y en un número suficiente), además debe disponerse de un botiquín de primeros auxilios.
- Mantas contra incendio localizadas en lugares estratégicos.
- Sacos de arena para absorción de líquidos derramados.
- Frascos de sustancias absorbentes que deben ser esparcidos por los diversos sectores de laboratorio.

3.7. INVERNADERO

Dentro el área de invernadero se debe considerar las siguientes medidas de precaución en la manipulación y aplicación de los plaguicidas:

- Elegir el producto adecuado y leer atentamente las instrucciones de uso respetando las dosis recomendadas.
- Para la aplicación de agroquímicos, debe siempre usarse el equipo de protección adecuado (overoles, mascarillas y lentes).
- No limpiar las boquillas de aplicación soplando.
- Cuando se realice algún descanso, hacerlo siempre fuera de la zona tratada.
- Ducharse y cambiarse de ropa al terminar el trabajo y separar la ropa de trabajo.
- No permanecer ni entrar en la zona tratada como mínimo por 48 horas.
- Mantener el plaguicida sobrante en su envase original, almacenado en lugar fresco, seguro y ventilado.
- Ante cualquier malestar que se experimente tras haber aplicado un plaguicida (dolores de cabeza, náuseas, mareos, vómitos) acudir inmediatamente al médico.

3.8. BIBLIOGRAFÍA

- Argote P.E. 1998. *Esterilización y Desinfección. Curso Internacional de la Bioseguridad en Sanidad Vegetal*. Centro Nacional Seguridad Biológica. Cuba.
- Camacho C. 1997. *Normas de Bioseguridad en Laboratorio y campo*. I Curso de Bioseguridad. Colegio de Ingenieros Agrónomos (CIAB). 1-3 sept. Cochabamba, Bolivia.
- Cárdenas L.J. 2009. "Tecnología en Saneamiento Ambiental". Consultado 15 de junio. En: <http://www.gemini.udistrital.edu.co/comunidad/grupos/fluoreciencia/portexperimentos/exp01.htm> - 55k -
- Cárdenas Z.B & Mondeja G.D. 2004. "Problema medioambiental en laboratorios químicos: trabajo para su solución". Habana, Cuba. Consultado 15 junio 2009. En: <http://www.usuarios.lycos.es/ambiental/ea1/labquim.html> - 32k
- Ferreira de Costa M.C. 1996. *BIOSSEGURANCA. Manual par profissionais das áreas médicas e biomédicas*. Segurança Química Básica em Biotecnologia e Ambientes Hospitalares. Sao Paulo, Bras. Ed Santos, pp. 99.
- FUDESA 1999. *Fundación para el desarrollo de la Esterilización en la Argentina*. Consultado 6 de junio 2008. En: http://www.drwebsa.com.ar/fudesa/info_10.htm
- Funes, F.; Panozo, A.; Cardozo, T. 2005. *Bioseguridad y Seguridad Química*. Laboratorio. Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia, pp. 104.
- Jona R. & Menine U.G. 1987. *Tissue culture of selected tropical fruits*. Italia, Roma. FAO Plant production and protection paper, pp. 123.
- Kyte L. 1987. *Plants from test tubes. An Introduction to Micropropagation*. Hong kong, Timber Press, Inc., pp. 160.
- Matos N.C.A. 1992. *Riscos físicos em Microbiologia*. Curso de aperfeicoamento em Biosseguranca. Bras., pp. 59.
- Naut S. 1988. *Hottes a flux laminaire et postes de sécurité mrobiologique*. INSERM (Institut National de la Sanite et de la Recherche Medicale) (Serie Dossier prevention No.3), pp. 19.
- OBA. Organismo Boliviano de Acreditación. 2004. Control y garantía de la Calidad en el Laboratorio Clínico. Consultado 6 de junio 2008. Disponible en La Paz, Bolivia. En: <http://www.infobol.com/oba>
- OMS. 1994. *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. 2da Ed.
- Rodriguez, J. 1999. *El Diseño de los laboratorios, Equipos y Sistemas de Seguridad*. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Centro Nacional de Seguridad Biológica, La Habana, Cuba, pp. 22.
- UPV (Universidad Politécnica de Valencia) 2004. *Manual de seguridad para operaciones en laboratorios de biotecnología y de tipo biológico*. Consultado 6 de junio 2008. En: <http://www.sprl.upv.es/msbiotecnologia3.htm> - 49k

Capítulo 4

Contaminantes en Cultivo *in vitro*

Gerónimo G. F., Pérez B. L. F., Plata G. & Aguirre V. J. G

INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana es uno de los problemas más limitantes del cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos vegetales, la misma que interviene en forma negativa en su forma de ataque a las vitroplantas esto puede originarse de dos fuentes fundamentales: una llevada a cabo por microorganismos que colonizan la superficie o el interior de los tejidos de los explantes y la otra por microorganismos introducidos durante la manipulación de los operadores en el laboratorio. La misma que puede ocasionar grandes pérdidas hasta un 90% en las diferentes fases del cultivo *in vitro*.

Estos microorganismos que ingresan al tejido a través de aberturas naturales y/o, heridas, son en muchos casos oportunistas que llegan a colonizar los tejidos vegetales y una vez introducidos en laboratorio pueden llegar a desarrollarse con mucha facilidad por la riqueza del medio de cultivo.

Principales fuentes de contaminación

Las principales fuentes de contaminación son:

- Ineficiente desinfección de los explantes primarios utilizados en la fase de establecimiento.

- Por inadecuada manipulación del material vegetal, deficientes técnicas de asepsia y/o incompleta esterilización del medio de cultivo.
- Por fallas en el funcionamiento del flujo laminar
- Mala limpieza o desinfección de los ambientes.
- Presencia de ácaros, trips y hormigas.

Microorganismos contaminantes introducidos en el laboratorio de cultivo *in vitro*

Son generalmente contaminantes ambientales; saprófitos o patógenos de las plantas, así como habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano que se relacionan con procedimientos inadecuados en el laboratorio, condiciones higiénicas sanitarias deficientes o incumplimientos de la disciplina tecnológica. Contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, las bacterias y levaduras, ver fig. 1, denominados "vitropatógenos", aunque también existen otros menos frecuentes como los virus, viroides y microartrópodos (ácaros y trips). George, E. F. 1993).

Entre los contaminantes más comunes de las vitroplantas se mencionan a los géneros

fúngicos: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Microsporium*, *Phialophora*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Chytridococcus*, entre otros y a los géneros bacterianos; *Bacillus* y *Staphylococcus*. Díaz, M. 2010.

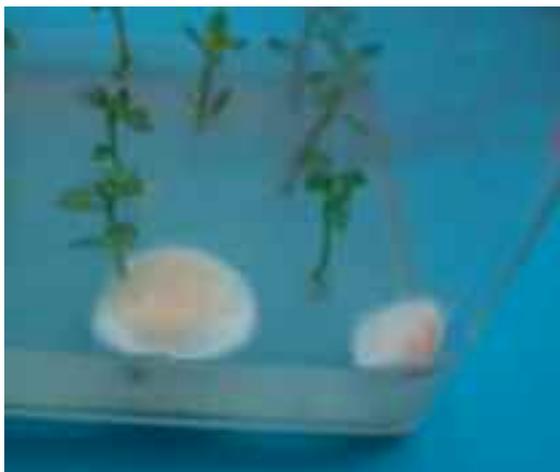


Figura 1. Contaminantes introducidos en medios de cultivos

Las bacterias son consideradas como los contaminantes más comunes y son las que ocasionan los problemas más serios, porque pueden ser sistémicas, y su detección es más difícil, entran al cultivo de tejidos con los explantes iniciales aunque existen otras que son introducidas en el laboratorio por manipulación.

Estudios realizados mencionan que determinados microorganismos son particularmente introducidos en el cultivo de tejidos como resultado de prácticas deficientes en el laboratorio. Ej. *Bacillus* spp. que puede contaminar los medios de cultivo por insuficiente esterilización o mal funcionamiento de las autoclaves. Las endosporas de esta bacteria son altamente resistentes al calor y a productos químicos como los desinfectantes, pueden sobrevivir a temperaturas de 100°C o superiores. Aunque también se ha reportado su resistencia en medio de cultivos después del auto clavado y antes de ser utilizado y puede ser diseminado durante las operaciones con el material vegetal.

El término vitropatógeno ha sido usado para aquellos organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas en el campo, pero sí son perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*, mientras que el término patógeno ha sido confinado para describir a un organismo que causa enfermedad a las plantas cultivadas en el campo. estos vitropatógenos pueden ser dañinos para el cultivo de tejidos vegetales, porque compiten con el explante por los nutrientes del medio y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o liberación al medio de metabolitos tóxicos Leifert, C., Waites, W. M.; Camotta, H. y Nicholas, J. R. 1989.

Hernández. J. y González. M. 2010, determino que los coeficientes de multiplicación de plantas infectadas con contaminantes bacterianos latentes pueden mantenerse inalterables, pero reiteradamente se ha referido que decrecen su crecimiento, esta investigación es cierta debido que realizada practicas con plantas contaminadas en laboratorio de la FCAPyF sucedió lo mismo encontrándose una disminución en la tasa de multiplicación con plantas tratadas con antibióticos.

Como contaminantes *in vitro* de plantas, se han aislado especies de bacterias

pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, entre otros y como los microorganismos fungosos más comúnmente introducidos al cultivo de tejidos se encuentran los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Curvularia* Boxus, P. H. y Terzi, J. M. 1988.

Al realizar el establecimiento *in vitro* después de 15 días, se identificaron como géneros de hongos contaminantes a *Fusarium* sp., *Botryodiplodia* sp., *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp. Así diferentes autores como Leifert, C., Waites, W. M.; Camotta, H. y Nicholas, J. R. 1989.

Hernández. J. y González. M. 2010. Señalan que frecuentemente es difícil identificar la fuente de contaminación y que se han desarrollado protocolos para reducir la presencia de estos microorganismos contaminantes, que pueden encontrarse en la superficie (ectófitos), en el interior (endófitos) del explante o en ambos sitios, siendo los de la superficie los más fácil es de eliminar.

Niedz, R. P. y Bausher, M. G. 2002. Indican que el éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y la prevención de la contaminación microbiana. Uno de los procedimientos para disminuir los riesgos de contaminación en el establecimiento de los explantes, es la aplicación de fungicidas sintéticos, combinados o independientes, combinando fungicidas preventivos de contacto Mancozeb (10 g/l), Benomil (2 g/l) y bactericidas como la cetofaxima, ampicilina que has sido utilizados en una relación de 25mg/l que en muchos casos ha resultado excelente. Sin embargo; otros investigadores como Cruz, M.; Acosta, M.; Leiva, M.; Alvarado, y.; Lezcano, M. 2002, indican, que el empleo del complejo carbendazim--ciclodextrina, en concentraciones variables,

demonstraron que era posible inhibir el crecimiento micelial de diferentes contaminantes pertenecientes a los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spicaria*, *Fusarium*, *Pestalotia* y *Colletotrichum*.

El tamaño del explante es otra de las causas que incrementa la presencia de contaminantes *in vitro*, pues mientras mayor sea el explante, más difícil es desinfectar Surga, J. G. y Guevara, 1994. Del mismo modo, las irregularidades ubicadas en la superficie del explante afectan el éxito de la desinfección superficial, ya que pueden servir de depósito de esporas y polvo, y los productos empleados no logran llegar y desinfectar las áreas de interés. Roca, W. y Mrogrinski, L. 1993

Para la desinfección del explante inicial, se han empleado soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones entre 0.5 y 5% . Asimismo las soluciones de hipoclorito de calcio (CaClO) son tan efectivas como las de sodio. De forma general, se plantea que la escisión del explante es recomendable realizarla después de la desinfección, para eliminar tejidos que han sido dañados por la solución de hipoclorito.

La aplicación de una doble desinfección con hipoclorito de sodio o calcio, seguido del enjuague con agua destilada y esterilizada por dos a tres minutos, ha sido empleada por varios investigadores. Esto permite que las esporas que no puedan ser destruidas inicialmente, pasen a formas vegetativas y durante la doble desinfección sean eliminadas fácilmente de los explantes primarios, lo que conlleva a un menor porcentaje de contaminación microbiana. Novat, F. J.; Afza, R.; Van Durein, M. 1988.

Métodos de detección de vitropatógenos

La detección de vitropatógenos constituyen una herramienta muy importante, en el momento de planificar cultivos *in vitro* y para combatir enfermedades de poblaciones

vegetales. Saber con qué patógeno se está lidiando es el paso más importante para eliminarlo. Muchos vitropatógenos tienen asociaciones naturales con las plantas, por lo que las pruebas de calidad también deben realizarse para material vegetal, del cual no se tenga absoluta certeza de que está libre de patógenos. Fontúrbel, F. 2001.

Investigadores en biotecnología de plantas a menudo utilizan la observación visual de sus cultivos, como método para saber si están libres o no de contaminantes. Leifert, C., Waites, W. M.; Camotta, H. y Nicholas, J. R. 1989. Los signos de contaminación sólo aparecen después de que las plantas han sido subcultivadas en varias oportunidades. Esto puede estar relacionado con el crecimiento lento de las bacterias en medios de cultivo y a su estado de latencia.

Por esta razón, se precisa de métodos rápidos y seguros de detección temprana; entre los más utilizados se encuentran rozar la superficie cortada del explante sobre un medio de cultivo bacteriológico durante los subcultivos. Fossard, R. A. y De Fossard, H. 1988. Otro aspecto es la modificación de los medios de cultivo de plantas con la adición de bacterias. Boxus, P. H. y Terzi, J. M. 1988.

Los métodos de detección de vitropatógenos se dividen en dos grandes grupos: detección de bacterias y hongos, y detección de virus. Los procesos de detección de virus son considerados por separado de los empleados para bacterias y hongos, puesto que dadas las características de los virus, se necesitan técnicas especiales (serología, microscopía electrónica, etc.). Fontúrbel, F. 2001.

Uso de sustancias antimicrobianas

El éxito de su aplicación en el medio de cultivo varía según los criterios, métodos de apreciación, microorganismos, etc. y depende en gran medida del desarrollo de un buen protocolo. Así, por ejemplo, se ha planteado

que los antibióticos no sustituyan las técnicas de asepsia y deben ser empleados sólo cuando éstas son inadecuadas, preferentemente como tratamiento profiláctico más que para tratar la infección.

Un compuesto antimicrobiano debe cumplir las siguientes condiciones: debe ser soluble, estable, no afectar el pH ni el medio de cultivo, mínimos efectos secundarios (no fitotóxicos), amplio espectro, ser bactericida, debe ser usado sistemáticamente y en alternancia con otras sustancias antimicrobianas, para evitar desarrollar resistencia. Falkiner, F. 1990. El empleo de antibióticos solamente se justifica, en casos de excepción y en cultivos de corta duración, porque su alta especificidad implica que no previenen la proliferación de todos los microorganismos. Además, tales productos modifican la composición de los medios de cultivos y pueden ser metabolizados por los explantes.

El uso de ciertos antibióticos pueden eliminar grupos discretos y particulares de bacterias, pero en la mayoría de los casos se necesitan sustancias de amplio espectro. El empleo de agentes químicos desinfectantes como el Basamid, Brassicol, Benlate, PCNB o mezclas de ellos permite la eliminación de la sarna común (*Streptomyces scabies*) de la papa. Marcano, D. y Pire, A. 1993. Otros investigadores, en la micropropagación de especies vegetales, obtuvieron experiencias con el uso de sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano. Meyer, H.; Staden, V.; Allen, S. y Van Staden, J. 1992. Estas sustancias son antibióticos como la rifampicina, cefotaxima, gentamicina, estreptomycin, ampicilina, etc. También se han empleado otras sustancias como extractos filtrados de microorganismos (metabolitos). Entre estos, el extracto de *Pseudomonas fluorescens* ha mostrado una elevada actividad antimicrobiana. El G1 (1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno) es un producto desarrollado en Cuba, con acción de esterilizante químico, que se incorpora a los medios de cultivo para eliminar los contaminantes microbianos. Hussain, S.; Lane, S. y Price, D. A.

El uso de nitrato de plata en los medios de cultivo permitió controlar el crecimiento de contaminantes no patogénicos, sin afectar el crecimiento en plántulas de tomate tal como menciona Kubota, C. y Tadokoro, N. 1999.

Identificación de microorganismos contaminantes de hongos y bacterias en medio de cultivo con vitroplantas

Uno de los mayores problemas que se tiene en la propagación de plantas *in vitro* en el laboratorio de biotecnología son los contaminantes como ser: Hongos que muchas veces son difíciles de detectar en el medio de

cultivo pues su crecimiento en un inicio no es visible pero transcurrido cierto tiempo se observa el crecimiento en forma de colonias aisladas o alrededor de los explantes (fig.2). En su gran mayoría éstos corresponden a hongos ambientales.

Las bacterias son los contaminantes *in vitro* más comunes escapan a los efectos de los esterilizantes superficiales y pueden ser inter o intracelulares. Asimismo entre los últimos, se encuentran los virus, viroides y muchos géneros bacterianos como: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. Madoff, S. 1981.



Figura 2. Algunos Contaminantes Fúngicos en laboratorio de biotecnología vegetal FCAP y F

Su distribución puede ser localizada o sistémica por xilema o floema. Debergh, P. y Zimmerman, R. 1991. Estos contaminantes no se manifiestan en los primeros subcultivos, porque la alta presión osmótica, el pH y ciertas hormonas de los medios de cultivo pueden inhibir su crecimiento. Debido a este efecto inhibitorio, muchos microorganismos requieren un período de adaptación a las nuevas condiciones antes de manifestar su presencia; esto ocurre por lo general en la fase de establecimiento y multiplicación. Entre las principales fuentes de contaminación bacteriana se citan los explantes, el ambiente de los locales de trabajo, los operadores y las técnicas deficientes de esterilización. Además,

los microorganismos pueden diseminarse por ácaros, trips y hormigas.

Así mismo cabe mencionar que crecen superficialmente en el medio del cultivo donde están los explantes; si están asociadas al tejido vegetal no se distinguen colonias aisladas sino una masa bacteriana en forma de pliegues, halos o rosetas en el interior del medio sólido ver fig. 3. y se aprecia abundante y escaso crecimiento sobre la superficie. En el medio líquido forman turbidez uniforme o no, películas o sedimento e incluso tienen la habilidad de licuar el medio sólido.



Figura 3.
Contaminación por bacterias

Aspectos a considerar en la contaminación en Laboratorio de Biotecnología Vegetal

- Contaminación de las plantas madres

La recolección de plantas madres es muy importante, ya que puede constituirse en la mayor fuente de contaminación. Es más fácil detectar contaminantes en los tejidos maduros de las plantas madre, porque generalmente manifiestan los síntomas (manchas con bordes aceitosos).

- Contaminación en el explante

El tipo de explante es muy importante de ello depende que los microorganismos ectófitos endofitos de las plantas pueden ser introducidos al cultivo in vitro. Bajo la técnica de cultivo de meristemas, pueden ser eliminados muchos de ellos pero en explantes de hojas, peciolo o tallos en su mayoría pueden ser introducidos.

Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociados a los tejidos de las plantas, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores donde quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma se introducen en el cultivo de tejidos, se propagan con el material vegetal y pueden manifestarse sobre los medios de cultivo en la

fase de establecimiento o permanecer sin expresarse por largos períodos de tiempo hasta llegar a la fase de multiplicación donde puede aparecer con mayor frecuencia.

- Contaminación del ambiente

El ambiente de laboratorio o de trabajo es una fuente de contaminación ya sea directa o indirectamente. A través de las corrientes de aire las partículas de suelo cargadas de esporas son arrastradas y penetran a los locales por los acondicionadores de aire; son transportadas o introducidas por el laboratorista o el visitante y permanecen en el ambiente por condiciones higiénicas inadecuadas.

- Aspectos a considerar para evitar la contaminación del ambiente

Se requiere el mantenimiento de condiciones asépticas.

- El uso de aires acondicionados, los cuales intercambian constantemente aire con el ambiente, elevan las probabilidades de entrada de microorganismos.
- Es importante el estricto mantenimiento de la limpieza para disminuir la carga microbiana ambiental.
- Finalmente la organización adecuada del proceso productivo de las etapas de la micro propagación en laboratorio.

El laboratorista

El Laboratorista interviene directamente en todas las operaciones y es una fuente primaria de contaminantes a través del estornudo, tos, conversación, etc. La presencia de microorganismos contaminantes que son habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano como por ejemplo: *Staphylococcus epidermidis* o *Candida albicans*, generalmente indican ineficientes técnicas de asepsia por parte de los operarios o la mala asepsia de los mismos por ejemplo la higiene al lavarse las manos y la desinfección con alcohol al 70%.

Díaz, M. 2010, menciona que el trabajo dentro de la cabina de flujo laminar es donde el operario puede introducir la mayoría de los microorganismos llegando a ocasionar pérdidas muy costosas entre ellos están las bacterias en ocasiones a diferencia de otros microorganismos no producen crecimiento visible hasta mucho tiempo después de que fueron introducidas.

Asi mismo, Díaz, M. 2010, indica que a altas presiones osmóticas, el pH y determinadas hormonas pueden inhibir o limitar el crecimiento bacteriano. Se ha comprobado que las citoquininas ejercen un efecto bacteriostático sobre ellas.

Por estas razones se precisa de métodos de detección rápidos y seguros, como la transferencia de fragmentos del material vegetal a medios bacteriológicos donde crecen varios representantes de este grupo o también se utilizan componentes de medios bacteriológicos en el medio de cultivo de plantas y el empleo de métodos turbidimétricos.

Los equipos y el instrumental

La esterilización de equipos por calor húmedo en autoclave se emplea comúnmente para eliminar los microorganismos de los medios de cultivo, de la calidad de este paso depende

en gran medida la continuidad del proceso. Los problemas en la esterilización pueden deberse a fallas del funcionamiento de autoclaves o a errores en su manipulación. (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, 2009).

El género *Bacillus*, puede contaminar medios de cultivo por insuficiente esterilización o mal funcionamiento de las autoclaves y puede ser diseminado durante las operaciones con el material vegetal. Por otro lado, las colonias bacterianas pueden detectarse dentro del medio a partir de las 24 horas de preparado y luego emergen a la superficie. Es importante mantener en reposo los medios de cultivo por 24-72 horas para verificar la calidad de la esterilización. La cabinas de flujo laminar si funcionan adecuadamente proporcionan condiciones de asepsia para el trabajo en biotecnología vegetal, pero esto depende en gran medida del uso, cuidado y revisión periódica de los filtros. (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, 2009).

Los equipos destinados al tratamiento de agua (desionizadores, destiladores, etc.) también pueden introducir contaminación; por fallos en el mantenimiento o procedimientos inadecuados, en sus resinas pueden abrirse oquedades donde los microorganismos, principalmente bacterias, se sitúan y multiplican.

En los laboratorio con clima centralizado pueden introducirse y diseminar contaminación cuando la limpieza es ineficiente focos contaminantes y se producen fluctuaciones de temperatura; en los conductos de aire hongos filamentosos como *Cladosporium* sp (hongo verdoso y polvoso). Estos se pueden multiplicar y esparcir.

Efecto de las condiciones ambientales y la fisiología de las plantas

Estos organismos generalmente se convierten en patogénicos en el cultivo de tejidos porque

las condiciones ambientales y la fisiología de las plantas son diferentes *in vitro*. Los medios de cultivo de tejidos contienen todos los nutrientes minerales esenciales para las plantas en concentraciones que son de 3 a 20 veces superiores a las encontradas en los medios usados para cultivo hidropónico in vivo.

Sin embargo, por la adición de azúcar y otros compuestos orgánicos, el medio de cultivo se convierte en un buen sustrato para el desarrollo de hongos, levaduras y algunas especies de bacterias.

La desinfección de la superficie de las plantas no elimina solamente a los microorganismos que pueden convertirse en patógenos *in vitro*, sino también a la microflora antagonista que evita el establecimiento de otros saprófitos y algunos microorganismos patógenos, y en algunos casos estos protegen a las plantas contra ciertas enfermedades del campo. El uso de microorganismos benéficos se ha sugerido como un método alternativo para el control de la contaminación.

La alta humedad en la mayoría de los frascos de cultivo, como los estomas permanecen abiertos y hay una constante presencia de agua en la superficie de las plantas. La ausencia de lignificación y capa de cera muestran que el crecimiento de plantas en campo o invernadero son más susceptibles al ataque microbiano.

Eliminación de los contaminantes de los explantes

Uno de las alternativas es la prevención y tratamiento de los contaminantes que son introducidos con los explantes tomados de las plantas in vivo. Para ello se considera los tres puntos que debe estar dirigido el control y prevención de los contaminantes:

- Tratamiento a las plantas madres.
- Desinfección de los explantes.

- Detección de contaminantes latentes.

Tratamiento a las plantas madres

Las plantas madres deben mantenerse libres de enfermedades por estrictos métodos de control biológico y químico. El número de bacterias y hongos en el tejido aéreo de las plantas usadas como explantes deben ser reducidos además debe ser mantenimiento en invernadero. Los explantes que usualmente son tomados de tejidos aéreos jóvenes de las plantas (meristemos, segmentos nodales, botones florales, discos de hojas, anteras, polen, etc.) están por lo general libres de poblaciones internas detectables de viroides, virus, micoplasmas, bacterias y hongos.

Desinfección de los explantes

Los explantes son desinfectados generalmente por la inmersión en: hipoclorito de sodio o calcio, alcoholes, cloruro de mercurio u otros productos químicos con actividad más selectiva como son los fungicidas, insecticidas y antibióticos.

La mayoría de los biocidas de amplio espectro son no sistémicos, pero los explantes mueren si se les permite que penetren en sus tejidos internos. El éxito de la desinfección utilizando estos compuestos está en que el tejido interno de la planta esté libre de microorganismos contaminantes; sin embargo, si este está infestado por hongos, bacterias, micoplasmas, virus o viroides, estos son inevitablemente transferidos al cultivo de tejidos.

Detección de contaminantes latentes

Los explantes tomados de las plantas madres deben ser testados para la presencia de contaminantes latentes en todos los subcultivos al menos seis meses después de la desinfección, y testados para las bacterias

vitropatógenas a intervalos regulares de dos a tres meses.

Prevención y tratamiento de la contaminación en el laboratorio

Los parámetros probados y los métodos microbiológicos utilizados son similares a los empleados en industrias que elaboran productos asépticos o libres de contaminación, esto incluye:

- El monitoreo de diferentes fuentes de contaminación mediante el testaje regular del aire del laboratorio, la esterilidad del medio preparado y el funcionamiento de autoclaves, flujos laminares e instrumentales, además, la determinación de tasas de contaminación por línea vegetal individual y operadores y por último, la identificación de “organismos indicadores”.
- El medio de cultivo puede contaminarse a causa de una insuficiente esterilización y/o durante la manipulación después del autoclaveo. Esto puede evitarse garantizando que cada ciclo de autoclaveo alcance la temperatura adecuada.
- Las levaduras y los hongos introducidos durante las manipulaciones del medio de cultivo generalmente crecen en forma de colonias visibles después de una o dos semanas de incubación a

temperatura ambiente, y el medio puede haber sido descartado antes de introducir las plantas si se observaron aparentes colonias; sin embargo, los medios son generalmente utilizados antes de que este crecimiento se haga visible y/o son ubicados en locales fríos donde las tasas de crecimiento fungoso son limitadas.

- La detección de las bacterias introducidas durante la preparación del medio es más difícil de acuerdo a lo que se ha explicado en epígrafes anteriores, aunque, el medio puede ser testado por adición de nutrientes extras en forma de caldo nutriente o caldo triptona-soya después de ser vertido. Esto permite el crecimiento bacterial y la detección visible de colonias de microorganismos en el medio.
- La adición de reguladores del crecimiento sensitivos al calor mediante la esterilización del filtro después del autoclavado, permiten que el medio sea autoclaveado por más tiempo. El éxito de la esterilización de los ciclos individuales de autoclaves puede ser monitoreado por la cinta para autoclave u otros indicadores físicos de temperatura o mediante métodos biológicos más precisos que son basados en la sobrevivencia de esporas de *Bacillus*.

Pruebas de sensibilidad bacteriana para cultivo de tejidos vegetales

Cuadro 1. Los halos de inhibición de los diferentes antibióticos en cada una de las bacterias expresados en mm

| Bacteria | Antibiótico | Halo de inhibición mm | Grado de sensibilidad |
|--|---------------|-----------------------|-----------------------|
| B1 gram +  | Levofloxacino | 24,8 | Sensible |
| | Azitromicina | 17,3 | Sensible |
| | cloxacilina | 0 | resistente |
| | Dicloxacilina | 17,6 | intermedio |
| | amoxicilina | 18,3 | resistente |
| B2 gram+  | Levofloxacino | 18 | resistente |
| | Azitromicina | 9 | resistente |
| | cloxacilina | 0 | resistente |
| | Dicloxacilina | 0 | resistente |
| | amoxicilina | 0 | resistente |
| B5 gram-  | Levofloxacino | 25,6 | Sensible |
| | Azitromicina | 7 | Resistente |
| | cloxacilina | 0 | Resistente |
| | Dicloxacilina | 0 | Resistente |
| | amoxicilina | 0 | Resistente |
| B6 gram-  | levofloxacino | 24 | Sensible |
| | azitromicina | 12 | Sensible |
| | cloxacilina | 0 | Resistente |
| | dicloxacilina | 0 | Resistente |
| | amoxicilina | 0 | Resistente |
| B7 gram+  | Levofloxacino | 35 | Sensible |
| | Azitromicina | 26,3 | Sensible |
| | cloxacilina | 30 | intermedio |
| | Dicloxacilina | 26,3 | intermedio |
| | amoxicilina | 15 | Sensible |
| B8 gram-  | Levofloxacino | 31,6 | Sensible |
| | Azitromicina | 25,6 | Sensible |
| | cloxacilina | 21,3 | Intermedio |
| | Dicloxacilina | 28,6 | Intermedio |
| | amoxicilina | 16,8 | Sensible |

Fuente: Pérez &Plata, 2012.

Cuadro 2. Efecto de las bacterias ante diferentes Antibióticos

| Bacteria | Resultados |
|------------------|--|
| Bacteria1 | Es una bacteria de color blanco, se reproduce muy rápido, de acuerdo a la prueba de KOH se determinó que es una bacteria Gram+, ha sido controlada con dos antibióticos: levofloxacina y el otro la azitromicina |
| Bacteria2 | Es una bacteria de color crema, muy invasiva, de acuerdo a la prueba de KOH se determinó que es una bacteria Gram+, ha sido controlada solo con levofloxacina. |
| Bacteria4 | Es una bacteria de color amarillo intenso, Gram- (patógena para las plantas), ha sido controlada con levofloxacina |
| Bacteria5 | Es una bacteria de color crema de invasión circular, es una Gram- (patogénica a plantas), ha sido controlada con levofloxacina |
| Bacteria6 | Es una bacteria de color blanco de lento crecimiento, Gram- (patogénica a plantas), ha sido controlada por dos antibióticos: levofloxacina y azitromicina |
| Bacteria7 | Es una bacteria cremosa de color blanco, de elevación plana, se determinó que es una bacteria Gram+, ha sido controlada por todos los antibióticos utilizados. |
| Bacteria8 | Es una bacteria de color crema, de lento crecimiento, bacteria Gram- (patogénica a plantas), ha sido controlada por todos los antibióticos utilizados. |

Fuente: Pérez & Plata.

A pesar que existen antibióticos específicos para diferentes bacterias gram + y gram- como lo afirma el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, 2009: Las penicilinas son activas principalmente contra las bacterias aerobias gram positivas que no producen betalactamasas, aerobias gram positivas, algunas bacterias gram negativas exigentes y algunas anaerobias. Las aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina) son activas contra otras especies gram negativas, en los resultados se observó que las bacterias 1 y 2 que son gram positivas no han sido controladas por los antibióticos esperados como la amoxicilina.

La levofloxacina demostró tener los mejores resultados por su amplio espectro en el control de bacterias, pertenece al grupo de las quinolonas (quinolonas y fluoroquinolonas) según el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, 2009. Son agentes antimicrobianos estructuralmente relacionados, cuyo principal mecanismo de

acción es inhibir la actividad de la ADN girasa o de la topoisomerasa de muchas bacterias gram positivas y gram negativas.

BIBLIOGRAFÍA

- Boxus, P. H. y Terzi, J. M. 1988. Control of accidental contamination during mass propagation. *Acta Horticulturae*, 1988, vol. 225, p.189-193
- Cruz, M.; Acosta, M.; Leiva, M.; Alvarado, y.; Lezcano, M. 2002. Evaluación del efecto del complejo carbendazim- β -ciclodextrina para el control de hongos filamentosos. *Contaminantes del cultivo in vitro de plantas. Biotecnología Vegetal*. vol. 2, no. 2, p. 73-76.
- Debergh, P. y Zimmerman, R. 1991. *Micropropagation Technology and Application*. Ed. Kluwer Academic Publishers., p. 484.
- Díaz, M. 2010. *Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos*. p. 22-50.
- Fossard, R. A. y De Fossard, H. 1988. Coping with microbial contaminants and other matter in small commercial micropropagation laboratory. *Acta Hort.* vol. 225, p. 167-176.
- Falkiner, F. 1990. Antibiotics in plant tissue culture and micropropagation what are we aiming at?. En:

- Cassells, A. C. (Ed.) Pathogen and Microbial Contamination Management in micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 155-160 p.
- Fontúrbel, F. 2001. Los vitropatógenos: consideraciones generales, detección y eliminación. El portal de Biología y Ciencias de la Salud. vol. 6, p. 1-11.
- Folgueras M. 2001. Microorganismos contaminantes en la propagación masiva de colocasia esculenta y Xanthosoma spp. en la Biofábrica del MINAG en Villa Clara/ Centro Agrícola (Santa Clara) 28, (3): 73-79.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part 1. 2nd. Ed., Exegetics Ltd 130-143 p.
- Kubota, C. y Tadokoro, N. 1999. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. In vitro Cell and Developmental Biol. Plant. vol. 35, no. 4, p. 296-298.
- Hussain, S.; Lane, S. y Price, D. A . 1994. Preliminary evaluation of the use of culture filtrates for the control of contaminants in plant tissue culture systems. Plant Cell Tissue and Organ Culture, vol. 36, p. 45-50.
- Hernández.J. y González. M. 2010. Efectos De La Contaminación Microbiana Y Oxidación Fenólica En El Establecimiento In Vitro De Frutales Perennes vol.31 no.4 La Habana oct.-dic. 2010
- Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio.2009. Normas para realizar las pruebas desensibilidad a los antimicrobianos con discos. Norma aprobada, décima edición M02-A10 Vol. 29 No. Reemplaza a M02-A9. Norma de aplicación mundial establecida mediante el proceso de consenso del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio.
- Leifert, C.; Morris, C. E. y Waites, W. M. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems in vitro. Critical Reviews in Plant Sciences. vol. 13, p. 139-183.
- Leifert, C., Waites, W. M.; Camotta, H. y Nicholas, J. R. 1989. Lactobacillus plantarum; a deleterious contaminant of plant tissue. J. App. Bacteriology., vol. 67, p. 363- 370.
- Meyer, H.; Staden, V.; Allen, S. y Van Staden, J. 1992. The use of antibiotics to control systemic bacteria in vitro cultures of Piper nigrum cv. Kuching. South African Journal of Botany, vol. 58, no. 6, p. 500-504.
- Marcano, D. y Pire, A. 1993. Evaluación de diferentes desinfectantes y funguicidas en el control de sarna común Streptomyces scabies en semilla prebásica de para Solanum tuberosum L. Agronomía Tropical, 1993, vol. 43, no. 5-6, p. 203-215.
- Madoff, S. 1981. Berlin. The L-forms of bacteria. En: Starr, M.; Stolp, H.; Traper, H.; Balows, A. y Schlegel, H. (Eds). The prokaryotes, vol. II Springer-Verlag, A., 2225-2237p.
- Niedz, R. P. y Bausher, M. G. 2002. Control of in vitro contamination of explants from greenhouse and fields grown trees. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. vol. 38, p. 468-471.
- Novat, F. J.; AFZA, R.; 1998. Van Durein, M. Mutagenesis in vitro para el mejoramiento del banano y el plátano (Musa sp). Informe mensual UPEB. Panamá City, 36p.
- Roca, W. y Mrogrinski, L. 1993. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT., 969p.
- Roca, W. y Mrogrinski, L. 1993 y Ramírez, M.; Santos, R. e Isea, 2000.
- Surga, J. G. y Guevara, 1994, Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo in vitro de ápices caulinares de banano (Musa AAA). Fitopatología Venez., vol. 7, no. 1, p. 14-17.

Capítulo 5

Asepsia y Técnicas de Esterilización

Margarita Calle, Mario Coca Morante & Gino Aguirre

5.1. INTRODUCCIÓN

Las condiciones de asepsia en un laboratorio de cultivo de tejidos son de vital importancia. La asociación explante-medio de cultivo y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos (temperatura y luz), forman un ambiente adecuado para el desarrollo y proliferación de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) y que generalmente, son considerados contaminantes. Cuando se produce el desarrollo de estos microorganismos en los medios de cultivo, pueden destruir o competir con el explante; por esta razón, el éxito para alcanzar la asepsia en un laboratorio, en gran medida depende del control y prevención de la contaminación microbiana (Alvarado, 1998 y Mroginski *et al.*, 2004). Conocer el tipo y característica del microorganismo contaminante y lograr ubicarlo taxonómicamente ayuda a determinar las fuentes de contaminación y proporciona información valiosa para trazar las estrategias de control adecuadas (Alvarado, 1998).

Las técnicas de esterilización en un laboratorio de cultivo de tejidos están orientadas a reducir las contaminaciones provenientes de microorganismos. En general se conocen diferentes técnicas, las cuales deberían ser utilizadas integralmente o en función a la prioridad de cada laboratorio.

5.2. FUENTES DE CONTAMINACIÓN

Las fuentes de contaminación pueden ser originadas a partir de dos vías: los microorganismos del explante y los introducidos en laboratorio.

5.2.1. Microorganismos del explante

Los microorganismos que infectan los cultivos de tejidos vegetales *in vitro* comprenden a las bacterias, los hongos y levaduras. Entre estos se incluyen varios géneros de bacterias (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*) y de hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Neurospora*) que están frecuentemente en los cultivos (Mroginski *et al.*, 2004).

En el caso de levaduras, por la similitud de sus características, se confunde con mucha frecuencia con bacterias y esa es la causa de que en la mayoría de los laboratorios la contaminación bacteriana se estime mucho más alta de lo que en la realidad es (Leifert *et al.*, 1994).

5.2.2. Contaminantes introducidos en laboratorio

Los microorganismos que se introducen en el laboratorio son generalmente habitantes del suelo que se encuentran en el ambiente, sean saprófitos o patógenos de las plantas (Alvarado, 1998). El aire también contiene una gran cantidad de microorganismos en suspensión como esporas de hongos o bacterias, siendo la principal vía para su diseminación. Otras vías son los mismos tejidos vegetales (microorganismos endofíticos, patógenos internos del explante) y el cuerpo humano a través de la piel y la transpiración, que es transporte de múltiples microorganismos (Boccon, 1989; Hernández & Nápoles, 2000).

La contaminación interna en las plantas es a menudo por la presencia de bacterias de tipo *Bacillus linchiformis* y *Bacillus subtilis*. Estas bacterias saprofíticas se encuentran también frecuentemente distribuidos en los laboratorios de microbiología (Pierik, 1987).

Entre los hongos filamentosos contaminantes (Alvarado, 1998), los géneros encontrados con mayor frecuencia son *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Neurospora*.

La detección e identificación de los microorganismos contaminantes son aspectos importantes para el éxito de los cultivos. Para esto conviene inspeccionar visualmente con la ayuda de un microscopio estereoscopio los cultivos en forma periódica (por lo menos semanalmente). También se pueden realizar pruebas con medios de cultivo diferenciales y pruebas bioquímicas específicas (Roca & Mroginski, 1991 y Alvarado, 1998).

5.3. PREVENCIÓN DE CONTAMINANTES DE LOS CULTIVOS

Para evitar y/o minimizar las contaminaciones de los cultivos con microorganismos es

necesario tener en cuenta los siguientes aspectos:

5.3.1. Tratamiento de material de origen

Es necesario conocer el origen del material vegetal con el que se trabaja y los posibles contaminantes, además de realizar una adecuada preparación de la planta donadora de explantes. Primero, cultivar en invernaderos de cuarentena sobre suelo previamente desinfectado. Segundo, realizar en las plantas aplicaciones con soluciones de fungicidas, insecticidas y acaricidas, con la finalidad de reducir las posibles fuentes de contaminación en el momento del establecimiento de los explantes. El material vegetal debe inicialmente ser lavado en detergente y separado de residuos de tierra y de partes maltratadas antes de ser llevado a la cámara de siembra.

5.3.2. Esterilización de medios e instrumentos de cultivo

Es importante emplear medios e instrumentos libres de cualquier microorganismo. Para este propósito todos los medios, equipos e instrumentos a ser utilizados deben encontrarse previamente esterilizados. La esterilización de éstos se puede realizar mediante el uso del calor en sus diversas formas: calor húmedo o calor seco, conforme a procedimiento e instrucciones específicas para cada caso. Por ejemplo, es importante la previa desinfección de las paredes de la cámara de flujo laminar con etanol al 70% y la desinfección exterior de todos los recipientes con medios de cultivo o materiales que ingresen al área de aire estéril.

5.3.3. Asepsia de personal y ambientes

Tanto el personal como los diferentes ambientes deben mantenerse lo más pulcros posibles. Es importante que los laboratorios cuenten con medios mínimos para el manteni-

miento de accesos que eviten el ingreso directo de fuentes de contaminación. Asimismo, es importante la aplicación de las normas estrictas de manejo de laboratorios.

5.3.4. Cultivo de los explantes en cámara de flujo laminar

La siembra de los explantes debe ser estrictamente realizada en cámaras de flujo en condiciones esterilizadas y adecuadas de volumen de aire a objeto de evitar la contaminación de los explantes.

5.3.5. Incubación de los cultivos en cámaras de crecimiento estéril

Los cultivos *in vitro* deben incubarse en ambientes estériles, sin corrientes de aire para evitar posibles fuentes de contaminación.

5.4. TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN

Varias técnicas son empleadas para la esterilización de vidriera, instrumentos, líquidos, y material inicial de la planta. Dodds & Roberts, (1985), Pierik, (1987) y Roca & Mroginski (1991) indican que los métodos de esterilización pueden ser clasificados en métodos físicos y métodos químicos.

La destrucción o eliminación de los microorganismos puede realizarse por métodos físicos o químicos a través de los cuales se destruye toda forma de vida microbiana, inclusive las esporas bacterianas, empleando en cada caso un agente destructor de microorganismos (desinfectante) específico, o la combinación de varios, logrando así las condiciones de ausencia total de microorganismos (Melé, 1992).

No existen instrucciones específicas relacionadas con algún método de esterilización, sin embargo, existen algunas sugerencias generales relacionadas con los procedimientos.

5.4.1. Métodos físicos

a) **Calor.** La utilización y eficacia de este método, depende de dos factores: el tiempo de exposición y la temperatura. Todos los microorganismos son susceptibles, en distinto grado, a la acción del calor. El calor provoca desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidantes irreversibles en los microorganismos.

Se puede usar en forma de llama directa, de calor húmedo (vapor) o de calor seco (aire caliente). Cuando se utiliza el calor húmedo, puede ser en forma de vapor abierto o de vapor bajo presión (Dodds & Roberts, 1985, Pierik, 1987).

b) **Calor directo.** El calor directo o flameado se emplea para escalpelos, espátulas, pinzas y otros materiales metálicos. Los instrumentos deben ser colocados antes en alcohol etílico al 96% durante 2-3 minutos y luego pasarlos por el fuego. En laboratorios con mayores recursos se utilizan en las cámaras de flujo laminar, equipos de calor con perlas de vidrio, con una resistencia eléctrica interior que permite esterilizar el instrumental cuando el mismo se deposita durante algunos minutos.

c) **Calor seco.** El calor seco se emplea en estufas de aire caliente y es aceptable para matar microorganismos por destrucción oxidativa de los componentes celulares jugando un papel importante el contenido de agua de la célula.

La esterilización en estufas mediante calor seco o aire caliente es recomendable para esterilizar recipientes de vidrio como pipetas, cápsulas petri y tubos. En estos casos se expone estos materiales durante 1 a 2 horas en estufas a 180-200 °C los cuales brindan excelentes resultados (Mroginski *et al.*, 2004).

d) **Vapor bajo presión (autoclave).** El vapor bajo presión es un método eficaz para destruir microorganismos (bacterias y hongos

y sus esporas) causa la desnaturalización irreversible de las proteínas y en consecuencia, la muerte celular. Es usada para esterilizar los medios de cultivo, agua destilada y todo elemento capaz de resistir las elevadas temperaturas sin descomponerse. También se emplea para el material de vidrio e instrumentos y para esterilizar material contaminado antes del lavado (Biondi & Thorpe, 1981, Pierik, 1987, Roca & Mroginski, 1991).

El autoclave permite esterilizar los medios de cultivo a una presión de 15 lb/pulg² durante 20 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente 121°C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida en cinco minutos.

El tiempo requerido de exposición en el autoclave dependerá tanto del tipo del material que se va a esterilizar como de su cantidad (Biondi & Thorpe, 1981; Pierik, 1987). El tiempo mínimo recomendado para esterilizar en autoclave medios de cultivos y otros materiales es:

- Frascos con medios de cultivo de 25-50ml por 20 min a 121° C
- Frascos con medios de cultivo de 50-500 ml por 25 min a 121° C
- Frascos con medios de cultivo de 500-5000 ml por 30 min a 121° C

El tiempo de esterilización de la vidriería no es crítico y generalmente es de 10-15 minutos como tiempo mínimo, a 15 lb/pulg² (1 Kg/cm²) a 121° C. Los instrumentos como pinzas, tijeras, mangos de bisturí, etc. o material de vidrio como cápsulas petri se envuelven en papel estañado o en algún papel que aisle el material a esterilizar del medio externo (papel sábana o papel madera), aunque también pueden ser colocados en cajas metálicas para someterlos a esterilización.

Es importante tomar en cuenta que a temperaturas elevadas durante y después del periodo en el autoclave, en los medios

de cultivo puede ocurrir una serie de problemas como: la degradación de algunos componentes del medio, precipitación de sales, descomposición de azúcares (D-glucosa, y D-fructuosa), pérdida de efectividad de: las giberelinas en un 90%, del ácido absícico, degradación de vitaminas: B1(tiamina), B12 (cyanocobalamina), ácido pantoténico, ácido ascórbico y antibióticos; además, el pH del medio baja de 0,3 a 0,5 unidades (Biondi & Thorpe 1981, Pierik, 1987 y Boccon, 1989). En estos casos es necesario conocer los componentes termolábiles y se debe utilizar otro método de esterilización como la filtración.

5.4.2. Filtración

La filtración se emplea en general para esterilizar algunos componentes termolábiles del medio como: vitaminas, reguladores de crecimiento, antibióticos, etc., que son añadidos después al medio esterilizado en autoclave. El método de filtración o esterilización en frío consiste en usar una gran variedad de filtros, que son empleados para separar los microorganismos de las soluciones. Los más adecuados son las membranas con una porosidad entre 0,22 y 0,4 micras, fabricados con acetato y nitrato de celulosa, previamente esterilizados. Estos filtros, dada su porosidad, son específicos para evitar por completo el paso de todas las bacterias y microorganismos del tipo eucariótico (Dodds & Roberts, 1985, Pierik, 1987).

5.4.3. Rayos Ultravioleta

Los rayos ultravioleta (U.V.) más efectivos están entre los 2.500-2.800 Å. Con poco poder de penetración en la materia y de acción superficial. Son absorbidos fuertemente por las proteínas y los ácidos nucleicos; sus efectos nocivos sobre las células se centran en la alteración de la sustancia nuclear.

Las radiaciones ultravioletas tienen un amplio uso en el laboratorio para esterilizar cuartos de siembra. También pueden utilizarse para eliminar microorganismos del aire y superficies de trabajo. Sin embargo se debe tener cuidado a la exposición porque resultan ser peligrosos para el ser humano.

a) Métodos químicos. Los métodos químicos provocan la pérdida de viabilidad de los microorganismos.

- *Desinfectantes.* Los desinfectantes químicos inhiben o destruyen los microorganismos nocivos evitando su desarrollo en el material vegetal cultivado *in vitro*. Estos se utilizan para descontaminar material vegetal, mesas de trabajo, pisos, equipos y otros materiales de laboratorio.

Los principales factores que deben considerarse cuando se utilice un agente químico para matar o inhibir un microorganismo son (Hernández & Nápoles, 2000):

- Tipo de microorganismo.
- Acción del producto químico sobre el tejido o sustancia.
- Reacción del tejido o sustancia.
- Propiedades venenosas del agente químico.
- Tiempo de que dispone el agente químico para actuar.
- Concentración a la que debe ser empleada el agente químico.

b) Desinfectante para superficies, pisos y materiales de laboratorio. Los desinfectantes de uso común en laboratorio son:

- El formol comercial, el cual es una disolución acuosa del 27-40% de aldehído fórmico y una pequeña cantidad de

alcohol metílico. Una disolución acuosa de aldehído fórmico a la concentración de 0,1-0,5% es antiséptica para la mayor parte de los microorganismos; a la concentración de 5-10% es altamente germicida (Hernández & Nápoles, 2000).

- Alcohol al 70% para superficies, manos, frascos, desde segundos a algunos minutos y al 96% para esterilizar instrumentos por flameo.
- Hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio en concentraciones de 0,1 hasta el 2% para superficies desde 2 hasta 30 minutos.
- Jabones y detergentes. Para manos y brazos.

c) Desinfectantes para material vegetal.

Antes de poner el material vegetativo en contacto con el agente desinfectante, se sumerge en alcohol (etanol) al 70% v/v durante 15 a 30 segundos, con lo cual se elimina las grasas de las hojas y se permite una mejor penetración del agente desinfectante en los explantes.

Existen varios compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes (Cuadro 1). El hipoclorito de sodio (NaOCl) contenido en productos de uso doméstico (Clorox, Lavandina y otros). Con menor frecuencia se usa el hipoclorito de calcio Ca (ClO)₂ y muy excepcionalmente el cloruro de mercurio (HgCl₂), aunque hay que recalcar que este compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante (Dodds y Roberts 1985, Pierik 1987, Bocón 1989; Roca & Mroginski, 1991).

A continuación se presenta la tabla de desinfectantes mas comúnmente utilizados:

Cuadro 1. Desinfectantes químicos usados en cultivo de tejidos vegetales

| Desinfectante | Concentración (%) | Tiempo de desinfección (min.) |
|-----------------------|-------------------|-------------------------------|
| Hipoclorito de Calcio | 2 - 10 | 5 - 30 |
| Hipoclorito de Sodio | 0,5 - 5 | 5 - 30 |
| Agua oxigenada | 3 - 12 | 5 - 15 |
| Alcohol etílico | 70 - 95 | 5 - 15 |
| Cloruro de mercurio | 0,1 - 1 | 2 - 10 |

Fuente: Catálogo Sigma (1990).

En algunos casos resulta útil el agregar un agente tenso activo, por ejemplo Tween-20 o Tween 80 (0,08 a 0,12% de concentración) que permiten bajar la tensión de la superficie de los explantes y permite un mejor contacto con los desinfectantes.

Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes, es necesario remover de él los restos del producto mediante varios lavados con agua destilada previamente esterilizada. A pesar de la óptima desinfección de los explantes, en algunos casos se observa la presencia de microorganismos internos (bacterias endógenas) dentro la planta, que representan un problema considerable para el establecimiento *in vitro*.

Los antibióticos y fungicidas aplicados al medio de cultivo pueden ser de utilidad para la desinfección de los explantes. No obstante, muchos autores coinciden que el empleo de éstos solamente se justifica en casos de excepción, y en cultivos de corta duración, ya que no previenen la proliferación de todos los microorganismos. Además, tales productos modifican la composición de los medios de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes. Asimismo, muchos son fitotóxicos para las plantas (Roca & Mroginski, 1991; Falkner, 1996). Sin embargo, es importante recalcar que sólo en casos de contaminación persistente o frecuente se deben acudir a los antibióticos en los medios de cultivo y no así como una práctica rutinaria, es decir, la tendencia al uso de químicos debe ser menor.

Entre algunos fungicidas que con frecuencia han sido utilizados en diferentes laboratorios se mencionan al Benlate (0,1%), Bavistín y Captán. El procedimiento consiste en la inmersión en cualquiera de las soluciones y enjuague en agua estéril.

Pollock *et al.* (1983) citado por Gratapaglia & Machado (1997), estudiaron más de 20 antibióticos en protoplastos de *Nicotiana plum-baginifolia* y concluyeron que los menos tóxicos son los betalactamatos: ampicilina, carbelina y cefalosporinas que son de amplio espectro y menos tóxicos en concentraciones mínimas. Los antibióticos del grupo de aminoglicosidos como: estreptomina, neomicina, kanamicina y gentamicina son menos recomendables por su toxicidad.

Los antibióticos más utilizados contra bacterias son: Ampicilina (100 mg/l), Sulfato de gentamicina (50 mg/l), Estreptomina (100 mg/l), y contra hongos: Anfoterín (2,5 mg/l), Nistatín (50 mg/l) (Hernández & Nápoles, 2000).

En la actualidad han aparecido soluciones biocidas que matan bacterias y hongos, previenen la germinación de esporas y a concentraciones altas pueden eliminar las contaminaciones de microorganismos endófitos. Uno de estos compuestos es el PPM (Plant Preservative Mixture), (Mroginski *et al.* 2004). Otro ejemplo es el denominado G-1 desarrollado por el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de las Villas en Cuba, este producto es derivado de los furfuralos de la caña de azúcar el cual

tiene la siguiente fórmula química: 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno. Estos compuestos tienen las siguientes ventajas: 1) Efecto bactericida y fungicida de amplio espectro, probado en los principales contaminantes que se presentan en cultivo *in vitro*, en dosis que no sobrepasan los 35 mg/l. 2) No presenta efecto fitotóxico a las dosis que controla la contaminación en caña de azúcar, papa, banano, forestales y otros (Pérez *et al.*, 1998).

5.5. MEDIOS PRÁCTICOS PARA EL CONTROL DE FUENTES DE CONTAMINACIÓN

Algunas consideraciones mínimas de manejo y operación en laboratorio para evitar contaminaciones son las siguientes:

- La verificación y control de todas las operaciones y tareas donde es probable la introducción de microorganismos incluyendo principalmente al operario mismo (Alvarado, 1998).
- El orden y mantenimiento de regímenes de limpieza y de higiene en todos los locales de trabajo como pisos, paredes, puertas, y ventanas, a fin de disminuir la carga microbiana ambiental (Biondi & Thorpe, 1981).
- El mantenimiento de un ambiente estéril durante los trabajos de cultivo de tejidos vegetales, para evitar la contaminación microbiana y no utilizar tiempo valioso en la repetición de experimentos (Roca & Mroginski, 1991).
- La revisión periódica del estado técnico de los equipos y los locales de trabajo para localizar fisuras o aberturas por donde pueden penetrar los insectos y el polvo; si existieran, éstos deben sellarse inmediatamente.
- El empleo de guardapolvos, guantes y máscaras protectoras de la boca y de la nariz, así como gorros protectores de cabellos. Estos ayudan a reducir los riesgos de contaminación por el factor humano así como con el perfeccionamiento y respeto de las medidas de asepsia, (Dodds & Roberts, 1985; Mroginski *et al.*, 2004).
- Los frascos o tubos de ensayo que contienen el material limpio sellado con parafilm o bandas de film plástico.
- Desde un punto de vista práctico la mejor medida es descartar o autoclavar los frascos contaminados, si no es posible, se debe realizar tratamientos curativos con antibióticos (Grattapaglia & Machado, 1997; Orozco, 2004).
- Aplicación de insecticidas o trampas en los sitios de entrada para el control de insectos y mantenimiento de una estricta higiene. Una forma práctica de utilizar antibióticos es humedecer pequeños trozos de papel filtro previamente esterilizado en el antibiótico, y a diferentes concentraciones. Una vez secos estos papeles, se los introduce en los medios de cultivo contaminados hasta lograr el control definitivo de las bacterias.

5.6. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, C.Y. 1998. *Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas*. Pérez, J.N. (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Ed. GEO. Las Villas, Cuba, pp. 81-102.
- Biondi, S. & Thorpe, T.A. 1981. *Requeriments for a tissue culture facility*. Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. California, USA Ed. Academic Press; Inc (London) Ltd., pp. 3-7.
- Boccon G.J. 1989. *La technologie de la culture in vitro*. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. H. Vidalie (ed.). 3ra Ed. Paris, Francia, Jb. Bailliee, pp. 31-47.
- Dodds, J.H.; Roberts, I.W. 1985. *Experiments in plant tissue culture*. 2da Ed. New York, USA, Syndicate of the University Press, Cambridge, pp. 232.
- Falkiner, F. 1996. *Antibiotics in plant tissue culture and micropropagation*. Abstracts of the Second International Symposium on Bacteria and Bacteria contaminants of Plants Tissue.

- Culture. Cassells, A.C. y B. Hayes (eds.). University College, Cork, pp. 13.
- Grattapaglia, D, & Machado, M.A. 1997. *Micropropagación*. Curso de Sistemas de micropropagación de plantas. Cood. Torres, A. C. Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuaria. Centro Nacional de pesquisa de Hortalizas. Ministerio de Agricultura y Abastecimiento. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Programa Cooperativo para el desenvolvimiento. Tecnológico Agropecuario del cono Sur. (PROCISUR). Brasilia, D.F., pp. 71-79.
- Hernández, G. & Nápoles, H.N. 2000. "Técnicas Asépticas". Consultado 20 de dic. 2004. En: <http://www.isch.edu.cu/biblioteca/anuario2000/MONO-AGRON-tecnicas.htm> - 101k
- Leifert C.; Morris C.; Waites W. 1994. *Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plant: reasons for contamination problems in vitro*. Critical Reviews in Plant Sciences. 13:139-183.
- Melé, G.E. 1992. *La micropropagación de plantas ornamentales*. Agrícola Vergel. 11(123):271-274.
- Merino M.M. 1987. *Técnicas de esterilización y manipulaciones asépticas*. Daniel, Hurtado; y Maria E. Merino Manzanares. Cultivo de tejidos vegetales. México DF., Ed. Trillas, pp. 44-46.
- Mroginski, L., Sansberro, Flaschland, E. 2004. "Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales" (Capítulo 2). En: http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap2.pdf
- Orozco, C. 2004. "Situación actual de la Biotecnología en Guatemala". *Agronomía Tropical*. 36(4-6): 5-14. Formato de archivo: PDF/Adobe Acrobat. Consultado 23 de dic. 2004. En: http://www.eco-index.org/search/pdfs/845report_4.pdf -
- Pérez, P.J.N. et al. 1998. *Aumento de la Eficiencia en la Micropropagación*. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. J.N. Pérez Ponce. Las Villas, Cuba, pp. 179-190.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht, Boston, Martinus Nyghof publishers. pp. 344.
- Roca, W. M.; Mroginski, A.L. 1991. *Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales*. 1991. In CIAT. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Mroginski, A.L., Roca, W. M. (eds) Ed CIAT. Cali Colombia, pp. 1-17.
- Roca, W. M.; Mroginski, A.L. 1991. *Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro*. En Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Mroginski, A.L., Roca, W. M. (Eds.). Ed. CIAT. Cali Colombia, pp. 20-40.

Capítulo 6

Medios de Cultivo

Cecilia Ugarte, Carmen L. Villarroel, Gino Aguirre & María State

6.1. INTRODUCCIÓN

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el desarrollo del cultivo *in vitro* y en su mayoría están conformados por una serie de componentes generales y específicos, cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización (George, 1993 a).

El medio M&S (Murashige & Skoog, 1962) es considerado como el medio basal más utilizado en la regeneración de plantas puesto que es apto para el desarrollo de varias especies, sin embargo, existen numerosas variaciones comerciales de este medio que son utilizados de acuerdo al requerimiento del cultivo (Evans *et al.*, 1984).

6.2. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo están conformados por: sustancias minerales (macro y micronutrientes), vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. Estos medios pueden ser líquidos o tener un soporte sólido (George, 1993 a).

6.2.1. Sales minerales

a) *Macronutrientes.* Los macronutrientes son constituyentes esenciales para el crecimiento de los tejidos vegetales debido a que intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas (Bengoa, 1990).

Estos macronutrientes proveen los seis elementos indispensables: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S). La concentración óptima de cada nutriente para alcanzar la máxima tasa de crecimiento varía considerablemente entre especies y la finalidad del cultivo (De Fossard, 1984).

b) *Micronutrientes.* Los micronutrientes representan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales micronutrientes son: Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu) y Molibdeno (Mo). Algunos medios contienen Cobalto (Co), Yodo (Y) y Cloro (Cl), aunque no son esenciales para el crecimiento (George & Sherington, 1984).

6.2.2. Reguladores de crecimiento

Se entiende por reguladores de crecimiento a las hormonas vegetales, las mismas que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. El término “sustancias reguladoras del crecimiento” es más general y abarca a las sustancias, tanto de origen natural como sintetizadas en laboratorio que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo en la planta.

Las fitohormonas son las moléculas responsables del desarrollo, aunque no se sabe bien cómo actúan en las células. Se sabe que su mecanismo de acción es por interacción con un receptor específico (la sensibilidad de un tejido hace referencia a su número de receptores) y que su modo de acción, una vez recibida la señal, es por transducción.

Se denomina nivel activo de una hormona a las formas que desencadenan respuestas. Es necesario un control u homeostasis hormonal, el cual es importante para el control del crecimiento y la defensa ante situaciones eventuales como cerrar constantemente los estomas en sequía. Para ello existen diversos mecanismos:

- *Biosíntesis*: es la fabricación de hormonas para aumentar su concentración.
- *Degradación catabólica*: es la eliminación de las hormonas para conseguir el efecto contrario.
- *Transporte*: se trata de llevar hormonas de zonas de afloramiento a zonas de déficit o de transportarlas al lugar donde se necesita su acción.
- *Conjugación*: es la modificación de hormonas (añadiendo azúcares o aminoácidos principalmente u otras moléculas de bajo peso molecular). Sirve como paso inicial en la degradación de éstas, para poder

almacenarlas, buscando su mayor eficacia en el transporte o para inactivarlas.

- *Compartimentación*: sirve para aumentar o disminuir los niveles hormonales.

a) **Auxinas**. Scott citado por Krikorian (1991), menciona que son las primeras hormonas que se describieron. Su estructura es un derivado del fenol o el indol, y tienen anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados. Todas las auxinas son ácidos. No se sabe el modo de acción pero éste está relacionado directamente con su estructura, ya que si se modifica pierde su función. Las auxinas pueden ser naturales o sintéticas, las principales son:

- *Naturales*:
 - Ácido indolacético (AIA)
 - Conjugados del AIA (glicoproteínas, pequeños péptidos)
- *Sintéticas*:
 - Derivados indólicos, ácido indolbutírico (IBA)
 - Derivados del naftaleno: α -naftalénacético β -naftalénacético (α NAA, β NAA)
 - Derivados del fenoxiacético y del ácido benzoico: 2,4 diclorofenoxiacético (2,4,D) y 2,6 diclorofenoxiacético (2,6,D). Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram)

Efectos

- *Crecimiento*: estimulan la elongación celular en tallos y coleoptilos (tallos jóvenes), incrementan la extensibilidad de la pared celular y estimulan la diferenciación del xilema y el floema.
- *Tropismos*: responsables del fototropismo y gravitropismo positivo de las raíces (García *et al.*, 2008).
- *Dominancia apical*: la yema apical del tallo inhibe el crecimiento de yemas axilares cercanas.

- *Abscisión* de órganos (hojas, flores y frutos): posee un control genético y las auxinas retrasan la caída, aunque el etileno la induce.
- *Rizogénesis*: estimulan la formación de raíces laterales o adventicias. Inhiben la elongación de la raíz principal. George (1993 b), señala que las concentraciones óptimas de auxinas varían de 0,1 a 10 mg/l.

b) Giberelinas. Son hormonas que proceden de una estructura química, no de una función concreta. Su estructura química deriva del ent-giberelano. Es un grupo de hormonas muy heterogéneo, son de muchas formas aunque pocas con función. Hay 130 distintas repartidas en distintos reinos y especies.

Todas son ácidos, y se denominan GAX, siendo x un número del 1 al 130 en función del orden de descubrimiento.

Efectos

- *Estimulan el crecimiento* de los tallos (elongación) e hipocótilos. Tienen un papel mayor que las auxinas en plantas con crecimiento de entrenudos. En la reproducción estimulan la floración, sobre todo en aquellas plantas con floración por factores ambientales o floración del día largo como las coníferas. No son universales, en algunas especies puede inhibir la floración (angiospermas leñosas y frutales). Producen partenocarpia (reproducción sin fecundación donde el fruto se genera sin semillas). Tienden a producir plantas masculinas en especies dioicas. Provocan la reversión a fases juveniles de la planta. Pueden suplir los fotoperíodos y los termoperíodos necesarios para el crecimiento.
- *La germinación* es su principal efecto. Casi todas las semillas germinan inducidas por GA. Posibilitan la movilización de reservas en la semilla. Sustituyen requisitos ambientales (Zrýd, 1988).

Roca (1997), menciona que el uso del AG_3 ha demostrado ser bastante activo, en concentraciones óptimas de 0,01 a 1 mg/l, debido a que niveles superiores a 1 mg/l son tóxicos para el desarrollo del explante.

c) Citoquininas. Son un grupo más reducido de hormonas que deben su nombre a su función (citoquinesis). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular.

Derivan de adeninas y las más frecuentes son:

- *Naturales*

La zeatina N6 (N6-4 Hidroxi, 3 metil, 2 butiril), posee un doble enlace en el centro de la cadena y tiene isómeros cis y trans que parecen ser formas naturales. La zeatina puede estar en la base siguiente al 3' del anticodón del ARNt.

No purínicas como el Thidiazuron, (TDZ) y el CPPU N-(2-cloro-4-piridil)-N-fenil úrea. Estos compuestos tienen una actividad histoquímica muy alta y son muy eficientes en la propagación *in vitro* de las plantas maderables (Del Solar, 1985).

- *Sintéticas*

La quinentina (KIN), N6 Benzylaminopurina (BAP), N6benciladenina (BA), N6 dimetil alil aminopurina (2ip) (Mejia, 1994).

Efectos

- *Crecimiento*: en conjunto con las auxinas, las citoquininas estimulan la proliferación de células meristemáticas, y también estimulan la expansión de los cotiledones tras el primer haz de luz que reciben George (1993 b).
- *Dominancia lateral*: estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas, por lo que deben estar en equilibrio).

- *Diferenciación y morfogénesis*: provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento. Junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos.
- *Senescencia*: son anti-senescentes (García *et al.*, 2006).

d) Ácido Abscísico. Históricamente se ha considerado como un inhibidor. Se trata de una molécula terpénica de 15 carbonos (sesquiterpeno) similar a los carotenoides pero con algunas particularidades.

Efectos

Estas hormonas proceden de la abscisión de órganos vegetales, pero no es la causante de éste en el 90% de los casos. Es una hormona anti-estrés. Actúa contra el estrés hídrico provocando el cierre de estomas. Contrarresta el efecto de la auxina, pero no inhibe el crecimiento en sí. También provoca el letargo de las yemas (en ese sentido sí es anti-crecimiento). Es esencial para la embriogénesis (formación de embriones viables). Evita la germinación prematura y por eso bloquea las giberelinas.

e) Etileno. Es la molécula C_2H_4 , un hidrocarburo insaturado liposoluble, capaz de transpasar la membrana celular. Es un gas volátil a temperatura ambiente.

Efectos

Sus efectos fisiológicos son:

- *En cuanto al crecimiento*: Interviene en el desarrollo del síndrome de la triple respuesta: el tallo se curva perdiendo el hábito geotrópico normal, se inhibe el crecimiento en longitud de tallos y raíces, y los tallos engrosan (el etileno aumenta el grosor de las células parenquimáticas).
- *Epinastia foliar*: en la zona superior de los peciolo se produce una estimulación temporal del crecimiento. Forma-

ción del “gancho” en plantas dicotiledóneas.

Estimula la elongación en tallos de plantas aromáticas, ya que éstas necesitan tener hojas fuera del medio rápidamente.

El etileno es una hormona de la abscisión casi universal. La abscisión está controlada por la planta de forma pre-determinada. En el peciolo está la zona de abscisión, que con la acción de enzimas rompen las células provocando la caída de las estructuras. Los frutos pueden caer por otro fenómeno diferente a la abscisión. Acelera la senescencia en tejidos vegetales. Es el responsable de la maduración de frutos climatéricos (tomate, manzana, aguacate, excepto en cítricos), y de otros tejidos como las hojas, tallos y flores. En los tomates transgénicos se inhibe la síntesis de etileno.

- *Germinación*: Estimula la germinación de semillas. En cuanto a las aplicaciones agrícolas destacan la inducción de la floración en bromeliáceas, la maduración controlada y el desverdizado (por ejemplo los cítricos pierden el color verde pero el fruto continúa inmaduro).
- *Brotación*: En tubérculos, contribuye a romper la dormancia de los mismos, favoreciendo la emisión de manera uniforme de los brotes para su siembra.

f) Poliaminas. Son compuestos policatiónicos derivados de aminoácidos, por lo que poseen carga positiva, la misma que es mayor cuanto más grande es la molécula. Son esenciales para la vida. Su concentración es 10 veces mayor que la de otras hormonas. Químicamente se parecen a las proteínas. Son muy heterogéneas, poseen tamaños y cargas muy distintas. Las más generales y comunes, en función de su número de NH_2 , son:

- Diaminas: putrescina y cadaverina.

- Triaminas: espermidina.
- Tetraaminas: espermina.

Efectos

Sus funciones son: mucha participación en la división celular, por lo que generalmente abundan más en tejidos jóvenes.

Son esenciales para la morfogénesis (embriogénesis).

- *Formación de raíces*: Estabilizan la membrana celular por ser proteínas.
- *Retrasa la senescencia*: al estabilizar la membrana y al actuar con los ácidos nucleicos evitando la degradación de éstos. Intervienen en el estrés.

6.2.3. Agentes quelatos

López (1990) indica que son necesarios para la síntesis de la clorofila y en muchas funciones de oxidación y reducción, pues son compuestos cuyas moléculas son capaces de adsorber un ión de un metal.

Existen varios agentes quelatantes, pero el más usado es el EDTA (Ácido Etilendiamin Tetra Acético) por ser menos tóxico que otros quelatos y, que en combinación con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en bajas concentraciones, estimula el crecimiento permitiendo la disponibilidad de hierro al cultivo (González, 2004).

6.2.4. Carbohidratos

Margara (1988), señala que los tejidos *in vitro* son organismos heterótrofos y por esta razón es indispensable añadir una fuente de carbono al medio de cultivo, como fuente de energía y regulador osmótico.

La sacarosa es la fuente de energía más utilizada en cultivo *in vitro*, pero en ocasiones se emplean otros carbohidratos como la glucosa, fructuosa, galactosa y maltosa, pero estos compuestos son inferiores a la sacarosa,

que puede ser sustituida por azúcar comercial, llegándose a obtener óptimos resultados (Darias, 1993).

Hurtado & Merino (1994) indican que las concentraciones óptimas son de 2 a 3%, sin embargo, en ciertas especies se utilizan concentraciones muy elevadas de 5 a 12%.

6.2.5. Vitaminas

Las vitaminas son utilizadas como catalizadores en varios procesos metabólicos y son añadidas al medio de cultivo para estimular procesos de crecimiento específicos en los tejidos, y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis (Torres, 1988).

Para Murashige (1974) las vitaminas esenciales para el crecimiento de células en plantas superiores son:

- **Tiamina** es considerada la vitamina imprescindible en el cultivo *in vitro* para un buen crecimiento del cultivo.
- **Myo-inositol** estimula el crecimiento y división celular en muchas especies vegetales con fines de micropropagación. La concentración más utilizada es de 100 mg/l.

Hartmann & Kester (1995), indican que otras vitaminas también han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro* y estas son: piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), pantotenato cálcico (B5), riboflavina, prolina y glicina.

6.2.6. Aminoácidos

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos, aunque cuando más se acude a los mismos es en las experiencias sobre la organogénesis y en la multiplicación vegetativa "*in vitro*". Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de

callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible establecer una regla general (García *et al.*, 2008).

6.2.7. Potencial osmótico

Algunas especies propagadas *in vitro* presentan diversos desórdenes fisiológicos, como la hiperhidratación, debido entre otros factores a la alta humedad relativa en los recipientes. Por ello es importante conocer el potencial osmótico del medio de cultivo en función de la concentración de solutos (Cardenas & Villegas, 2002).

Morard & Henry (1998) citados por Mollinos da Silva *et al.* (2004) mencionan que el potencial osmótico del medio de cultivo tiene efecto directo en los explantes; conforme sea más negativo, menor será la absorción de agua y, por consecuencia, se dificultará la multiplicación de brotes axilares por la baja disponibilidad de los nutrientes del medio. La composición mineral de los medios de cultivo resulta fundamental, ya que tiene un efecto decisivo en el potencial osmótico y el pH del medio, así como en la nutrición de los explantes.

En este sentido, George (1993 a) señala que las células mantenidas en un ambiente con bajo potencial osmótico pierden agua y disminuyen su potencial hídrico, alterando su morfogénesis. Por otra parte, Pierik & Steegmans (1975) citados por Mollinos da Silva *et al.* (2004), indican que el crecimiento y organogénesis de los explantes se detienen cuando el potencial osmótico es más negativo que -0,3 MPa debido a la baja absorción de agua.

6.2.8. Estabilizadores osmóticos

Todos los medios de cultivo de protoplastos contienen estabilizadores osmóticos, conoci-

dos simplemente como osmóticos. Presentan en los protoplastos diferentes niveles óptimos en relación con la presión osmótica y con el tipo de osmótico empleado, si se cultiva en medios no óptimos osmoticamente, es posible que haya un estrés celular y, como resultado, una baja eficiencia del cultivo. Los más comunes son el manitol, el sorbitol, la glucosa y la sacarosa (Takeuchi *et al.*, 1982; Vardi *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1984; citados por Szabados, 1991).

6.2.9. Suplementos no definidos utilizados en la composición de medios de cultivo

Existe una lógica bien documentada tras el uso de sustancias líquidas como el agua de coco que se encuentran en forma natural. Con el uso individual de estas sustancias se obtiene poco efecto por encima del esperado, parece que las sustancias de esta naturaleza pueden desempeñar un papel pequeño pero significativo en la estimulación del crecimiento en los tejidos de explantes, mediante la división celular (Nitsch, 1962; Lee *et al.*, 1965; Paulet, 1970 citados por García *et al.*, 2008).

Se puede anticipar que los investigadores en los trópicos y subtropicos tendrán acceso a una gama de líquidos estimuladores del crecimiento que son de origen novedoso, distintivos o incluso morfológicamente únicos (Steward, 1959; Shantz, 1966; citados por García *et al.*, 2008).

Después de que Gautheret observó que el extracto de levadura tenía efectos sobre las células cultivadas *in vitro*, muchos investigadores empezaron a buscar sustancias orgánicas que pudieran ejecutar algún efecto morfogenético (García *et al.*, 2008).

6.2.10. Carbón activo

El carbón activado presenta cargas residuales, que son capaces de absorber las sustancias

fenólicas excretadas por el explante, normalmente el carbón activo es prelavado antes de ser incorporado al medio de cultivo y las concentraciones varían de 0,1 a 5% (González, 2004). Pierik (1990), describe los siguientes efectos del carbón activo:

- Efecto favorable sobre el crecimiento en (*Annona cherimolia*), debido a la absorción de sustancias tóxicas excretadas por el explante en el proceso de la síntesis fenólica.
- Efecto favorable al desarrollo de raíces debido al oscurecimiento del medio en caña de azúcar.
- Efecto inhibitorio sobre el crecimiento debido a la absorción de reguladores del crecimiento (auxinas, citoquininas) contenidas en el medio (aspecto que no está comprobado).

En la práctica parece que el carbón activo puede proporcionar resultados positivos en algunos casos, mientras que en otros promueve efectos desfavorables tales como la inhibición del sistema radicular en el almendro y mortandad prematura en explantes del melocotonero (Lane, 1982).

6.2.11. pH

Quak (1977) señala que el pH es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de los explantes, el rango óptimo de pH fluctúa de 5 a 6 debido a que las sales se encuentran en forma soluble, valores superiores a 6 presentan problemas de precipitación de nutriente y valores inferiores a 3,5 manifiestan mala gelificación.

6.2.12. Modificación del Potencial Redox

La adición de sustancias antioxidantes al medio nutritivo o el lavado de los tejidos en antioxidantes son los métodos más utilizados para la reducción del Potencial Redox (López, 2000). A continuación se detalla una lista de

antioxidantes utilizados en el cultivo de tejidos:

- **Ácido cítrico y ascórbico.** Son los antioxidantes más utilizados en cultivo *in vitro* para evitar la oxidación de tejidos, son solubles en agua, las concentraciones óptimas oscilan de (1 a 10 mg/l) en ácido ascórbico y (50 a 100 mg/l) en ácido cítrico (Dublín s/f, citado por Roca & Mrogniski, 1991).
- **(PVP) Polyvinilpolypyrrolidona.** Es un polímero sintético soluble en agua muy utilizado en cultivo *in vitro* por sus cualidades antioxidantes (Vellilla, 2002).
- **L-Cisteína.** González (2004) indica que la L - Cisteína es considerada como un agente reductor que absorbe los compuestos fenólicos excretados por el explante.
- **Tocoferol.** Druart (1987) menciona que la vitamina E, actualmente es utilizada como un excelente antioxidante y vitamina para la propagación de una gran variedad de *Prunus*. Así mismo Badia (1982) citado por Seilleur (1989), indica que el Tocoferol es utilizado como antioxidante para la propagación *in vitro* de diversas especies leñosas.
- **Pycnogenol.** El Pycnogenol es un antioxidante natural elaborado a partir de la corteza de *Pinus maritima*, que contiene una combinación de flavonoides que aparecen de forma natural y en pequeñas cantidades en algunas frutas y verduras (Packer & Rimbach, 1999). Vargas (2004), citado por Sánchez (2006), menciona que este compuesto es un antioxidante que reduce la oxidación significativamente en el establecimiento de especies forestales.

6.2.13. Material de soporte

- Medios sólidos.** Los medios líquidos son los medios de cultivo que llevarán distintos componentes que tienden a solidificar y mantener el material cultivado en la super-

ficie. La selección de un agente gelificante para las plantas específicas es generalmente empírica y por razones desconocidas, 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 el cultivo de tejidos por proveer al medio de un excelente gel húmedo, sin embargo, fisiológicamente no es inerte (Hurtado & Merino, 1994).

Villegas (1988) indica que el phytigel® es producido en laboratorio, se caracteriza por ser uno de los gelificantes con menor porcentaje de impurezas, de textura fina y de calidad más consistente que la mayoría de los agares, facilita la detección de cualquier agente contaminante por su apariencia cristalina. Sigma-Aldrich (2003-2004) señala que el phytigel es un gel de alta fuerza, de textura fina descolorida, con 0,85% de Calcio, 0,35% de Magnesio, 1,70% de Potasio, 0,15% Fósforo y 0,45% de Sodio, minerales que facilitan el desarrollo del cultivo.

Pérez & Claire (2004), mencionan que el agente gelificante más económico hasta ahora probado en los laboratorios locales es la carragenina, el mismo se obtiene de algas rojas como principal fuente (McHugh, 2002). Su uso en el Laboratorio de cultivo de tejidos de la FCAyP abarata en un 35% el costo del gelificante (Calle *et al.*, 2006).

b) Medios líquidos. Los medios líquidos son una alternativa interesante para cultivar explantes *in vitro*. Con ayuda de un agitador el medio de cultivo está constantemente homogeneizado y, lo que es más importante, oxigenado. Estas condiciones pueden superar algunas limitantes del medio sólido; sin embargo, puede a su vez suceder una mayor susceptibilidad de los explantes a vitrificarse.

Al momento de utilizar medios líquidos, se puede colocar el explante sobre un puente de papel filtro que permanece en contacto directo con el medio líquido, generalmente este tipo de medios es utilizado en especies con problemas de oxidación (Mejía & Vittorelli, 1996).

6.2.14. Agua

En la micropropagación comercial, rutinariamente se usa agua destilada común, pero para los estudios de investigación se requiere formas más puras: desionizada, bidestilada (Hartmann & Kester, 1995).

Normalmente, se recomienda que el agua sea desionizada, además de estar destilada en condensador de vidrio.

6.3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

6.3.1. Conceptos básicos para la preparación de soluciones

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una técnica basada en la capacidad que tiene una célula vegetal de regenerarse en una planta completa, idéntica a la planta madre, bajo un medio artificial que posee la mayor parte de los componentes que normalmente esta planta extrae del suelo y del medio ambiente, ello para poder regenerarse y desarrollarse.

Siguiendo el mismo concepto, el éxito del cultivo de tejidos *in vitro* radicarán básicamente en la cantidad balanceada de nutrientes que se le brindará a la planta, por lo que una adecuada preparación de los medios artificiales en los cuales crecerá el explante, es una condición determinante para lograr los objetivos que plantea esta técnica. Por otra parte, si bien el trabajo de laboratorio tiene mucho de agradable, resulta ser peligroso si no se toman las precauciones necesarias. Una primera regla para un adecuado trabajo en laboratorio es el de conocer los reactivos químicos, así

como un cuidadoso manejo del material de laboratorio, ya que la mayoría es de vidrio. Dada la característica del presente libro, dirigida principalmente al componente estudiantil, se ha incorporado en el Anexo I algunos conceptos básicos para la preparación de soluciones y un breve recordatorio referente a la preparación de las mismas.

6.3.2. Precauciones en el laboratorio

- Nunca dirigir un tubo de ensayo con líquido hirviendo hacia el vecino, puede causarle daño.
- Nunca forzar un tubo de ensayo dentro de un tapón empujando por el extremo superior; usar la parte inferior y girarlo a medida que empuje.
- Nunca calentar una botella o una probeta.
- Siempre oler una sustancia, llevando vapores de ella suavemente hacia la cara.
- Nunca echar agua en un ácido concentrado, el calor generado puede salpicar o romperse el recipiente. Se vierte el ácido fuerte sobre el agua, lentamente agitando constantemente.
- La limpieza del equipo se hace utilizando agua y detergente, pero si eso no resulta, se puede utilizar ácido nítrico diluido o concentrado y si aún esto no diera resultado, se puede emplear la mezcla sulfocrómica (60 g dicromato de Potasio $K_2Cr_2O_7$ y 300 cc ácido sulfúrico H_2SO_4 GN). Se tiene que manejar con mucho cuidado esta mezcla sulfocrómica porque es muy corrosiva.

6.3.3. Preparación de soluciones madre

Un número importante de sustancias y algunas veces una mezcla de las mismas son adicionadas al medio de cultivo. Las concentraciones de sustancias particulares pueden ser dadas en diferentes medidas (Pierik, 1987). Si cualquier solución precipita no poseerá el equilibrio químico correcto porque algunos

elementos se quedan en el precipitado. Ninguna solución precipitada puede ser usada de una manera efectiva por las plantas. Para evitar la formación de precipitado, cuando se preparan soluciones existen dos alternativas que pueden seguirse: 1) combinar sólo componentes que no forman el precipitado a altas concentraciones o, 2) preparar sólo soluciones bastante débiles que no formen precipitado (Kyte, 1987).

Por otro lado se podrían pesar las cantidades necesarias de todos y cada uno de los componentes del medio. Ello, no obstante, sería una operación larga y tediosa, además de muy imprecisa puesto que obligaría a pesar algunas cantidades muy pequeñas. Por todas esas razones, es una práctica habitual en todos los laboratorios preparar soluciones stock concentradas de los distintos componentes, agrupados de forma que no se produzcan fenómenos de precipitación. Proceder de esa forma simplifica la preparación del medio: un medio como el MS, que contiene un total de 20 sustancias diferentes, requeriría otras tantas pesadas, mientras que a partir de soluciones stock su preparación se reduciría a cuatro medidas de volumen y una pesada (sacarosa). Las soluciones stock pueden mantenerse durante un cierto tiempo en la nevera o en el congelador.

Para una correcta preparación de las soluciones stock se debe:

- Pesar los componentes en una balanza de precisión.
- Asegurarse que el material que entrará en contacto con los componentes de las soluciones se encuentra perfectamente limpio. En caso de duda, lavarlo y hacer un último enjuague con agua destilada para retirar los restos de las sales minerales del agua corriente.
- Mezclar los componentes con la ayuda de un agitador magnético.
- Una vez obtenida la solución stock, etiquetar el recipiente que la contendrá indicando

qué tipo de solución es, su concentración, la fecha en que se preparó y la persona que la hizo.

6.4. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Medir el volumen deseado de las soluciones stock (macro, micronutrientes, quelatos, vitaminas y otros componentes). Para ello, (Anexo II) se realizan cuatro soluciones stock base para la preparación de medio: 1) una de macronutrientes, 2) una de micronutrientes, 3) una de hierro con un agente quelante, 4) otra de vitaminas y mioinositol; así como con soluciones específicas para los demás componentes del medio (reguladores de crecimiento, etc.). Éstas pueden mantenerse durante un cierto tiempo en refrigeración o congeladas (Blanco, 2008).

6.4.1. Ajuste de pH

Una vez obtenido el volumen de medio deseado, completado a volumen con agua destilada, se procede a ajustar su pH al valor prefijado mediante la adición de OHNa y/o HCl 0,1-1 N, para subir o bajar el pH respectivamente hasta obtener el deseado (Hartmann & Kester, 1995).

La adición del gelificante dependerá si el medio a preparar será un medio sólido o un medio líquido. Se añadirá en el primer caso el agente solidificante y se fundirá por calentamiento breve, utilizando horno a microondas o en estufa con agitador.

6.4.2. Adición de la fuente de energía

Se añade junto con el agar diluyéndolo por calentamiento.

6.4.3. Cantidad y distribución del medio

En el caso de medios sólidos, una vez fundidos por calentamiento, éstos deben ser dosi-

ficados en los recipientes escogidos. En el caso de medios líquidos se procederá a dosificar directamente en los frascos escogidos. Tanto si es un medio sólido como líquido, se procederá inmediatamente a autoclavar los contenedores con el medio¹⁵. Para evitar inconvenientes durante el proceso de esterilización, se recomienda no cerrar con fuerza los frascos con tapa a rosca.

6.4.4. Esterilización del medio

La esterilización se realiza en un autoclave a una temperatura de 110 a 120°C, por 20 minutos a 15 lb/in² de presión. Se debe tener cuidado de que la presión del autoclave, nunca rebase las 20 lb/in², ni esté por debajo de las 15 lb/in². Transcurridos los 20 minutos, se desconecta el autoclave. Se abre muy lentamente la válvula para liberar el vapor para que la presión comience a bajar. El autoclave puede abrirse únicamente cuando el manómetro marque cero (Hartmann & Kester, 1995).

Conviene tener en cuenta que algunos de los componentes del medio de cultivo pueden ser termolábiles (algunas vitaminas, reguladores de crecimiento y diversos componentes orgánicos). En este caso, la esterilización de la solución que contiene la sustancia termolábil debe hacerse por filtración y añadirse una vez esterilizada al medio de cultivo previamente esterilizado y parcialmente (en medios sólidos) o totalmente (en medios líquidos) enfriado.

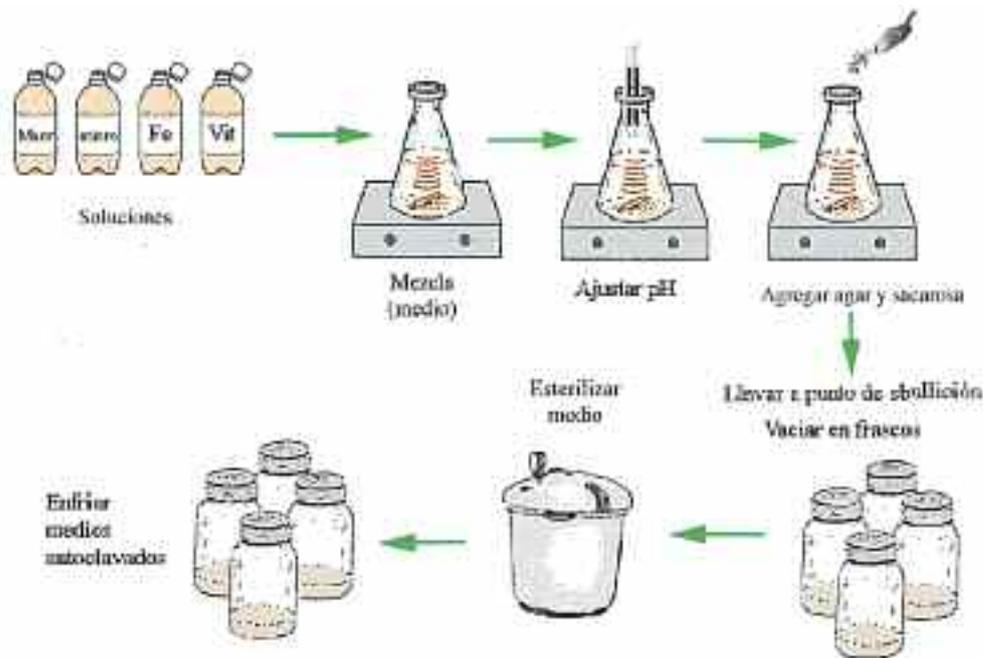
6.4.5. Vida de anaquel del medio

El medio debe usarse en el transcurso de unas dos semanas, y refrigerarse si se conserva por más tiempo (Hartmann & Kester, 1995).

En el siguiente diagrama, se ilustra el flujo del proceso de preparación de un medio de cultivo a partir de soluciones stock (Figura 1).

15 <http://www.etsa2.udl.es/invitro/presolst-htm>

Figura 1. Proceso de preparación del medio de cultivo a partir de soluciones stock



En el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, la preparación de los diferentes medios de cultivo se inicia elaborando las soluciones stock, las mismas que se realizan de acuerdo a protocolos ya establecidos en el Laboratorio de Fitopatología de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux. Las soluciones stock se presentan en el Anexo II.

6.5. BIBLIOGRAFÍA

- Bengoia M. 1990. *Micropropagación del Babaco*. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía Quillota - Chile.
- Blanco A. 2008. *Laboratorio 4: Cultivo in vitro Preparación Medios de Cultivo DUOC UC*. Escuela de Recursos Naturales Ingeniería (E) Agronomía Fisiología Hortícola Fecha de consulta (2009, febrero). En: <http://fisiohorticola.files.wordpress.com/2008/11/laboratorio-medios-de-cultivo.doc>
- Calle, M., Flores, M., Aguirre, G., Angulo, M., Lupa, S., Simon, K. 2005. *Uso de cuatro agentes solidificantes alternativos en la fase de multiplicación de la variedad nativa de papa (Yana kulli)*. Segundo Premio Feria estudiantil Científica Universitaria FCAyP UMSS noviembre 2005. Cochabamba, Bolivia.
- Cárdenas L., Ma A. & Villegas Á. 2002. *Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación in vitro*. Revista Fitotecnia Mexicana Chapingo, Mexico.
- Cárdenas M. 1989. *Manual de plantas económicas de Bolivia*. 2da ed. La Paz - Bolivia.
- Darias R. 1993. *Recopilación de temas sobre técnicas de cultivo in vitro*. Ediciones UTO y UCCM, Cuba. Oruro, Bolivia.
- De Fossard. 1984. *Tissue culture for plant propagators*. 2 Ed. University of New England, department of Botany, Armidale- Australia.
- Del Solar C. 1985. *Usando técnicas del cultivo de tejido. micropropagación de plantas*. ICTA-JOCC. Guatemala - México.
- Druart, P. 1987. *Contribution a l'elaboration de techniques de production en masse in vitro d'especies ligneuses utilisables en culture fruitiere*. Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat Gembloux - Belgique. Tesis Doctoral.
- Evans D., Shar W., Ammirato P. & Yamada Y. 1984. *Handbook of plant cell culture, techniques and applications*. Macmillan publishing Nueva York.
- García M., Hernández R., Bustios S., Esteves M., Echevarria Y., Cruz R., León L. & Busto L. 2008. "Nuevas alternativas en la preparación de los medios de cultivo con la utilización del extracto de Aloe vera L". Departamento de Biología, Departamento Agropecuario de la Universidad de Pinar del Río. Cuba. Fecha de consulta (2009, febrero). En: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/medios-cultivo-aloe/medios-cultivo-aloe.pdf>
- George E. & Sherington P. 1984. *Plant propagation by tissue culture* eastern press. Great Britain.

- George E. 1993(a). Plant propagation by tissue culture the technology. exetetics ltd, 1era ed. England.
- George E. 1993(b). Plant propagation by tissue culture the technology exetetics ltd, 2nd ed, England.
- González S. 2004. Biotecnología vegetal métodos de propagación *in vitro* en plantas. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.
- Hatmann H. & kester D. 1995. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Ediciones Continental, México. D.F.
- Hurtado D. & Merino M. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Ediciones Trillas. México.
- Kyte L. 1987c. Plants from test tubes: An introduction to micropropagation. Hong kong, Lehmann, Timber Press, Inc., pp. 160.
- Lane W. 1982. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. plant sci. lett. Vol. 13. Academic Press, London.
- López, C. 1990. Medios de cultivos fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales, ediciones Cadmo. Roma. FAO.
- López C. 2000. Reacciones de hipersensibilidad en plantas cultivadas *in vitro*, ediciones mundi-Prensa. Universidad Politécnica de Madrid.
- Margara J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro* los meristemo y la organogénesis. Traducido 1era edición. España.
- McHugh, D.J. 2002. Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. FAO Circular de Pesca. No. 968. Roma, FAO, pp. 30.
- Mejía, A. & Vittorelli, C. 1996. Manual de laboratorio, Instituto nacional de investigación Agroindustrial. 1era edición, Colombia.
- Mejía A. 1994. Propagación comercial de 312 especies de plantas por cultivo *in vitro*. Costa Rica Turrialba. CATIE.
- Molinos Da Silva Ch., Villegas M. & Sanchez A. 2004. Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca²⁺ Y K⁺, producción de biomasa y necrosis apical de VID "R110". INCI, vol.29, no.7, ISSN 0378-1844.
- Murashige T. 1974. Plant propagation throught tissue culture. Ann rev plant. Physiology. University of Calgary. Canadá.
- Orellana P. 1998. Propagación vía organogénesis y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba.
- Packer & Rimbach. 1999. "Uso y cualidades del pycnogenol". Fecha de consulta (2009, febrero) En: <http://www.vitabrasilnet.com.br/pycnogenol.htm>
- Pérez J. & Claire C. 2004. Evaluación de medios de cultivo con diferentes agentes gelificantes en micropropagación de espina de mar (*Hippophae rhamnoides* L.). Memorias IV Reunión Nacional de Biotecnología, Santa Cruz, Bolivia.
- Pierik R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, Boston. Martinus Nyghof publishers, pp. 31-42.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones mundi – prensa Vol. III. Madrid, España.
- Quak, F. 1977. Applied and fundamental aspects of plants cell, tissue and organ culture. Reinert j and Bajaj y.p.s, ed. Berlin, Germany.
- Roca W. & Mroginski L. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: Centro internacional de agricultura Tropical cultivos de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia, pp. 970.
- Roca W. 1997. Uso actual y potencial del cultivo de tejidos. Experiencia en el CIAT. En: Conferencia de planificación. Programa Nacional para el Desarrollo de la Biotecnología Agropecuaria y Forestal de Chile.
- Sánchez C. 2006. Estudio Preliminar para la propagación *in vitro* de Tara (*Caesalpinia spinosa* Molina Kuntze). Tesis de grado. Escuela de Ciencias Forestales Universidad Mayor de San Simon. Cochabamba, Bolivia.
- Seilleur, P. 1989. Notes de cours, Culture *in vitro* d' Explants Vegetaux. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Bélgica.
- Sigma-Aldrich. 2003 – 2004. Biochemicals and reagents for life. Science research St Louis Missouri, USA.
- Szabados, 1991. Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas Fecha de consulta (2009, febrero) En: http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo10_parte1.pdf
- Torres, K. 1988. Tissue culture techniques for horticultural crops. Published by van nostrand reinhold. New York.
- Unidad de Fisiología "Vegetal del Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida". (s/a) Preparación de medios de cultivo Fecha de consulta (2009, febrero). En: <http://www.etsea2.udl.es/invitro/biblio.htm>.
- Velilla T. 2002. "Caracterización Bioquímica de la Polivinilpolipyrrolidona 2. Fecha de consulta (2009, febrero). En: www.sec.uchile.cl/cubierta/revista/20/articulospdf/edu.14.doc
- Villegas L. 1988. Cultivo de tejidos vegetales aplicados a la producción agrícola. Ed, signo Caracas, Venezuela.
- Zryd J. 1988. Cultures de cellules, tissues et organet vegetaux Suiss. Academic Publishers, Faculté des Sciences Agronomiques de l Etat Gembloux, Belgique.

Capítulo 7

Micropropagación de plantas

Carmen L. Villarroel Vogt & Ximena Cadima

7.1. LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA *IN VITRO*

La propagación vegetativa *in vitro*, también denominada micropropagación, es indiscutiblemente la aplicación más concreta del cultivo de tejidos y la de mayor impacto. 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 organogénesis de brotes y raíces. Los objetivos de la micropropagación son los siguientes (Auge *et al.*, 1982):

- Adquisición de una gran velocidad de multiplicación y de propagación de “plantas idénticas” a la planta de inicio.
- Constitución de una colección de pies madres. Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten efectivamente almacenar sobre pequeñas superficies, grandes cantidades de “microplantas” que serán utilizadas como pies madres.
- Recuperación de especies en vía de extinción.

Hace algunas décadas, los trabajos con cultivo de tejidos tenían como objetivo la regeneración de plantas a partir de cultivo de ápices caulinares. Estos estudios buscaban establecer una mejor comprensión de la fisiología del crecimiento de regiones aisladas sin la interferencia de los efectos correlativos del resto de la planta y de influencias del medio ambiente (Grattapaglia & Machado, 1997).

Este método toma todo su interés en la multiplicación masiva de plantas en condiciones estériles, a partir de plántulas provenientes de meristemas y reconocidas como sanas, por lo tanto, salvo de contaminaciones. La tasa de multiplicación es muy elevada, de miles por año, lo que permite lograr al horticultor y a los viveristas un producto de calidad y en gran cantidad en un lapso de tiempo muy corto.

La primera aplicación comercial de la micropropagación fue hecha por Morel (1960), al multiplicar orquídeas a través de ápices caulinares y de la regeneración de protocormos, diminutas estructuras que se diferenciaban y daban origen a embriones. La sucesiva división de estos protocormos aceleraba la propagación de orquídeas (Dodds & Roberts, 1990). Posteriormente se aplicó comercialmente en fresas y gerbera con resultados muy alentadores así como en árboles frutales (cereza, manzano, duraznero). Los cultivos *in vitro* permiten la posibilidad de mantener las plántulas sanas bajo forma de miniaturas (en tubos o frascos). Ellas se conservan así sin cuidados particulares durante algún tiempo (4-6 semanas), sin riesgo de contaminaciones y sin perder su capacidad de multiplicación rápida.

De este modo las técnicas *in vitro* (cultivo de meristemas, micropropagación y conservación *in vitro*), se complementan una con otra. Es un hecho que ya por los años ochenta, estas técnicas revolucionaron los métodos clásicos de producción de plantas (Augé *et al.*, 1982).

La utilización de la micropropagación a nivel comercial se hizo realidad en diversos países del mundo, destacándose los de Europa occidental y EEUU. Los laboratorios comerciales surgían en su gran mayoría, asociados a viveros como iniciativa de las propias compañías tradicionalmente productoras de plantas. Ellas trabajaban con el objetivo de satisfacer las necesidades internas de material de propagación libre de enfermedades, o para acelerar los métodos convencionales de propagación vegetativa. Un menor número de compañías trabaja con la producción de plantas *in vitro* para el abastecimiento de viveros de terceros (Grattapaglia & Machado, 1997).

En Bolivia, la aplicación comercial de la micropropagación es relativamente reciente, con algunos grupos trabajando en universidades e instituciones de investigación. En la actualidad, la actividad comercial de la micropropagación se concentra principalmente en la limpieza viral y la consecuente multiplicación de especies ornamentales herbáceas y arbustivas. En segundo plano se encuentran las leñosas, destacándose los portainjertos de frutales de clima templado y árboles élite de rápido crecimiento.

El objetivo de este capítulo es la descripción general del proceso de micropropagación y pretende brindar al lector las bases generales de este proceso; recomendaciones específicas no son posibles ya que la literatura disponible es bastante extensa y las variaciones presentadas son innumerables.

7.2. PRINCIPALES APLICACIONES

El conocimiento de los factores que afectan a la multiplicación vegetativa, así como las faci-

lidades existentes actualmente para su control, han incrementado el uso del sistema de micropropagación. Sin duda la gran aplicación práctica de las técnicas de micropropagación se encuentra en la producción comercial a gran escala de plantas, posibilitando su multiplicación rápida y en períodos de tiempo y espacio físico reducido. La micropropagación ha sido usada con éxito, no sólo en plantas de reproducción vegetativa, sino también en otras especies de semilla recalcitrante o leñosa donde el tipo de reproducción es difícil (Grattapaglia & Machado, 1997; Villalobos & Thorpe, 1991).

Asociada a la actividad del viverista, la propagación masiva vía cultivo de tejidos ha tenido un éxito comercial. En Bolivia por ejemplo, existen programas bien establecidos de producción de semilla de papa de alta calidad utilizando plántulas *in vitro* como material de inicio.

Las técnicas de micropropagación, se adecúan a programas de introducción, almacenamiento e intercambio de germoplasma, contribuyendo a prevenir la pérdida de variabilidad genética. Una descripción detallada de las metodologías de conservación se encuentra en el capítulo 9.

Como técnica de propagación rápida y a gran escala, la micropropagación ha encontrado una particular aplicación en programas de mejoramiento genético, haciendo también viable la propagación vegetativa de especies que en condiciones naturales normalmente se reproducen por semillas (Grattapaglia & Machado, 1997).

7.3. TIPOS DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

Conforme el explante es utilizado y subsecuentemente manipulado, la micropropagación puede ser conducida de las siguientes tres maneras: 1) multiplicación a través de la proliferación de yemas axilares; 2) multiplica-

ción a través de la inducción de yemas adventicias y 3) multiplicación a través de embriogénesis somática (Grattapaglia & Machado, 1997).

7.3.1. Multiplicación a través de la proliferación de yemas o brotes axilares

Este método de multiplicación incluye a la mayoría de los sistemas de micropropagación incluyendo el aislamiento de órganos meristemáticos pre-formados (normalmente yemas axilares) y la quiebra de la dominancia apical con la aplicación de citoquinina exógena. Las yemas axilares que naturalmente se forman en las inserciones de las hojas son estimuladas a crecer, dando origen a partes aéreas nuevas, que a su vez, repiten el mismo proceso. Estas pueden ser subdivididas en conjuntos menores, o en brotes individuales para la formación de nuevos explantes; ejemplos de especies que responden a este tipo de multiplicación son el banano, la frutilla y especies leñosas entre otras. Si la especie presenta naturalmente una gran capacidad de formación de hojas y un rápido elongamiento del tallo, como ocurre en la papa o en el yacón, no es necesaria la quiebra de la dominancia apical, y buenas tasas de multiplicación pueden igualmente ser obtenidas por la simple subdivisión del tallo en diversos segmentos nodales, cada uno conteniendo una yema axilar. Las partes aéreas producidas son enseguida enraizadas y trasplantadas.

7.3.2. Multiplicación a través de la inducción de yemas adventicias

Las yemas adventicias son aquellas originadas en lugares diferentes de aquellas donde se forman en el curso del desarrollo normal de la planta. Esta formación ocurre de manera directa o indirecta. La **organogénesis directa**, se refiere al surgimiento directo de yemas a partir de tejidos que presentan potencial morfogénico en la planta *in vivo*, pero que en general, no se expresa. Estos tejidos incluyen el

cambium vascular, la base del pecíolo en las dicotiledóneas, la base de las hojas y escamas en bulbos de monocotiledóneas y segmentos de raíces, entre otros. Un ejemplo claro es la violeta africana, donde el cultivo puede iniciarse a partir de segmentos de hoja.

La **organogénesis indirecta** ocurre cuando el proceso de regeneración de yemas es precedido por la formación de callo. A partir de células no organizadas del callo, surgen yemas adventicias que crecen y se desarrollan en nuevas partes aéreas. Las multiplicaciones sucesivas pueden darse ya sea por la subdivisión del callo y mantenimiento de un sistema adventicio, o alterándose el proceso para la proliferación axilar sin pasar por la fase de callo. Sea cual fuera el modo, las partes aéreas producidas son individualizadas, enraizadas y trasplantadas.

7.3.3. Multiplicación a través de embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de embriones por la vía asexual. En condiciones *in vitro*, es factible diferenciar embriones a partir de células tanto del esporofito como del gametofito (Villalobos & Thorpe, 1991). La embriogénesis puede también ser directa o indirecta. La gran mayoría de los sistemas de embriogénesis somática se da por la vía indirecta, donde los callos embriogénicos son inducidos y mantenidos a lo largo de la multiplicación. Embriones somáticos son formados en la superficie del callo. Alternativamente, estos callos, generalmente obtenidos en medio sólido, pueden dar origen a cultivos de células en suspensión a partir de las cuales se forman los embriones. Los embriones somáticos pueden también formarse directamente sobre la superficie del explante sin pasar por la fase de callo, como en el caso del tejido del nucelo en *citrus*, que tiene un gran potencial embriogénico natural (Kochba & Safran, 1972). Desde el punto de vista del potencial de multiplicación y el costo, la embriogénesis somática presenta una enorme ventaja sobre otros

sistemas de micropropagación. Grandes cantidades de embriones pueden formarse en suspensiones de células embriogénicas con un mínimo de manipulación manual y espacio físico de laboratorio, principales componentes del costo de una planta micropropagada. Actualmente son utilizados bioreactores diseñados especialmente para el cultivo de células vegetales en suspensión, con miras a la propagación por embriogénesis somática (Castro *et. al.*, 2002).

Todas estas vías de multiplicación, presentan ventajas y problemas desde el punto de vista del potencial de multiplicación y la fidelidad genética del material propagado. En comparación con la embriogénesis somática, el cultivo de partes aéreas presenta la desventaja de requerir mayor manipulación, pues partes aéreas de raíces son formadas en fases distintas. Además de eso, el espacio físico de labo-

ratorio para mantener el crecimiento de las plantas es mucho mayor. Sin embargo, el camino de la proliferación de yemas axilares es generalmente preferido para la micropropagación ya que este sistema es más fácilmente controlado y presenta una fidelidad genética muy alta.

Apices caulinares, yemas axilares y meristemas aislados son los explantes más indicados en la propagación clonal *in vitro*. Ellas poseen determinación para el crecimiento vegetativo y se desarrollarán naturalmente en plantas enteras si satisfacen sus necesidades nutricionales. No se observaron variaciones en plantas regeneradas de cultivos iniciados a partir de ápices caulinares y multiplicados por proliferación axilar. En la Figura 1, se hace una esquematización de los tipos de multiplicación *in vitro*.

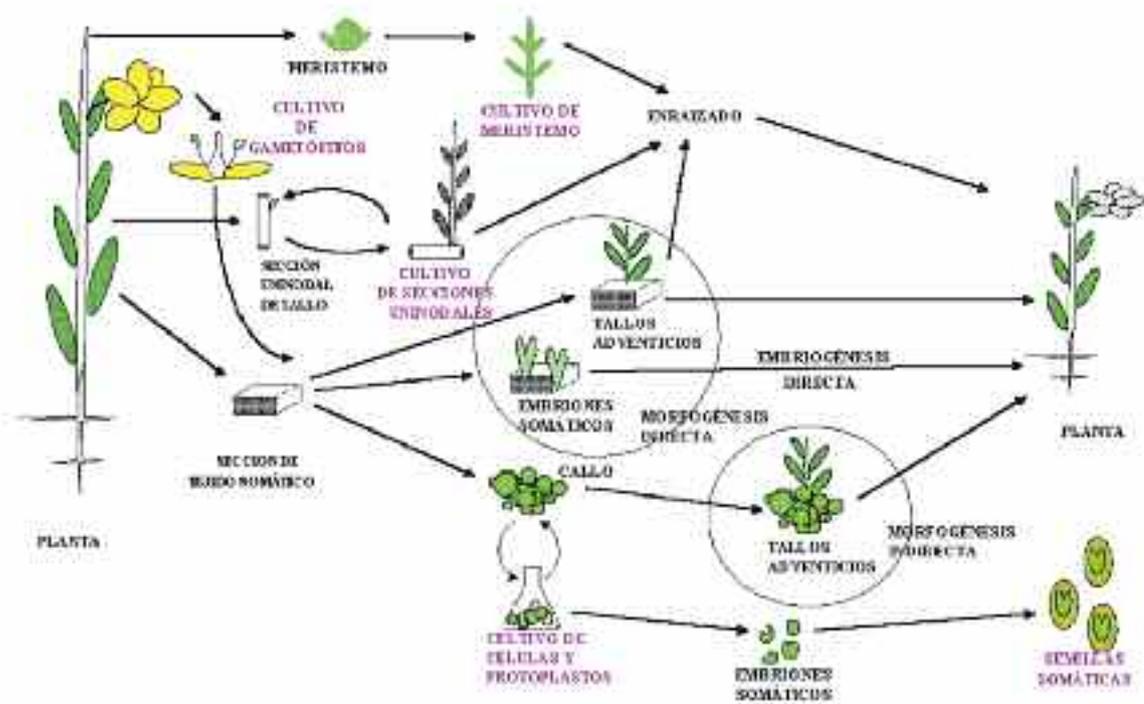


Figura 1. Tipos de multiplicación *in vitro*

7.4. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN

El éxito de un sistema de micropropagación depende del control de un gran número de variables, no solamente de la composición del medio de cultivo, como normalmente se cree. El verdadero desafío, se encuentra en el material vegetal (genotipo) y en la manipulación desde antes de aislar el explante inicial y en todos los pasos hasta el trasplante de la planta producida. Esta manipulación incluye el manejo de la planta madre, las características del explante utilizado, el procedimiento de cultivo adoptado, las condiciones ambientales y microambientales dentro del frasco de cultivo y el trasplante. Todas estas etapas son influenciadas por diversas variables imponderables, que frecuentemente restringen la repetición de los resultados, dificultando la determinación de un protocolo efectivamente comercial de micropropagación.

El rápido progreso de las técnicas de micropropagación se dió en la década de los setenta, gracias a la contribución de los trabajos de Murashigue (1974), quien subdividió el procedimiento en tres fases: fase I, establecimiento; fase II, multiplicación y fase III, enraizamiento (Villalobos & Thorpe, 1991; Grattapaglia & Machado, 1997). Posteriormente se consideró una cuarta fase más como parte del proceso, la aclimatación. Todas estas fases serán presentadas a continuación, cabe resaltar que son posibles innumerables modificaciones e innovaciones de acuerdo a la especie, las facilidades disponibles para el trabajo, la iniciativa y la creatividad.

7.4.1. Fase 1: Establecimiento

El objetivo de esta fase es obtener un cultivo aséptico de la especie que se quiere multiplicar. El establecimiento, incluye la selección previa del explante más adecuado, su desinfección y la siembra en condiciones asépticas en medio de cultivo. Esta Fase termina con la obtención de un cultivo libre de contaminación

visibles y suficientemente adaptada a las condiciones *in vitro*, de modo que pueda presentar una reacción favorable a la aplicación de fitorreguladores en la fase siguiente (multiplicación).

a) Selección del explante. Diversos explantes pueden ser utilizados para iniciar la propagación *in vitro* de una planta. En la selección de los explantes debe considerarse aspectos como el nivel de diferenciación del tejido utilizado y la finalidad de micropropagación. Teóricamente cualquier tejido puede ser utilizado como explante, en vista de la totipotencia de las células vegetales. Sin embargo es importante considerar el tipo de explante, la edad fisiológica de la planta madre y el estado sanitario.

- **Tipo de explante.** En la práctica, se debe procurar utilizar explantes que contengan mayor proporción de tejido meristemático o que tengan mayor capacidad de expresar la totipotencia. Yemas apicales normalmente presentan mayor capacidad de crecimiento que las yemas axilares, que se encuentran bajo efecto de la dominancia apical. Esto es común en plantas herbáceas ornamentales, mientras que lo contrario, en general es válido para especies arbóreas (Grattapaglia & Machado, 1997). Murashigue (1974) observó que la capacidad de producción de partes aéreas de tabaco decrece, cuando la distancia es mayor con relación al ápice. Sin embargo, puede ocurrir lo contrario, dependiendo de la especie.
- **Edad fisiológica de la planta madre o planta donadora del explante.** El estado fisiológico de la planta de donde se extraen los explantes tiene gran influencia en el posterior comportamiento de los cultivos (Villalobos & Thorpe, 1991). La primera consideración es el estado nutricional de la planta y la fase de crecimiento en que se encuentra. Plantas bien nutridas, sin síntomas de deficiencia nutricional o hídrica, en

general, donan mejores explantes. Se recomienda también utilizar explantes colectados de regiones meristemáticas juveniles. Diversas prácticas son adoptadas para obtener brotaciones juveniles o promover el rejuvenecimiento de tejidos adultos. La más común es la poda drástica, rompiendo la dominancia apical y estimulando el desarrollo de yemas.

- **Estado sanitario.** El estado sanitario de la planta madre es un factor importante que irá a determinar la facilidad de descontaminar el explante durante el aislamiento. La primera medida es el mantenimiento de la planta madre en un ambiente más limpio, en invernadero o en cámara de crecimiento, ya que en campo, está expuesta a todo tipo de clima e insectos que provocan heridas y permiten la entrada de microorganismos.

b) Época de recolección de los explantes. La extracción de los explantes debe ser realizada de preferencia a partir de brotaciones nuevas que son formadas durante la fase activa de crecimiento de la plantas, al final de la fase de dormancia, durante los meses más calientes del año (primavera y verano). Altman & Goren (1974) verificaron que yemas de citrus colectadas al inicio de la primavera, brotaron en menor tiempo y no dependían de la aplicación exógena de citoquininas, mientras que yemas colectadas al final de la primavera y durante el invierno, brotaron en un tiempo cinco veces superior.

El problema de la época de recolección de los explantes radica en las especies donde, esquemáticamente, se puede distinguir un estado de vida activa y un estado de vida dormante. En estos estados las reacciones son frecuentemente diferentes. Por ejemplo, en las primeras experiencias de cultivo de meristemas de especies leñosas, todas las recolecciones de ramas en crecimiento derivaron en fracasos. Los primeros éxitos

han sido obtenidos por la recolección de yemas dormantes. A lo largo del ciclo anual, la planta pasa por diferentes etapas. En la primavera, los órganos crecen y los análisis muestran la presencia de reguladores como la auxina, las giberelinas y citoquininas; a lo largo del verano, estos flujos de sustancias disminuyen, ya que en otoño aparecen ciertos inhibidores (Auge *et al.*, 1982).

c) Tamaño del explante. El tamaño del fragmento puesto en cultivo tiene una gran importancia; en efecto, mientras más grande sea el explante, los equilibrios endógenos serán más determinantes. De este hecho, el medio no tendrá más que una influencia limitada. Por lo contrario, un explante de tamaño pequeño será más fácilmente orientado por las sustancias contenidas en el medio de cultivo (Auge *et al.*, 1982).

d) Desinfección. La principal dificultad en la etapa de establecimiento reside en poder obtener tejido descontaminado sin conducirlo a la muerte después de aislado. Los pretratamientos aplicados a la planta madre son determinantes para el éxito de esta etapa de trabajo, principalmente en lo que se refiere a los microorganismos endógenos. Varias sustancias con acción germicida pueden ser utilizadas en la desinfección de explantes (ver capítulo 5). Los más comunes y menos nocivos, son los compuestos en base a cloro como el hipoclorito de sodio o de calcio. Algunas gotas de detergente son comúnmente adicionadas a estas soluciones para mejorar el contacto de éstas con los tejidos. El Tween 20 es el más utilizado en concentraciones de 0,01 a 0,05% (v/v), sin embargo, detergentes de cocina son buenos substitutos. El etanol generalmente es utilizado a 70 y 80% (v/v), mayores concentraciones son menos eficientes y pueden deshidratar los tejidos. Además de ser germicida, el etanol es surfactante y aplicado al inicio, facilita la acción de los otros productos. Después de

la desinfección, le siguen tres a cinco lavados en agua estéril. Es posible el uso de agua de grifo estéril para los primeros lavados y se recomienda agua destilada estéril en el último lavado.

e) Aislamiento de explantes. Tanto la desinfección como el aislamiento de los explantes deben ser realizados en la cámara de flujo laminar. La manipulación del explante en esta primera fase determina, en parte, su sobrevivencia y posterior desarrollo. Es importante evitar la deshidratación de los tejidos por lo que la operación de aislamiento del explante debe ser rápida y precisa. El tiempo del proceso de desinfección varía de acuerdo a la especie y el tipo de explante, por ejemplo en papa puede tomar de 15 a 20 min. mientras que en banano de 30 a 45 min. Los instrumentos utilizados incluyen bisturíes, pinzas, estiletes, agujas de jeringas hipodérmicas, frascos y cajas petri.

f) Medios de cultivo y hormonas de crecimiento. Diferentes formulaciones de medios básicos han sido utilizadas para la iniciación del cultivo. Generalmente el medio utilizado en esta fase también es utilizado en la de multiplicación. No existe una fórmula patrón, pero el medio MS¹⁶, ha presentado resultados satisfactorios para diversas especies. Para especies leñosas, composiciones más diluidas en macronutrientes pueden dar mejores respuestas. La adición de fitorreguladores no siempre es benéfica en la etapa de establecimiento, estos pueden estimular respuestas indeseables como la formación de callo y eventualmente intoxicar los tejidos. Sin embargo, en la mayoría de los casos la adición de fitorreguladores tiene el objetivo principal de suplir las posibles deficiencias de los tenores endógenos de hormonas de los explantes que se encuentran aislados de las regiones productoras de la planta matriz. Además la adición de fitorreguladores estimula cierta respuesta como elonga-

miento o multiplicación de la parte aérea. Esta respuesta depende del estado fisiológico de los explantes, lo que está relacionado con la época del año (Altman & Goren, 1977) y el estado general de la planta matriz. La adición de citoquinina es favorable y hasta necesaria. El BAP en concentraciones de 0,05 a 1,0 mg/l ha sido utilizado con buenos resultados para el cultivo de ápices caulinares de varias especies herbáceas y leñosas.

Medios sólidos en tubos de ensayo individuales son normalmente utilizados en esta fase inicial, aunque en algunos casos se emplean medios líquidos donde es necesaria la utilización de puentes de papel filtro.

g) Condiciones de incubación. Las condiciones de incubación en esta fase pueden variar mucho. Oscuridad total o intensidades de luz reducidas son útiles los primeros días después del aislamiento, para reducir la oxidación fenólica (Franclet & Boulay, 1982). La luz involucra varios componentes como intensidad, fotoperíodo y calidad. Para la gran mayoría de las especies, la incubación inicial de luz con intensidades de 2.000-2.500 lux (200-300 foot candles) es satisfactoria. La luz es otorgada por tubos fluorescentes tipo blanca fría (Grolux); el fotoperíodo tiende a ser de días largos para evitar la inducción de dormancia. En general, se utilizan 16 horas de luz por 8 de oscuridad. La mayor parte de las especies crece satisfactoriamente en temperaturas que varían de 20-27°C; algunas especies son favorecidas con una incubación inicial a temperaturas bajas lo que puede contribuir a romper la dormancia de yemas.

7.4.2. Fase 2: Multiplicación

La fase II se refiere a la multiplicación del propágulo a través de cultivos sucesivos en un medio adecuado para la multiplicación. Se inicia la fase de multiplicación con la obtención de un cultivo de partes aéreas y yemas

16 MS: Murashige & Skoog, 1962.

libres de contaminación y que están suficientemente establecidas y receptivas a la aplicación de fitorreguladores. El principal objetivo de esta fase es de producir el mayor número de plantas posible, en el menor espacio de tiempo. No basta conseguir altas tasas de multiplicación en algunos explantes, lo importante es la reproducibilidad del sistema, es decir, conseguir una tasa media satisfactoria con el mínimo de variación de explante a explante. Otro aspecto esencial es la calidad y homogeneidad de las partes aéreas producidas, lo que va a determinar en gran parte el éxito de una fase siguiente de enraizamiento.

La tasa de multiplicación es el número de explantes nuevos producidos a partir de un explante inicial en un cierto período de tiempo. Se traduce en la cantidad de explantes obtenidos al final del proceso a partir de una cantidad inicial: $TM = \text{No. explantes finales} / \text{No. explantes iniciales}$. Las tasas de multiplicación varían enormemente de especie a especie (Dodds & Roberts, 1997).

La variabilidad de la respuesta morfogénica *in vitro*, no sólo entre especies del mismo género, sino también entre genotipos de la misma especie (diferentes cultivares o clones), lleva frecuentemente a la necesidad de definir protocolos diferenciados.

Los factores que determinan la multiplicación, que pueden ser manipulados para optimizar esta fase, son: a) la composición del medio de cultivo, b) las condiciones de incubación y c) los cuidados en la manipulación del material durante los subcultivos.

a) La composición del medio de cultivo. Diversos medios básicos son utilizados en la fase de multiplicación. Es muy común la utilización de la misma composición básica en la fase de establecimiento y la multiplicación: macro y micronutrientes, vitaminas, inositol, una fuente de carbohidrato (generalmente sacarosa) y eventualmente otros compuestos orgánicos como aminoácidos y sustancias químicamente

indefinidas como agua de coco y extracto de malta. Las variaciones en la composición de los medios dependerán de la especie, las más frecuentes están relacionadas a la concentración de macronutrientes. La fuente de nitrógeno del medio básico utilizada y el balance entre los iones de nitrato y amonio son aspectos que merecen mayor atención. En cultivos de *Eucalyptus citriodora* (Grewal *et al.*, 1980) verificaron que al reducir a la mitad las concentraciones de nitrato de amonio y de potasio del medio MS, ocurrió una duplicación de la tasa de multiplicación, y que al doblar la concentración de cloruro de calcio, esta tasa triplicó.

La concentración de sacarosa u otra fuente de azúcar también tiene un marcado efecto sobre la multiplicación y crecimiento. Concentraciones de 2-4% (p/v) son las más comunes. Debajo de este rango, puede ocurrir clorosis generalizada en los cultivos y encima, problemas de excesivo potencial osmótico del medio que puede llevar a una deterioración de los cultivos.

La manipulación de micronutrientes y vitaminas, igualmente indispensables, generalmente no resulta en alteraciones significativas en la multiplicación.

Respecto a los fitorreguladores, las citoquininas constituyen un grupo indispensable para la quiebra de la dominancia apical y la inducción de la proliferación de yemas axilares. La BAP (bencilaminopurina) en concentraciones de 0,1-0,5 mg/l es la citoquinina más eficaz para promover la multiplicación en diversas especies, siendo además la más económica de todas (Hasewaga, 1980; Hu & Wang, 1983; Zaerr & Mapes, 1985). Complementariamente, las auxinas son utilizadas para estimular el crecimiento de las partes aéreas. Según Lundergan & Janick (1979), citados por Hu & Wang (1983), parece que la auxina en la multiplicación, anula el efecto inhibitorio que tienen las citoquininas sobre el elongamiento de los cultivos. Las concen-

traciones de auxina son frecuentemente bajas comparadas a la de las citoquininas, para mantener un balance auxina/citoquinina menor que 1. Concentraciones excesivas de auxina pueden inhibir la multiplicación y favorecer demasiado el enraizamiento o la formación de callo en detrimento de la multiplicación. Las más utilizadas son el ANA, AIB y AIA en concentraciones por debajo de 0,5 mg/l, aunque el AIA, por ser menos estable en cultivo, puede ser adicionado en concentraciones mayores. Las giberelinas son usadas en la fase de multiplicación de algunas especies como la papa, donde se requiere el elongamiento de las partes aéreas para la multiplicación de los entrenudos (microesquejes).

El estado físico del medio también tiene influencia sobre la multiplicación, medios sólidos o semi-sólidos son más comunes en la fase de micropropagación, aunque en muchos casos puede utilizarse medios líquidos con mayor eficiencia. Medios semi-sólidos y líquidos pueden traer como resultado la vitrificación de los cultivos.

b) Las condiciones de incubación. La fase de multiplicación es evidentemente la más larga durante el proceso de micropropagación, por lo que una buena definición de las condiciones ambientales para esta fase es importante. La mayoría de los cultivos responde bien a las condiciones descritas anteriormente, en la fase inicial del cultivo. La luz cumple un papel importante en la morfogénesis, los cultivos *in vitro* presentan una baja tasa fotosintética, por lo que deben disponer de una fuente de carbohidratos, normalmente en forma de sacarosa. No siempre intensidades luminosas mayores son mejores. Desde el punto de vista económico, la optimización de un sistema comercial de micropropagación requiere disminución del gasto de energía eléctrica, que es uno de los principales componentes del costo de una planta. Las intensidades de luz y horas de fotoperiodos mínimos que no limitan seriamente el

desarrollo son los más indicados. El rango de temperatura óptima para la mayoría de las especies se encuentra entre 20 y 27°C. Temperaturas por encima o debajo de este rango pueden ser desfavorables para el desarrollo de algunas especies.

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 y frascos utilizados y la cantidad de medio presente en el frasco. El tipo de tapa utilizado tiene gran influencia en el desarrollo del cultivo, pues es éste que va a determinar el nivel de intercambio gaseoso con el ambiente externo. Tapa 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 a lo largo de la incubación. El tipo de frasco y la cantidad de medio utilizado son variables que afectan directamente al volumen de aire sobre el medio y la profundidad del medio. Estos factores también afectan la composición de la fase gaseosa del frasco y consecuentemente al crecimiento o desarrollo de los cultivos.

c) Los 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 y los cuidados durante el procedimiento del repicaje. En una primera fase después del repicaje, el explante se restablece del estrés sufrido por el repicaje y no crece o multiplica. La fase siguiente se caracteriza por un crecimiento y multiplica-

ción exponencial, cuando el explante utiliza rápidamente el medio de cultivo. En la última fase, el explante inicia un proceso de senescencia en función de diversos tipos de estrés, tales como deficiencia nutricional, falta de agua en el medio de cultivo, acumulación de etileno y otros gases en el frasco y, eventualmente, barreras físicas al crecimiento como la tapa y las paredes del recipiente. La duración de estas tres fases varía mucho de especie a especie, algunas se recuperan del repicaje inmediatamente y luego del primer o segundo día comienzan a emitir nuevas brotaciones. Otras requieren de períodos más largos para mostrar alguna reacción. Igualmente el período de multiplicación puede extenderse por más o menos tiempo, y algunas especies no presentan señales de senescencia a menos que el medio se seque completamente dentro del frasco. La frecuencia ideal de sub-cultivo sería aquella en la cual las plantas fuesen repicadas durante la fase de crecimiento activo de las partes aéreas, asociando el máximo vigor de crecimiento de los cultivos con la máxima tasa de multiplicación.

El período de incubación más común entre repicajes es de cuatro semanas. Sin embargo, éste puede no ser un intervalo ideal para optimizar la tasa de multiplicación. En algunas especies como las leñosas, que presentan períodos de adaptación más largos, la multiplicación se inicia en la segunda o tercera semana, por lo tanto requerirán de períodos más largos del multiplicación (seis o más semanas).

Las características del explante subcultivado representan un segundo aspecto importante, relacionado con la frecuencia de repicaje. Algunos cultivos como la papa, multiplican con una tasa de 1:5 o más por mes, manteniendo un tallo único del cual se retiran segmentos nodales para iniciar los nuevos subcultivos.

Este sistema es de fácil manipulación, con otros sistemas de proliferación de yemas

axilares y/o adventicias, se forma una tufa (grupo de pequeñas plantas neoformadas) de partes aéreas. Esta tufa puede ser subdividida en: a) explantes conteniendo más de una parte aérea (sub-cultivo en tufas); b) las partes aéreas pueden ser individualizadas; ambos casos pueden darse en el cultivo de la frutilla; y c) de cada parte aérea pueden ser aislados varios segmentos caulinares conteniendo yemas laterales, como ocurre con el manzano. Para optar por uno de estos sistemas, debe tomarse en consideración la rapidez de la operación (mayor para en el caso de simple subdivisión); la tasa de multiplicación y la variabilidad en la respuesta de multiplicación de los nuevos explantes en la generación siguiente.

La posición del explante en el cultivo de origen y el tamaño del mismo son características importantes. El aislamiento de las partes aéreas, principalmente la subdivisión en yemas axilares y apicales, puede introducir una fuerte variación de explante a explante como resultado de la posición original de la yema en cultivo. Explantes que eran ápices en el cultivo anterior pueden presentar mayor capacidad de multiplicación que aquellos que eran yemas laterales o segmentos nodales, o también viceversa dependiendo de la especie. En el caso de la papa, los ápices tienen un desarrollo más rápido. La homogeneidad de los explantes es de fundamental importancia para la operacionalidad de un sistema de micropropagación. Asimismo, el tamaño del explante inicial es importante, al preparar explantes muy pequeños conteniendo una o pocas yemas apenas ocurren, muchas veces, una excesiva demora para el inicio de la fase de crecimiento activo del subcultivo siguiente, o que reduce drásticamente la tasa de multiplicación.

Es importante hacer una selección de las anomalías o deterioraciones de los cultivos como vitrificaciones, hojas secas, callos en la base o ápices necrosados, es

una medida fundamental para la calidad del trabajo.

7.4.3. Fase 3: Enraizamiento

La fase de enraizamiento, es la preparación de las plántulas para el establecimiento en el suelo, es decir, las partes aéreas producidas *in vitro* son transferidas a medio de enraizamiento para el subsecuente trasplante al suelo de las plantas obtenidas. El enraizamiento es una etapa que puede ser realizada *in vitro* o *in vivo*. En el primer sistema, las raíces son regeneradas en condiciones asépticas y una planta completa es trasplantada en sustrato. En el segundo sistema, las partes aéreas son manipuladas como microestacas y todo el proceso de enraizamiento se da en sustrato estéril (aún en condiciones de laboratorio).

La opción por uno de los dos sistemas depende fundamentalmente de la calidad de las partes aéreas obtenidas en la multiplicación, de la especie y del genotipo en cuestión. Otra alternativa es inducir el enraizamiento *in vitro* de las partes aéreas y trasplantarlas en sustrato estéril (en laboratorio). La rizogénesis puede ser dividida en inducción, iniciación, y elongamiento de raíces, que normalmente lleva una a tres semanas. Las dos primeras -a veces consideradas como una sola- responden o dependen de la adición de auxina en el medio de cultivo, donde el crecimiento y elongamiento de las raíces es estimulado por la presencia de auxina. La dificultad de un sistema de micropropagación está en determinar una condición *in vitro*, en la cual todas estas fases puedan ocurrir normalmente y, de preferencia, sin demandar manipulación adicional de una fase a la otra.

Los factores que determinan el enraizamiento son:

a) Influencia del material vegetal. El enraizamiento de especies herbáceas es generalmente fácil con relación al de especies leñosas, donde el enraizamiento se torna más difícil. Este problema se agrava a me-

didada que se utiliza material menos juvenil. La calidad de las partes aéreas provenientes de la fase de multiplicación determina en gran parte, el éxito del enraizamiento.

b) Medio de cultivo. Diversas especies, principalmente las herbáceas, enraízan en la presencia de niveles muy reducidos de auxina, o simplemente en medio básico sin hormonas (Anderson, 1984; Hasegawa, 1980). La situación más común es aquella en la cual las partes aéreas provenientes de multiplicación necesitan de una auxina exógena para estimular la rizogénesis; aunque tenores endógenos residuales de citoquinina pueden dificultar el enraizamiento en estos casos (Grattapaglia *et al.*, 1987). Los tipos y concentraciones de auxina son variables; diversas auxinas solas o en combinación pueden ser utilizadas en el enraizamiento, variando las concentraciones de acuerdo a la especie o clon. Las auxinas más comúnmente usadas son: el AIB, el ANA y el AIA.

Además de las auxinas, algunos otros compuestos son a veces utilizados para el enraizamiento. El carbón activado en concentraciones de 0,1-2% (p/v) puede ser benéfico en algunos casos. Físicamente simula las condiciones de oscuridad en la cual las raíces normalmente se desarrollan mejor. Químicamente, el carbón activado tiene efectos diluidos, reteniendo parte de los elementos que componen el medio, fijando las citoquininas que se encuentran aún en los tejidos de las plantas y absorbiendo compuestos tóxicos inhibidores del enraizamiento. Sin embargo, provoca una menor disponibilidad de auxina libre, por lo que muchas veces, es necesario aumentar la concentración de auxina. Compuestos fenólicos pueden actuar como cofactores de enraizamiento. El Phloroglucinol (PG phloroglucinol), es una sustancia que ocasionalmente ha demostrado buenos resultados. En arracacha, redujo la formación de callo, que ocurría en presencia de AIB (Villarreal, 1997). En otros cultivos, el efecto fue inhibitorio (Zimmerman &

Fordham, 1985). Una buena disponibilidad de fuente de energía es indispensable para la rizogénesis. La concentración de sacarosa en el medio de enraizamiento es generalmente mantenida en los mismos niveles del medio de multiplicación (entre 2 y 3% p/v).

Medios sólidos son utilizados en la gran mayoría de las veces para la fase de enraizamiento, con concentraciones de agar semejantes a aquellas usadas en micropropagación. Medios excesivamente sólidos, con concentraciones por encima de 0,6% de agar pueden llevar a problemas de enraizamiento. Substratos inertes como la vermiculita pueden ser utilizados con resultados superiores a los obtenidos en agar.

c) Condiciones de incubación. Condiciones de temperatura semejantes a aquellas adoptadas en la multiplicación, estimulan un enraizamiento satisfactorio. Alteraciones más frecuentes son hechas en el régimen de luz. Sometiendo a las partes aéreas a intensidades luminosas reducidas o al oscuro absoluto durante algunos días, correspondiendo a la fase de inducción o iniciación. Otros factores ambientales como la temperatura y la humedad en la sala de incubación, pueden influenciar el enraizamiento, pero de una manera menos drástica. Generalmente la temperatura utilizada coincide con aquella utilizada en la fase de multiplicación. El rango más común en el cual enraízan bien la mayoría de las especies va de 20 a 30°C.

d) Tamaño del explante. Partes aéreas pequeñas en general no enraízan bien y necesitan de una fase intermedia de elongamiento. Asimismo, la edad y estado de desarrollo de la planta, la posición del explante sobre la planta y el cultivar, son factores que influyen en el enraizamiento.

7.4.4. Fase 4: Aclimatación

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 planta de condiciones *in vitro* a condiciones *in vivo* en invernadero, donde es sometida a una fase de aclimatación y endurecimiento. Este pasaje es bastante crítico y representa en algunos casos un factor limitante en el proceso de micropropagación. Esto se debe básicamente a los siguientes factores (Grattapaglia & Machado, 1997):

- La planta pasa de una situación de reducido flujo transpiratorio debido a la baja intensidad de luz y elevada humedad relativa a un ambiente que demanda un incremento en la tasa de transpiración, quedando muy susceptible al estrés hídrico.
- La planta pasa de una condición heterotrófica, en la cual depende de un suplemento externo de energía (sacarosa en el medio), para un estado autotrófico, en el cual precisa realizar fotosíntesis para sobrevivir.
- La planta pasa de una condición de alta disponibilidad de nutrientes en el medio hacia otra donde precisa rápidamente incrementar la absorción de sales; y,
- La planta sale de un estado aséptico hacia un ambiente donde está sujeta al ataque de microorganismos saprófitos y eventualmente patogénicos.

a) Factores que determinan la aclimatación.

De la misma forma que en las otras fases, el éxito de ésta depende esencialmente de la calidad de las plantas provenientes de la fase anterior. En lo que se refiere a la parte aérea, plantas que presentan alguna toxicidad de auxina o deficiencia nutricional, tienden a presentar problemas de senescencia de hojas, lo que compromete la sobrevivencia. Partes aéreas vitrificadas o con hojas excesivamente pequeñas también significan un problema, pero que deben ser resueltas en la fase de multiplicación.

Asimismo, plantas con aspecto normal sufren estrés en función a un cambio brusco

de humedad relativa. Pre-tratamientos de reducción de humedad relativa en el frasco de cultivo pueden ser aplicados para aumentar la sobrevivencia al trasplante.

El tipo de sistema radicular obtenido en el enraizamiento *in vitro*, también determina el éxito del trasplante. Raíces aún cortas son más deseables, pues facilitan el lavado y retirada del medio de cultivo adherido, así como la introducción de la planta al sustrato. En la preparación de las plantas para el trasplante, después de retirar el medio y lavar las raíces, se realiza una elección de plantas, agrupándolas por tamaño. Esta clasificación es importante para reducir la competencia de las plantas en la bandeja y permitir un mejor manejo durante la aclimatación y posteriormente la plantación en campo.

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 aún es precario para permitir un flujo transpiratorio adecuado. La manutención de una humedad relativa alta, desde la retirada de las plantas del medio de cultivo hasta verificarse el inicio del crecimiento de la planta, es un factor clave para su sobrevivencia inicial.

Se reduce gradualmente la humedad relativa en el ambiente durante las dos o tres primeras semanas. Los sistemas utilizados para mantener una humedad alta, dependen de las condiciones de trabajo. Sistemas de nebulización intermitentes son utilizados para mantener alta humedad relativa cuando se dispone de recursos económicos. Mientras que simples cober-

turas plásticas sobre las bandejas de aclimatación y las plantas son también muy útiles y pueden sustituir con eficiencia a los sistemas de nebulización.

El sustrato de trasplante es otro factor bastante 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, comprometiendo 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. Lo ideal es utilizar sustratos disponibles localmente; los sustratos comúnmente usados en nuestro medio incluyen mezclas de musgo, arena y cascarilla de arroz. Eventualmente, puede utilizarse vermiculita o perlita, pero que en términos económicos no son convenientes. Luego de dos a cuatro semanas, es común adicionar fertilizante granulado al sustrato para suplir las necesidades iniciales de la planta. Normalmente, la fertilización es un factor que se adecúa al manejo de los viveristas.

Otro aspecto que requiere mucho cuidado, es la condición fitosanitaria del ambiente de trasplante. La alta humedad relativa que se hace necesaria para la sobrevivencia de las plantas es extremadamente favorable al rápido desarrollo de todo tipo de microorganismo. Sumado a esta condición, la fragilidad de los tejidos poco lignificados y desprovistos de cutícula, expone a la planta a la invasión de microorganismos saprófitos y al ataque de patógenos. Los recipientes o bandejas deben estar limpios, de preferencia lavados en solución de hipoclorito de sodio, y el sustrato debe ser desinfectado, preferentemente con calor húmedo, en un caldero a vapor.

Todos los cuidados fitosanitarios preventivos deben ser realizados en el invernadero donde permanecerán las plantas. Pulverización

zaciones con fungicidas alternando con insecticidas son medidas muy importantes para evitar principalmente el ataque de hongos causadores de la muerte de plantas (*Fusarium*) y el ataque de ácaros o pulgones (áfidos). Estos últimos son particularmente problemáticos, ya que pueden comprometer la sanidad de lotes enteros de plantas al contaminarlas con virus u otros microorganismos sistémicos.

b) Procedimiento para la aclimatación de las plántulas *in vitro*. El procedimiento de aclimatación, no es determinante, éste puede variar conforme a la especie. Plántulas *in vitro* bien enraizadas son seleccionadas y trasladadas a invernadero. Ya en el invernadero, se las retira de los recipientes y se las coloca en un recipiente con agua para lavar los residuos de gelificante. Estas plántulas deben ser desinfectadas con una solución débil de fungicida (normalmente Benomil al 0,2% (p/v) para su posterior establecimiento en sustrato estéril, es a partir de este momento que debe mantenerse una humedad relativa alta, por lo que las bandejas o camas de aclimatación, son cubiertas con plástico. En estas condiciones permanecerán por el lapso de 4-6 semanas dependiendo de la especie, antes de su trasplante definitivo (en el mismo invernadero o en campo).

7.5. PRINCIPALES PROBLEMAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

7.5.1. Contaminaciones fungosas y bacterianas

Las contaminaciones representan un problema para la mayoría de los laboratorios, y es particularmente serio por las dimensiones que asume cuando se presenta en grandes laboratorios comerciales. En un estudio de identificación de patógenos en cultivos comerciales *in vitro*, se determinó un 5,3% de contaminación provocada por hongos y por encima del 10%, por bacterias que en muchos casos pro-

vocaban la muerte de las plántulas. Por observaciones directas al microscopio se pudo verificar la presencia de *Verticillium*, *Rhodotorula* y *Penicillium* (hongos saprófitos) en sus diferentes fases (PROINPA, 1996). Bacterias endógenas de crecimiento lento pueden tener origen en el explante inicial, apareciendo algunas semanas después del aislamiento. Este caso no llega a representar un gran problema, ya que en este estado, apenas se cuenta con un número reducido de plantas derivadas del explante contaminado. El problema se establece cuando la contaminación persistente se instala en cultivos anteriormente limpios, en estados avanzados de multiplicación. Las bacterias responsables en general no son patógenas, pero compitiendo por el medio de cultivo, comprometen la multiplicación o el crecimiento y posterior enraizamiento de la planta. Una vez establecidas en el cultivo, por ser de crecimiento lento y de difícil visualización (en general aparecen en forma de manchas blancas o casi transparentes en la base de los explantes), ellas pueden ser inadvertidamente transmitidas de un material a otro. Un factor que favorece la diseminación de estas bacterias es su resistencia a las rápidas inmersiones en etanol y a las temperaturas normalmente proporcionadas por el flameo de los instrumentos. Se han desarrollado métodos de detección temprana de bacterias, que permiten controlar contaminaciones bacterianas antes de que se expresen en los medios de cultivo, garantizando la sanidad de embriones de caña de azúcar (Alvarado *et al.*, 2001).

Mediante aislamientos y cultivos se detectó *Curtobacterium pusillum*, *C. flacumfasiens*, *Bacillus licheniformis* y *Erwinia* spp. (bacterias endógenas) (PROINPA, 1996). Se afirma que estas bacterias pueden desarrollar linajes cada vez más resistentes y adaptados a laboratorios de cultivo de tejidos. Desde el punto de vista práctico, la mejor medida en el caso de contaminaciones bacterianas, es el descartar y autoclavado de los frascos contaminados. Si esto no fuera posible, tratamientos curativos pueden ser aplicados, siendo los más co-

munes la aplicación de antibióticos en el medio de cultivo (ver capítulo 5). Mientras tanto, en la fase de multiplicación, el mayor enfoque debe estar dado a las medidas preventivas tomadas durante el repicaje.

7.5.2. Oxidación fenólica

Un problema frecuentemente encontrado durante el aislamiento de los explantes, es la oxidación de compuestos fenólicos que son liberados por las células dañadas con el corte. Las extremidades cortadas se tornan oscuras rápidamente: los productos de la oxidación son tóxicos para el resto del explante y se difunden en el medio de cultivo oscureciéndolo. Este problema es particularmente serio en el aislamiento de explantes de especies leñosas. Los tejidos de estas especies son más ricos en compuestos fenólicos, precursores de síntesis de lignina. Algunas técnicas para reducir este problema incluyen: la utilización de sustancias antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico, PVP (polivinilpirrolidone) y carbón activado, ya sea en el medio de cultivo o en el último enjuague del proceso de desinfección; la incubación inicial de los explantes en oscuridad o bajo intensidad luminosa reducida; la utilización de medios básicos más diluidos y la reducción de concentraciones de fitorreguladores.

7.5.3. Vitrificaciones

La vitrificación es considerada como uno de los principales problemas en la fase de micropropagación. El exceso o acumulación de citoquinina en el medio puede causar la vitrificación, aunque fue demostrado que también puede ser causa de una interacción con la concentración del gelificante en el medio. Aumentándose la concentración de gelificante en el medio, es posible reducir el efecto del BAP, por lo tanto la vitrificación. El Exceso del vapor de agua en la atmósfera del frasco también es uno de los principales responsables de la vitrificación. La reducción de humedad rela-

tiva es obtenida esencialmente cambiando el tipo de tapa que permita una mayor difusión del agua. La reducción de la concentración de nitrógeno en forma amoniacal en el medio MS, ha sido utilizada como una medida para combatir la vitrificación de los cultivos (Quoirin & Lepoivre, 1977). El tipo de agente gelificante también puede causar vitrificación.

7.5.4. Variación somaclonal

El cultivo de tejidos puede llevar a la producción de plantas anormales (Karp, 1994). Los cambios se producen particularmente en las plantas producidas por la regeneración de brotes adventicios (con la utilización de citoquininas), pese a que la multiplicación de meristemas aparenta ser relativamente estable. La frecuencia de los cambios depende de las especies y del genotipo, de los tejidos a partir de los cuales las plantas adventicias han sido regeneradas, y de la composición del medio de cultivo *in vitro* (Smulders, 2005).

Los marcadores moleculares son utilizados para examinar la identidad genética en los procesos de micropropagación y de conservación *in vitro* (Gupta & Varshney, 1999).

7.5.5. Otros

a) Acumulación de citoquinina. El exceso es tóxico y compromete el desarrollo de los cultivos. La toxicidad que puede causar la citoquinina en el medio se caracteriza principalmente por el excesivo entufamiento (formación de yemas múltiples neoformadas) y la falta de elongación de los cultivos, reducción del tamaño de las hojas, acortamiento de los entrenudos, engrosamiento excesivo de los tallos y vitrificación generalizada de los cultivos, lo que lleva a problemas en la fase de enraizamiento (Lane, 1979). Para resolver este problema del efecto residual, en general se hace necesaria una fase intermedia de elongamiento con el objetivo de desintoxicar los cultivos.

Esta fase de elongamiento se caracteriza por la transferencia de los cultivos a medio básico diluido o no, con concentraciones reducidas o ausencia de citoquinina, antes de individualizar la parte aérea para el enraizamiento. Bajando a la mitad la concentración de BAP en cultivos de banano durante un ciclo, se duplicó la tasa de multiplicación (PROINPA, 2004). El uso del carbón activado también es un coadyuvante útil para esta fase, en función de su capacidad de retener concentraciones excesivas de fitoreguladores y compuestos tóxicos que inhiben la morfogénesis (Boulay, 1984).

b) Conclusiones y perspectivas. La micropropagación es, entre otras técnicas de cultivo de tejidos de plantas, aquella que más se ha difundido y la que tiene mayores aplicaciones, sin embargo, es necesario enfatizar que el éxito de su acción no sólo depende de los aspectos técnicos, sino también de otros factores. Es evidente que la necesidad de equipamientos, reactivos e instalaciones son condiciones indispensables para iniciar cualquier trabajo de micropropagación. Una condición razonable de trabajo puede muchas veces ser obtenida con un poco más de creatividad que con recursos económicos propiamente. Se debe tener siempre claro, que la micropropagación representa la optimización de un proceso de propagación vegetativa, sin introducir variabilidad genética alguna.

Durante la micropropagación, tres aspectos deben ser constantemente observados:

- El valor genético del clon a ser propagado. Este debe ser el resultado de por lo menos algún tipo de selección (Grattapaglia & Machado, 1997).
- La variabilidad en el proceso de micropropagación entre diferentes clones de la misma especie. Esto muestra claramente, que no existe una "receta" para la propagación *in vitro* de una determinada especie. El "secreto" está

en ajustar la metodología al clon en cuestión.

La búsqueda de alternativas que tornan a la micropropagación en un proceso barato, accesible y económicamente viable. La embriogénesis somática, el cultivo en medio líquido, el uso de biorreactores, los usos de suspensiones celulares morfogénicamente activas, el uso de medios mínimos, la eliminación de envases de vidrios como recipientes para cultivo, uso de semilla sintética y la robotización de la operación del subcultivo, se encuentran entre las posibilidades que se presentan en un futuro próximo para tornar la micropropagación en un proceso de propagación vegetativa por excelencia.

7.6. BIBLIOGRAFÍA

- Altman A. & Goren R. 1974. Growth and dormancy cycles in *Citrus* bud cultures and their hormonal control. *Physiol. Plant.*, 30:240-245.
- Altman A. & Goren R. 1977. Horticultural and physiological aspects of Citrus bud culture. *Acta Hort.*, 78: 51-60.
- Alvarado, C.Y.; Portal, N.; García, L. Martínez, Y.; Freire, M. & Quiala, E. 2001. Control de la contaminación bacteriana en la semilla artificial de caña de azúcar através de métodos de detección temprana. *Bioteología Vegetal No.1*: 57 - 60, enero - abril 2001. Instituto de Bioteología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.Cuba.
- Anderson W. C. 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109:343-347.
- Auge R., Beauchesne J., Boccon-Gibod J., Decourtye L., Digat B., Minier R., Morand J.C., Oudin Y. & Vidalie H. 1982. *La Culture in vitro et ses Applications Horticoles. Technique et documentation*, Paris. 151 p.
- Boulay M. 1984. Aspects Pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestiers. *Ann. AFOCEL*. p. 7-43;
- Castro D., Díaz J. & Montoya N. 2002. Propagación clonal de bananos en Biorreactores de Inmersión Temporal (Clonal propagation of bananas by biorreactors of temporary immersion). En: Acorbat. *Memorias XV reunión*. Realizada en

- Cartagena de Indias, Colombia. 27 de octubre al 02 noviembre 2002. Medellín (COL): Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA.
- Hasewaga P. M. 1980. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105:216-220.
- KARP, A. (2002). The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity? En: Engels, JMM, Ramanatha Rao V., Brown AHD., Jackson MT. (eds) *Managing Plant Genetic Diversity*. Wallingford and Rome, CAB International and IPGRI. Pp. 43-56.
- Krikorina A. D. & BERQUAM D. L. 1969. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. *Botanical Review*, 35:59-88.
- Dodds J.H. & Roberts L. W. 1987. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press. 232 p.
- Grattapaglia D. & Machado M. A. 1997. Micropropagación. Curso sistemas de micropropagación. Brasilia-DF, 20-30 de octubre.
- Grattapaglia D., Assis T. F. & Caldas L. S. 1987. Efeito residual de BAP (6-benzilaminopurina) e NAA (ácido naftaleno acético) na multiplicación e enraizamiento *in vitro* de Eucaliptus. En: Resumo do 2do. Simposio Nacional de cultura de Tecidos Vegetales. Brasilia. p. 8.
- Grewal S., Ahuja A. & Atal C.K. 1980. *In vitro* proliferation of shoot apices of *Eucaliptus citriodora* Hook. *Indian J. Biol.*, 18:775-777.
- Gupta P. K. & Varshney, R.K. 1999. Molecular markers for genetic fidelity during micropropagation and germplasm conservation. *Curr. Sci.* 76: 1308-1310
- Francllet A. & Boulay M. 1982. Micropropagation of frost resistant *Eucaliptus* clones. *Aust. For. Res.*, 13:83-89.
- Hasewaga P.M. 1980. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105:216-220.
- Hu C. Y. & Wang P. J. 1983. Meristem shoot tip and bud culture. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P. V. & Yamada, Y. (Eds.) *Handbook of plant Cell Culture*. Vol. 1 Techniques for propagation and Breeding. New York, Macmillan Publishing Company. pp.117-227.
- Kochba J. & Safran H. 1972. Adventive plants from ovules and nucelli in citrus. *Planta*, 106:237-245.
- Lane W. D. 1979. Regeneration of pear plants from shoot meristems-tips. *Plant Sci. Letters*, 16:337-342.
- Lundergan C. & Janick J. 1979. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. *Hort. Sci.*, 14:514
- Morel G. 1960. Producing virus-free cymbidiums. *Am. Orchid. Soc. Bull.*, 29:495-497.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15(3): 473-497.
- PROINPA. 1996. Informe anual 1995-1996. Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria IBTA); Programa de Investigación de la Papa (PROINPA).
- Quoirin M. & Lepoivre P. 1977. Etude de miliex adaptes aux cultures *in vitro* de *prunus*. *Acta Hort.*, 78:437-422
- Roca M. & Mroginsky L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. 953 p.
- Smulders M.J.M. 2005. Are there adequate methods for assessing somaclonal variation in tissue culture-propagated plants? En: Libiaková G, Gajdosová A, (eds), Book of abstracts, COST 843 Final Conference/COST 843 and COST 851 Joint Meeting. Stara Lesna, Slovakia. Pp 201-203.
- Villalobos V. M. & Thorpe T. A. 1991. Micropropagación, conceptos, metodología y resultados. En: Roca, M. y Mroginsky (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Pp.128-140.
- Villarreal C. & Ugarte M. L. 1997. Efecto del Phoroglucinol sobre el comportamiento *in vitro* de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). En: libro de resúmenes IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos; Cuzco, Perú. pp. 44.
- Zaerr J. B. & Mapes, M. O. 1985. Action of growth regulators. In: Bonga, J. M. & Durzan, D. J. (Eds.). *Tissue Culture in Forestry*. 2ª ed. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 231-255.
- Zimmerman R. H. & Fordham I. 1985. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110:34-38.
- Ziv M., Schwartz A. & Fleming D. 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation. (*Dianthus cariphylus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Sci.*, 52:127-134.

Capítulo 8

Limpieza viral en especies vegetales

Gino Aguirre V. & Mario Coca Morante

8.1 INTRODUCCIÓN

A lo largo de los últimos años y debido a situaciones climatológicas como el fenómeno de El Niño en la década de los años 80, Bolivia tuvo que establecer para el Altiplano y valles, programas de emergencia de importación de semilla debido al efecto drástico de las sequías en la disponibilidad de semillas en especies de seguridad alimentaria, además que en este proceso se introdujeron patógenos (principalmente, virus y bacterias). Con el tiempo, estas zonas se han convertido en los focos de diseminación de enfermedades, tales como la marchitez bacteriana de la papa causada por *Ralstonia solanacearum*. Tal es el caso de la distribución de esta bacteria en los valles de Chuquisaca, Tarija y Santa Cruz y Cochabamba, reportando los casos en los años 80 y 90 (Coca Morante y Garvizu, 1984; Fernandez-Northcote y Alvarez, 1993). Se estima que la enfermedad fue introducida en el país en las décadas 70 y 80 a través de las diferentes importaciones de papa a Bolivia. Ejemplos similares han sido reportados en 2008, por Coca-Morante, en relación a la introducción y diseminación de la bacteria causante de la bacteriosis del palmito al trópico de Cochabamba.

Por otra parte, la opinión generalizada de los agricultores cuando se refieren a variedades de multiplicación vegetativa y que actualmente ya no las cultivan, mencionan el hecho de

que su semilla “está cansada”; la que técnicamente puede ser explicado por la posible alta contaminación de virus; en este caso, un proceso de limpieza viral, contribuiría a superar estas deficiencias, garantizando la calidad sanitaria de la semilla, favoreciendo a recuperar su potencial productivo y evitando la diseminación de enfermedades a otras zonas libres de éstos.

En este sentido, los virus de papa según Mejía & Vittorelli (1988) pueden ser transmitidos de plantas infectadas a plantas sanas de diversas maneras: por contacto o transferencia de jugo infectado (instrumentos de labranza, rozamiento entre plantas, manipulación de los operadores), por tubérculo semilla infectado, por insectos vectores (áfidos, trips) u otros. Para muchas especies propagadas vegetativamente, sean frutales, ornamentales, o alimenticias, la principal fuente de virus es la infección crónica de las mismas plantas. Otro problema que afecta a estas especies es la presencia de microorganismos (hongos y bacterias) que al igual que los virus, dañan a la planta, reducen la producción de las mismas y, peor aún, contaminan los suelos. Un ejemplo en frutales es la Agalla de corona (*Agrobacterium tumefaciens*).

Los análisis específicos para las enfermedades del cultivo, tales como DAS-ELISA o PCR, análisis generales para patógenos utilizando

medios de cultivo para el crecimiento de bacterias y hongos, métodos específicos para la detección e identificación de patógenos intracelulares como virus, viroides y bacterias, permiten visualizar los síntomas más marcados de la enfermedad; por lo tanto, la precisión del sistema de detección aumenta. Por otro lado, las plantas enfermas pueden tratarse con técnicas adecuadas para la eliminación de patógenos como la termoterapia o la quimioterapia en el caso de virus o a través de la aplicación de antibióticos o desinfectantes en el caso de bacterias.

Para la recuperación del potencial productivo de estas especies y que puedan ser multiplicadas adecuadamente, es primordial la utilización de técnicas que acompañan al cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Una de las formas es el desarrollo de plantas madre libres de virus y otro tipo de patógenos (hongos y bacterias) utilizando las técnicas de cultivo de meristemas combinadas con otros métodos a fin de asegurar la eliminación viral y la liberación de otros patógenos. La estrategia generada en Bolivia (Iriarte *et al.*, 2001), y utilizada con éxito desde la década de los 90, contempla diversas etapas, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes:

8.2. SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL A SANEAR

Las técnicas de limpieza viral, por su elevado costo (aproximadamente 500 USD por variedad o entrada) y por el tiempo que demandan (no menor a un año), no se pueden utilizar en cualquier material vegetal, por lo que la metodología requiere priorizar el material vegetal a ser saneado en base a los siguientes criterios:

a) Por la importancia económica de la especie a sanear, la misma que debe responder a una demanda de un sector productivo agrícola, por ejemplo la variedad Imilla negra en papa para el altiplano boliviano o una variedad de yuca o de banano en el

tropical para una producción comercial principalmente.

- b) Por la importancia social y cultural**, como es el caso de variedades nativas, que significan uno de los pocos sustentos para familias campesinas de zonas de altura y que han garantizado desde siempre su seguridad alimentaria, además de significar un invaluable recurso filogenético.
- c) Por la cobertura geográfica** que demandaría el cultivo de cualquiera de estas especies, que debe significar un beneficio y/o participación de varias comunidades.

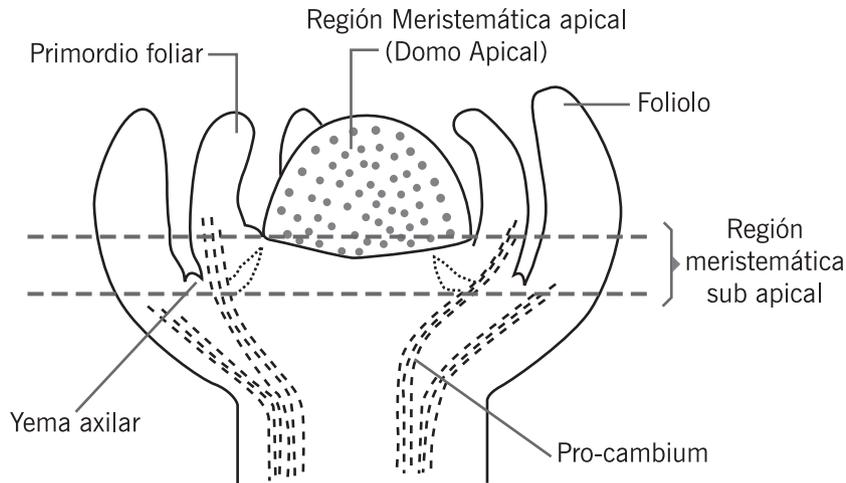
En el caso de los bancos de germoplasma, donde se conservan y salvaguardan un número importante de entradas, mismas que constituyen nuestra riqueza fitogenética, la necesidad de contar con material libre de virus radica en que cada entrada es muy probable que sea devuelta y re introducida a sus zonas de origen, sea utilizada en programas de mejoramiento o sirva de material madre dentro de un programa de producción de semilla. En cada uno de estos casos, un material madre libre de virus es sencillamente primordial.

8.3 TÉCNICAS DE LIMPIEZA VIRAL

8.3.1. Cultivo de meristemas

Esta técnica consiste en aislar el meristema y sembrarlo en un medio de cultivo adecuado que posibilite el desarrollo de una planta completa (Figura 1).

El término cultivo de meristema por lo general no es correctamente empleado ya que en la mayoría de los casos 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 en forma aislada y de la cual resulta frecuentemente complicado obtener plantas completas (Conci, 2004). El meristema apical es definido como un domo de tejido localizado en el extremo de la punta



Fuente: (Mejía & Vitorelli, 1988).



Ápice y esbozos foliares en papa.



Meristema y primordia foliares en papa.

Figura 1. Diagrama de la región meristemática apical y la región meristemática sub apical con primordios foliares

de un brote con 0,1 mm de diámetro y una longitud de 0,25 a 0,4 mm; estos tejidos comprenden células que son anatómicamente indistinguibles, pero normalmente se agrupa en las zonas arbitrarias como la túnica, cuerpo, células de la madre central, cada una de las dos partes laterales del meristema considerado de frente y yemas de meristemas (Karta, 1981; Pierik, 1987).

8.3.1.1. Distribución de los virus en la planta

El cultivo de meristemas como una técnica para el saneamiento de clones 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 medios nutritivos estériles (Roca y Jayasinghi, 1982).

Los virus en la planta no están uniformemente distribuidos. En las infecciones sistémicas algunos están limitados al floema o a pocas cé-

lulas parenquimáticas adyacentes; otros involucran a todas, o casi todas, las células de la planta. Los meristemas suelen tener pocos o ningún virus, las razones para que ello ocurra (Conci, 2004) no están esclarecidas completamente, pero se mencionan como posibles las siguientes:

- 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 es el caso de las células meristemáticas, donde tiene lugar una activa mitosis.
- Elevadas concentraciones de auxinas. Se ha observado que elevadas concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo inhiben la multiplicación de los virus. Por lo tanto se puede suponer que las altas concentraciones de auxinas endógenas existentes en los ápices meristemáticos pueden producir un efecto similar.

También se pueden obtener plantas libres de bacterias y hongos por el cultivo de meristemas. Los bacterias que se pueden eliminar son: *Pectobacterium* (anteriormente *Erwinia*), *Ralstonia solanacearum* (anteriormente *Pseudomonas solanacearum*), *Xanthomonas* sp. y *Bacillus* sp.. Los géneros más importantes de hongos son: *Fusarium*, *Verticillium*, *Phialophora* y *Rhizoctonia* (Lucas, 2004).

8.3.1.2. Factores que determinan el cultivo de meristemas

Los factores que determinan el cultivo de meristemas están relacionados principalmente al material inicial, por tanto se describen algunas consideraciones a tomar en cuenta:

a) *Influencia del material inicial*

- **Tipo y edad del explante inicial.** La selección de un adecuado explante inicial determina mejores resultados en la regeneración o formación de plantas *in*

vitro. Este varía en dependencia de las características morfológicas de las especies (García y Noa 1998). Es aconsejable trasladar previamente las plantas a invernadero, con la finalidad de someterlas a un proceso de cuarentena, para mejorar las condiciones sanitarias y tener la disponibilidad de los explantes a mano.

- **Tamaño del explante inicial.** 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, a su vez, la regeneración de los meristemas en plántulas es menos probable (Aguirre, 1990).

El tamaño del inóculo es importante pues se tienen meristemas que miden de 0,01 a 0,1 mm de diámetro, y ápices de tallo que miden de 0,1 a 0,3 mm de diámetro; generalmente el número de plántulas libres de virus producidas es inversamente proporcional al tamaño del meristema o ápice cultivado (Walkey, 1978 citado por Lucas, 2004). Usando este principio, Mori y Hosokawa (1977) y Logan y Zettler (1985), citados por Helliot, *et al.* (2004), reportan la obtención del 100% de plantas libres del CMV en *Lilium* y *Gladiolo* respectivamente.

El tamaño recomendado es variable y depende del hospedante, de tratamientos previos (termoterapia, quimioterapia, etc.) y del o los virus involucrados. En algunos casos no sólo es importante considerar la especie hospedante, sino también el cultivar, ya que se han detectado notables diferencias entre ellos (Aguirre, 1990; Conci 2004).

- **Características genotípicas.** 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 (García & Noa 1998).

- **Estación o momento de la extracción.** Los meristemas en activo crecimiento son los más recomendados por su alto potencial de desarrollo, situación que favorece las posibilidades de obtener plantas libres de virus. Para especies vegetales con períodos de dormancia definidos, los mejores resultados se obtienen cuando los meristemas están despiertos y comienzan a brotar. En caso de ser necesario, se recomienda despertar el material con pre tratamientos; los más usados consisten en someter a los explantes a períodos de oscuridad y de frío (variable según la especie) y/o al uso de ácido giberélico (Conci, 2004). En el caso de tubérculos, es posible inducirlos a brotar de manera natural, poniéndolos en contacto con frutos que en su proceso de maduración, emiten etileno. Asimismo, la adición de citoquininas en el agua de riego en plantas en maceta favorece la emisión de yemas para su posterior cultivo *in vitro*.

b) Medios de cultivo. El medio de cultivo es un factor esencial ya que en él juegan un papel vital los requerimientos nutricionales, hormonales y ambientales, específicos de la especie que estemos cultivando; es importante, por otro lado, que éstos deben sean semejantes a los que se tienen en condiciones naturales (Lucas, 2004). La composición del medio nutritivo es compleja, ya que un meristema es una porción mínima de la planta. Cada especie vegetal es diferente e incluso distintas variedades de una misma especie pueden requerir un medio diferente.

Los medios MS son los más utilizados en especies herbáceas. Los reguladores suelen utilizarse en bajas concentraciones

(0,1-0,5 mg/l); normalmente se recomienda la adición de los tres reguladores de crecimiento: la auxina puede ser necesaria para la formación de raíces, auxinas y citoquininas para estimular la división celular; se añaden a veces las giberelinas para lograr la elongación del vástago. Los meristemas se aíslan sobre medio sólido, aunque en algunos casos se utilizan medios líquidos. El pH por lo general se sitúa entre 5,6 y 5,8 (Karta, 1981). Frecuentemente se utiliza vitaminas: vitamina B1, piridoxina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, el azúcar habitual en reemplazo de sacarosa (2-6% p/v) (Auge & Boccon 1989); también se incorporan al medio otros componentes orgánicos que favorecen a la regeneración de los meristemas como mioinositol y caseína pancreática. En la preparación de los medios de cultivo para la regeneración de meristemas de camote, oca y papalisa, una previa filtración del azúcar común en carbón activado (Anexo II), adsorbe las toxinas presentes en el azúcar y de esta manera se favorece a una mayor regeneración de los meristemas (Aguirre, 1990).

- c) **Condiciones de incubación.** La temperatura normal de crecimiento es de 21 a 25°C; aunque la mayor parte de las plantas bulbosas requieren una temperatura más baja. Temperaturas más altas (35-39°C) se utilizan solamente, para inactivar al virus. Los meristemas se cultivan a 16 horas de fotoperiodo de 1.000-3.000 lux, a veces la luz fluorescente se suplementa con algo de luz roja. En ocasiones es necesario utilizar una irradiación más baja durante los primeros días después del aislamiento (Jiménez, 1998).

8.3.1.3. Fases del cultivo de meristemas

Según Navarro (1987), Auge & Boccon (1989), Aguirre (1990), Krikorian (1991) y Lucas (2004), el proceso de cultivo *in vitro* de meristemas incluye varias etapas, que son:

- **Fase 0.** Selección de la planta madre y verificación del estado sanitario.

- **Fase I.** Establecimiento del cultivo aséptico.
- **Fase II.** Propagación de propágulos y sub cultivos
- **Fase III.** Enraizamiento de los propágulos obtenidos.
- **Fase IV.** Aclimatación..
- **Fase VI.** Control de virus y verificación del nuevo estado sanitario.
- **Fase VII.** Multiplicación masiva de las plantas sanas.

a) Selección de la planta madre y verificación del estado sanitario. Para la mayoría de las plantas propagadas *in vitro*, el material inicial es una planta seleccionada por sus características fenotípicas que responden al clon o variedad a propagar y por sus condiciones sanitarias y de vigor. Una practica común para uniformar el estado fisiológico de los explantes es cultivar las plantas donadoras en ambientes controlados de luz y temperatura y humedad relativa, con niveles óptimos para el desarrollo (Jiménez, 1998).

Si la planta madre se encuentra enferma, se debe conocer el virus específico presente. Pues así las condiciones de cultivo varían, aplicándose termoterapia, quimioterapia o simplemente el cultivo de meristemas (Navarro, 1987). El uso de serología, ELISA o plantas indicadoras permite conocer el tipo de virus a erradicar y por ende la estrategia a utilizar.

b) Establecimiento del cultivo aséptico. Para efectuar el establecimiento de los explantes, se sigue en cámara de flujo laminar el aislamiento del meristema (Navarro, 1987), ello de la siguiente manera: se debe limpiar de forma previa los vástagos cuidadosamente. Se retiran las hojas de los vástagos, siempre que sea posible, y entonces los vástagos (o yemas, si no se han retirado las hojas) se sumergen durante 30 segundos en alcohol de 70% v/v para eliminar las ceras presentes en superficie. Luego se esteriliza durante 10 minutos en

una solución con lejía al 3-10% (v/v), conteniendo (Tween 20), lavando inmediatamente y por lo menos en tres oportunidades con agua destilada y esterilizada.

Con la ayuda de un estéreo microscopio (aumento de 20 - 40 x), se retiran una por una las hojas restantes y los primordios foliares, utilizando en esta operación: bisturís nº 11, agujas de jeringa u hojas de rasurar cortadas a bisel montadas sobre un mango a presión. El meristema obtenido con los primordios foliares (de 0,1 a 0,2mm de tamaño) se siembra inmediatamente sobre un medio nutritivo en medio sólido y en tubos de ensayo y se traslada a la cámara de crecimiento.

Los tubos de ensayo conteniendo los meristemas se deben revisar periódicamente para observar el desarrollo de lo que será la futura planta (formación de hojas, yemas, tallo, etc.). Con la finalidad de acelerar el crecimiento, es recomendable cambiar el meristema cada semana a un medio de cultivo fresco.

c) Fase de propagación de propágulos y subcultivos. En esta fase se deben separar los propágulos obtenidos y pasarlos a un medio fresco para la proliferación de nuevos brotes y para el desarrollo de los mismos. Los subcultivos se hacen de acuerdo a la cantidad de material requerido; cada subcultivo dura de 4 a 6 semanas (Lucas, 2004). La multiplicación puede efectuarse por proliferación de brotes axilares, brotes adventicios, formación de embriones somáticos, etc., tratando siempre de evitar la formación de callo como paso previo a la diferenciación. Es frecuente que después de dos o más sub cultivos aumente el número de yemas que se producen a partir de un explante (Conci, 2004).

d) Fase de enraizamiento de los propágulos obtenidos. Fase en la cual se procede al enraizamiento de los propágulos para la obtención de plantas completas; dura normalmente cuatro semanas. En algunos casos, principalmente en plantas herbá-

ceas, el enraizamiento sucede sin mayor cambio de medio; en otros casos, como en el banano y en frutales de clima templado, es imprescindible utilizar un medio rico en auxinas.

e) Fase de aclimatación. El traspaso de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro* reviste una particular importancia; el mayor problema en esta etapa es la deshidratación debida a algunas características anatómicas de las plantas *in vitro* (reducida cera epicuticular, lentitud de movimiento estomático, abundantes espacios intercelulares, dificultades en la conexión entre el tallo y la raíz).

Esta fase reviste un extremo cuidado. Es imprescindible contar con un invernadero de aclimatación y dentro de éste, con áreas aisladas y a prueba de áfidos para evitar cualquier recontaminación. Conviene transferir las plantas a macetas y mantenerlas con alta humedad relativa durante los primeros 15 días, o cubrir las plantas con polietileno o recipientes de vidrio transparente, a modo de cámara húmeda, y descubrirlas progresivamente hasta destaparlas completamente al cabo de 3 ó 4 semanas. La etapa de acondicionamiento a invernadero dura de 6 a 8 semanas (Conci, 2004). Nuestra experiencia indica que a las cuatro semanas, las plantas ya están bien aclimatadas, además de mostrar un desarrollo adecuado para poder tomar muestras para la verificación sanitaria.

f) Fase de control de virus y verificación del nuevo estado sanitario. Una vez obtenidas las nuevas plantas a partir de meristemas, las mismas deben ser evaluadas en relación a su nuevo estado sanitario; para lo cual, un lote de las mismas se las mantiene aisladas durante un mes en condiciones de invernadero, para luego ser indexadas hacia virus. No se recomienda efectuar estos indexajes en plantas *in vitro*, debido a que la presencia viral puede estar latente, corriéndose el riesgo de obtener resultados erróneos.

g) Fase de multiplicación masiva de las plantas sanas. Una vez comprobado el nuevo estado sanitario de las plantas, las mismas pueden ser multiplicadas masivamente y pueden ser incorporadas dentro de un sistema formal de certificación de semillas.

8.3.1.4. Aplicaciones del cultivo de meristemas

El cultivo de meristemas es utilizado en la multiplicación rápida de especies vegetales, para la obtención de plantas libres de patógenos, genéticamente idénticas a la planta madre y para la conservación de germoplasma a bajas temperaturas, ello a fin de constituir un stock de colecciones genéticas que pueden ser utilizadas posteriormente en la propagación y certificación de plantas sanas.

8.3.1.5. Técnicas complementarias al cultivo de meristemas

a) Termoterapia. Para mejorar la eliminación de patógenos, técnicas de termoterapia pueden ser utilizadas de manera conjunta con el cultivo de meristemas, cuando no llega a ser lo suficientemente eficaz solamente el cultivo de meristemas (Helliot, *et al.* 2004).

La termoterapia consiste en la exposición de plantas madre infectadas tanto completas, como órganos o fragmentos de ellas a tratamientos con temperaturas altas (36-52° C) o bajas (4° C), durante determinados períodos de tiempo. Esta técnica puede ser utilizada inicialmente en las plantas madre, previa excisión meristemática, o directamente en plantas ya establecidas *in vitro*. El principio básico de los tratamientos radica en la posibilidad de eliminar la replicación viral, en la hipótesis de que los virus son termosensibles, en rangos de temperaturas y tiempos que sólo afectan ligeramente a los tejidos vegetales (Navarro, 1987; Aguirre, 1990, García & Noa, 1998).

Esta práctica no es efectiva para todos los virus por igual, depende del virus y del hos-

pedante. Se ha observado que un mismo virus en distintas especies se inactiva en forma diferente. Generalmente, esta práctica ha resultado más efectiva en virus de partículas alargadas (Aguirre, 1990; Conci, 2004).

La técnica consiste en someter gradualmente a las plantas, de preferencia *in vitro*, a temperaturas ascendentes, a un rango de 1° C por día, de manera que a los quince días de iniciado el tratamiento, las plántulas *in vitro* se encuentren a una temperatura igual o superior a los 36° C. Las plantas son sometidas a esta temperatura un mínimo de tres a cuatro semanas, posteriormente, se obtienen sólo los meristemas y se los siembra en tubos de ensayo con el medio de cultivo adecuado (Anexo II).

Actualmente la alternativa de más éxito es el cultivo de meristemas apicales, frecuentemente combinado con termoterapia. Cuando estos métodos son usados, las plantas no sólo son liberadas de virus, sino también de hongos y otros patógenos (Lucas, 2004).

b) Quimioterapia. Es un método que consiste en la aplicación de productos químicos como Ribavirin o Virazole al medio de cultivo, con la finalidad de obtener plantas libres de patógenos y asegurar la obtención de material sano. La adición de Virazole en dosis de 100 mg/l, en el medio de cultivo durante más de 127 días, condujo a la efectiva erradicación del CMV en cultivos de *Nicotiana rustica*; sin embargo el crecimiento de tejidos se vió reducido. Simpkins, *et al.* (1981), citado por Helliot, *et al.* (2004). La aplicación de estos antivirales al medio de cultivo en concentraciones variables de 10 a 50 mg/l, y en algunos casos hasta 100 mg/l, combinándolos con el cultivo de meristemas permite la probabilidad de obtener plantas libres de virus. Un problema importante con el Virazole es su fitotoxicidad, que a su vez depende de la dosis empleada y de la especie

de planta utilizada (Navarro, 1987; Conci, 2004).

Debido a que la multiplicación de los virus esta íntimamente ligada al metabolismo celular del hospedante, se podría sustentar que la aplicación de sustancias químicas específicas a plantas o tejidos infectados puede acelerar su metabolismo y podría bloquear el mecanismo de síntesis de los virus y eliminarlos. Sin embargo el uso de las sustancias quimioterapéuticas a dosis elevadas ha resultado fitotóxica destruyendo las células de los tejidos tratados o reapareciendo en plantas (Roca & Jayasinghi, 1982).

c) Electroterapia. La electroterapia consiste en pasar corrientes eléctricas a través de los tejidos infectados del vegetal. Cuanto mayor sea la resistencia y más alto el amperaje, más calor se genera. La producción de calor es el principal cambio físico ocasionado por la corriente y el causante primordial de sus efectos letales. La aplicación de pulsos eléctricos para eliminar virus de tejidos de plantas ha llamado mucho la atención. Lozoya –Saldana *et al.* (1996), citados por Helliot, *et al.* (2004) reportan la eliminación del PVX a partir de diferentes clones de papa.

Algunos investigadores han obtenido resultados interesantes en cultivos de importancia económica, aplicando este método en especies como: caña de azúcar (73- 100% de plantas sanas con 5 - 20 volt durante 5 minutos); en ajo (53- 100% de plantas sanas con 10-20 volt durante 5-30 minutos); papa (más de 84% de plantas sanas con 5 volt durante 5 minutos) (Hernández *et al.*, 1997 citado por Hernandez & Nápoles, 2004).

d) Crioterapia. Para varios cultivos, la criopreservación ha sido usualmente utilizada para superar limitaciones encontradas en las estrategias de conservación de germoplasma en semillas, *in vitro* o en campo. La conservación a ultra bajas temperaturas

(Helliot, *et al.* 2004), usualmente a -196°C , permite una conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos, almacenándose las plantas en ambientes libres de contaminación.

En 1997, Brison, *et al.*, citados por Helliot, *et al.* (2004), demostraron por primera vez que los criotratamientos son utilizados no solamente para la conservación de germoplasma, sino también para la erradicación viral. La criopreservación permitió liberar de virus al 50% de brotes de un lote de plantas de cerezo infestadas con el virus de la viruela del cerezo.

La crioterapia actualmente es una técnica utilizada para inhibir la replicación viral. Consiste en líneas muy generales, en deshidratar previamente al explante, sumergiéndolo en una solución de Sorbitol 0,5M, con la finalidad de favorecer el proceso de congelamiento a -196°C (Helliot, *et al.*, 2004).

La utilización de la criopreservación para la erradicación viral del mosaico del pepino CMV y del virus del rayado del banano BSV, fue investigada por Helliot, *et al.* (2002).

Plantas de banano var. Williams fueron mecánicamente infectadas por CMV y naturalmente infectadas con BSV. Se proliferaron meristemas de las plantas infectadas, posteriormente los grupos de meristemas fueron excisados para ser criopreservados. El estado sanitario de las plantas regeneradas *in vitro* fue verificado mediante el test ELISA. La supuesta limpieza viral fue posteriormente verificada, previa aclimatación de las plantas *in vitro*. La frecuencia de erradicación viral para CMV y BSV fue del 30 al 90% respectivamente. En comparación, la frecuencia de plantas libres de virus regeneradas directamente del cultivo de meristemas correspondió a valores de 0% y 52% para CMV y BSV respectivamente. Luego de las pruebas serológicas correspondientes, se ha concluido que

esta técnica es válida para obtener plantas libres de virus en banano y plátano (Helliot *et al.*, 2002).

8.3.2. Técnicas avanzadas de diagnóstico de virus

En las últimas décadas se han realizado importantes avances en la detección de virus. La detección serológica fue ampliamente mejorada con la aplicación de ELISA (Enzyme linked immunoabsorbent assay). En la década de los 80, esta tecnología todavía fue mejorada con los anticuerpos monoclonales y su aplicación a un gran número de virus que afectan a plantas. Así mismo, la hibridación de ácido nucleico ha sido utilizado en la detección de virus y viroides. La clonación de ácido nucleico de plantas y el desarrollo de métodos de detección no radioactiva ha incrementado la utilidad de la hibridación de ácido nucleico para la detección de virus. Recientemente el desarrollo de PCR (Polymerase chain reaction) ha mejorado grandemente la sensibilidad de detección. Finalmente, La PCR inmunocaptura combina los avances de la serología y PCR como un método altamente sensible de detección.

8.4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las técnicas de obtención de plantas libres de virus, son una de las más importantes contribuciones del cultivo de tejidos *in vitro* hacia la agricultura, al evitar cualquier diseminación de enfermedades hacia zonas libres de éstas y al favorecer la difusión de material vegetal libre de patógenos, que pueden a su vez demostrar su verdadero potencial productivo, además de mantener su alta calidad genética.

Asimismo, la conservación de recursos fitogenéticos debe partir inicialmente de un proceso de identificación y de erradicación de enfermedades virales dentro de sus colecciones. Es altamente riesgoso diseminar variedades sin

antes no haber sido sometidas las mismas a un proceso previo de limpieza viral.

Una de las grandes oportunidades para desarrollar nuestra agricultura es que los programas de certificación de semillas impulsados por el INIAF, necesariamente deben basarse en estas técnicas para garantizar la alta calidad genética y sanitaria de su material madre.

8.5. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre G. 1990. Assainissement virologique et culture de meristemes en dix varietés indigenes de pomme de terre, *Solanum andigena*, *Oxalis tuberosa*, et *Ullucus tuberosus* en vue de leur assainissement virologique. TFE. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique, pp. 74.
- Auge R. & Boccon G.J. 1989. Les applications à l'horticulture. In La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Vidalie H. (ed). 3 ed. Paris, Francia, Jb. Bailliee, pp. 63-79.
- Boccon G.J. 1989. La technologie de la culture *in vitro*. In La culture *in vitro* et ses applications horticoles. H. Vidalie (ed). 3 ed. Paris, Francia, Jb. Bailliee, pp. 31-47.
- Coca Morante M. y Garvizu L. 1984. Primeros registros de la marchitez bacteriana en los Valles mesotermicos de Santa Cruz, Bolivia. Asociacion de Servicios Artesanales y Rurales. Cochabamba, Bolivia, pp. 6.
- Conci V.C. 2004. Obtención de plantas libres de virus (en línea). Formato PDF/Adobe Acrobat. Consultado 18 de dic. 2004. En: http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte8_ap5.pdf
- Dodds J.H. & Roberts, L.W. 1985. Experiments in plant tissue culture. 2 ed. New York, USA, Syndicate of the University Press, Cambridge, pp. 133-147; 148-155.
- Fernández-Northcote, E.N. Alvarez, V. 1993. Situación actual de la marchitez bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum* en Bolivia. En: Memorias del Taller sobre enfermedades bacterianas de la papa. Brasilia, Brasil, marzo 15 – 18, 1993. CX.A. López y N. Espinoza R (compiladores). Lima, Perú.
- García A.L. & Noa C.C. 1998. Obtención de plantas libres de patógenos. In Propagacion y mejora genetica de plantas por Biotecnologica. Ed. Pérez, J.N. ed GEO, Las Villas, Cuba, pp. 135-149.
- Helliot, B. Panis, B., Poumay, Y., Swenne, R., Lepoivre, P., Frison, E. 2002. Cryopreservation For The Elimination Of Cucumber Mosaic And Banana Streak Viruses From Banana (*Musa Spp.*). Plant Cell Reports. Vol 20, Fascicule 12, pp. 1117 – 1122. En: <http://hdl.handle.net/22681/25951>.
- Helliot, B, Panis, B., Hernandez, R., Swennen, R., Lepoivre, P., Frison, E. 2004. Development of *in vitro* techniques for the elimination of Cucumber Mosaic Virus from banana (*Musa spp.*). In. Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Proceedings of a meeting held in Leuven, Belgium, 24-28 September 2001. En: <http://hdl.handle.net/2268/27144>
- Hernández G. & Nápoles H.N. 2000. Técnicas Asépticas. (en línea) Consultado 20 de dic. 2004. En: <http://www.isch.edu.cu/biblioteca/anuario2000/MONO-AGRON-tecnicas.htm> - 101k
- Jiménez G.E., 1998. Cultivo de ápices y meristemas. In Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Pérez, J.N. (ed) Las villas, Cuba. Ed GEO, pp. 45-56.
- Karta K. K. 1981. Meristem culture and cryopreservation; Methods and applications. In Plant tissue culture; Methods and applications in agriculture. Thorpe A.T.(ed) California, USA. Academic Press; Inc (London) Ltd., pp. 181-195.
- Lucas C.E.A. 2005. Biotecnología vegetal; Aplicaciones del cultivo de meristemas apicales de tallo (en línea) 15 feb. 2005. En: <http://www.monografias.com/trabajos12/apicult/apicult.shtml> - 37k - 11 Feb 2005.
- Mejía R.; R. Vittorelli. C. 1988. Cultivo *in vitro* de plantas de papa. INIA, Perú 111p.
- Melé G.E. 1992. La micropropagación de plantas ornamentales. Agrícola Vergel. 11(123): 271-274.
- Navarro U. 1987. Cultivo de meristemas. In Daniel Hurtado y Maria E. Merino Manzanares. Cultivo de tejidos vegetales. México DF., ed. Trillas, pp. 133-147.
- Pierik R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, Boston, Martinus Nyghof publishers, pp. 344.
- Roca R. & Jayasinghi U. 1982. Guía de estudio para el saneamiento de clones de Yuca. Ed. CIAT Cali, Colombia, pp. 16.

Capítulo 9

Embriogénesis somática y mutagénesis

Juan Villarroel & Nelson Chávez

9.1. INTRODUCCIÓN

La reproducción de plantas en nuestro medio se realiza principalmente mediante semillas producidas por los agricultores y/o empresas especializadas semilleras. Este material no es uniforme genéticamente, a consecuencia del manejo efectuado y en plantas alógamas por la fecundación abierta que presentan.

La obtención de plántulas con características genotípicas y fenotípicas comunes, se pueden realizar mediante cultivo de tejidos y cultivos celulares que posibilitan el mejoramiento y un puente necesario para llevar a cabo las manipulaciones fenotípicas y genotípicas desde el laboratorio hasta el campo para la obtención de plántulas y/o semillas puras de excelente calidad. Para este propósito se tienen varias técnicas que el laboratorio puede seguir de acuerdo con la especie a tratar y con los objetivos que se pretenda seguir en las investigaciones y en la producción masiva.

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias de la UMSS ha realizado investigaciones con esta técnica, para lo cual se realizaron dos trabajos experimentales con la especie *Daucus carota* (zanahoria), como especie tipo con las tesis de Mary Luz Florero Orellana y María Elena Reyes Alvares en 2001, posteriormente se

realizó también en *Saintpaulia ionantha* H. Wendl (violeta africana) de Nelson Chávez Alcoba en 2007.

Con estas técnicas se lograron obtener grandes volúmenes de plántulas genotípicamente y fenotípicamente iguales a la planta madre.

9.2. MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA

El método de multiplicación más sencillo es por simple división de la planta, o por esquejes, que se realizan cortando pequeñas secciones de tallos u hoja y colocándolas en un sustrato estéril con una temperatura templada de 10 a 12° C. Murashige (1962), citado por Roca y Mroginsky (1991).

En la multiplicación clonal o vegetativa de plantas se utilizan tejidos vegetales que conserven la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular (totipotencia celular)¹⁷ para generar nuevos tallos y raíces a partir de cúmulos celulares presentes en diversos órganos Krikorian (1985), citado por Roca y Mroginsky (1991).

La multiplicación vegetativa comprende desde procedimientos sencillos, conocidos de tiempos inmemoriales por los campesinos de todo el mundo hasta procedimientos tecnológica-

17 * Docente FCAyV; ** Investigador laboratorio

mente avanzados, basados en la tecnología del cultivo de tejidos vegetales, mediante los cuales se puede lograr la propagación masiva de plantas genéticamente homogéneas, mejoradas y libres de parásitos (Debergh & Zimmerinan, (1998).

9.3. MORFOGÉNESIS

La morfogénesis es el resultado de una organizada división y diferenciación celular con patrones definidos, que depende básicamente de la actividad y expresión de criterios genes. Tales procesos se relacionan íntimamente con múltiples factores que son imposibles de definir aisladamente, ya que interactúan en cada fenómeno morfogenético.

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos que suceden frecuentemente durante el cultivo *in vitro* de especies vegetales (Radice, 2008).

a) *Embriogénesis directa u Organogénesis.*

Es la formación de órganos a partir de los tejidos proporcionados por el explante. La organogénesis normalmente envuelve la regeneración de yemas a partir de células meristemáticas.

b) *Embriogénesis indirecta.* Durante este proceso se requiere previamente la formación de un tejido desdiferenciado y desorganizado al que se denomina callo, a partir de este se desdiferencia el tejido. La embriogénesis somática imita a la embriogénesis cigótica que es la formación de embriones a partir de tejidos somáticos *in vitro*, de esta manera la embriogénesis somática y cigótica culminan en la formación de una planta entera a partir de una célula.

9.4. DIFERENCIA ENTRE ORGANOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS

A continuación se detallan tres diferencias principales:

- Los embriones somáticos poseen sistema vascular con conexiones como un sistema de explante inicial, como ocurre en la organogénesis.
- La estructura formada durante la embriogénesis es bipolar (con eje caulinar y radicular).
- En la organogénesis son formadas yemas caulinares que más tarde darán origen a las raíces adventicias.

9.5. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática es un proceso biológico a partir del cual una célula o un grupo de células somáticas transforman y se comportan como un cigoto originando un embrión (semilla), que posteriormente formará una nueva planta.

9.6. CARACTERÍSTICAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Es posible la reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos gracias a que cada una de las células de una planta posee la capacidad necesaria como para permitir el crecimiento y desarrollo de un nuevo individuo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Esta capacidad está dada por la información genética contenida en el DNA nuclear de cada célula somática y se denomina totipotencialidad de la célula. Básicamente la multiplicación asexual se puede realizar debido a que las células poseen un mecanismo de división mitótico, mediante el cual, los vegetales cumplen sucesivas etapas de crecimiento y desarrollo. La división celular mitótica implica una replicación de los cromosomas de las células hijas, por lo que las mismas poseen un genotipo idéntico al de la célula madre (Reinert *et al*, 1958; Steward *et al*, 1958; Bracks-Husemann *et al*, 1970 citado por Roca & Mroginski, 1991).

Las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados

con reguladores del crecimiento (llamados también hormonas vegetales), pueden dividirse dando dos tipos de respuesta. Una dediferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células denominada callo la cual, si se crean las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos (organogénesis o embriogénesis directa) o embriones somáticos (embriogénesis somática denominada también embriogénesis indirecta).

Los embriones somáticos mantienen una similitud con los embriones cigóticos, sin embargo tanto *in vivo* como *in vitro* pueden ocurrir algunas anormalidades en el desarrollo, por ejemplo la faciación y la fusión de los cotiledones Flick *et al*, (1983); Thorpe, (1983) citado por Roca & Mroginski (1991).

El embrión somático presenta las siguientes características:

- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis). Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen por lo que pueden ser separados fácilmente de este, mediante agitadores sheiker.
- Es una estructura bipolar con un ápice radical apical y cotiledones.
- Presenta bandas procambiales entre los ápices.

Los embriones somáticos como estructuras bipolares presentan un eje apical-radical, aislados por un tejido epidérmico, así mismo no poseen conexión con el tejido materno. Estas estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas normales (Jimenez, 1998).

La embriogénesis somática es la formación de embriones a partir de células somáticas que no son producto de la fusión de gametos, por lo que cada una de las plántulas que se producen son fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta original de la que se deriva.

9.7. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA

La embriogénesis somática directa de acuerdo a Gómez (1999), ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callos, este desarrollo directo es producto de la fusión realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante. Esto ofrece la posibilidad de generar muchas aplicaciones como:

- Clonado directo de híbridos comerciales F1, para especies donde el material puede ser vendido como plantas jóvenes para trasplante a campo.
- Clonado rápido de un material de apreciado valor para el mejoramiento, en el estado más temprano posible de su ciclo de vida después del cruzamiento.
- Selección *in vitro* y mejoramiento de las características fenotípicas y genotípicas para diferentes caracteres de plantas completas en el estado más temprano posible de su ciclo de vida.
- Generación de plantas jóvenes, clones de especies fruto del mejoramiento donde cada semilla representa un genotipo diferente.
- Mecanización y automatización de la propagación micro clonal mediante el uso del sistema de biorreactores.

La embriogénesis somática directa, se produce cuando los embriones se forman directamente de las células del explante (por ejemplo células epidérmicas).

9.8. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA

La embriogénesis somática indirecta según Gómez (1999), ocurre cuando las células del tejido deben sufrir varias divisiones mitóticas en presencia de una auxina durante la inducción del estado de células embriogénicas. Es-

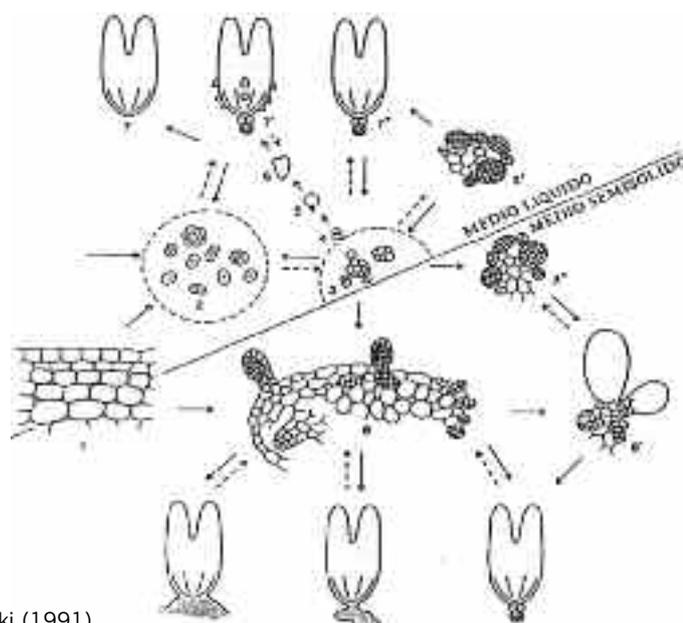
tas divisiones mitóticas dan lugar a un callo, aunque también pueden obtenerse a partir de suspensiones celulares y protoplastos. Los embriones somáticos pueden ser obtenidos desde varias fuentes de cultivos tales como hojas jóvenes, inmaduras, inflorescencias, peciolo, entre otros. La reacción del explante para la embriogénesis está determinada por la edad de éste, así con la concentración de auxinas y citoquininas empleadas.

Existen dos tipos de embriogénesis indirecta, una conocida como **embriogénesis somática de baja frecuencia**, en la que el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo o en pequeños grupos que se desarrollan completamente pasando por los diferentes estados de desarrollo. La otra conocida como **embriogénesis somática de alta frecuencia**, donde los embriones somáticos aparecen entre las 16 a 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mucho mayor, aunque estos grupos aparecen en un número menor de callos (Gómez, 1999).

La embriogénesis somática indirecta se produce con la formación de embriones a partir de callos embriogénicos y que, la gran mayoría de los sistemas que forman embriones somáticos, lo hacen mediante la llamada ruta indirecta. En las dicotiledóneas, por ejemplo las células totipotentes siguen patrones de división y dan origen a pro-embriones, las cuales a su vez dan origen a las etapas de corazón torpedo y cotiledonar; en sí, el desarrollo es progresivo según el patrón cigótico normal, López *et al.* (1993) citado por Florero (2001).

9.9. FASES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ES)

El proceso de la embriogénesis somática indirecta de acuerdo a Fujimura & Komamine (1980) citado por Roca & Mroginski (1991) y Pérez (1998), pasa por cuatro fases (0, 1, 2, 3) reconocidas desde los estadios tempranos de desarrollo (Fig. 1), las cuales fueron observadas en zanahoria (*D. carota*). En el laboratorio de la FCAPF y V se obtuvieron los mismos estadios tanto en zanahoria como en violetas africanas, las que se muestran a continuación.



Fuente: Roca & Mroginski (1991).

Figura 1. Esquema de fases de la embriogénesis somática

Durante la fase 0, la célula aislada por continuas divisiones forma los agregados celulares embriogénicos con la presencia de la auxina en el medio de cultivo; en este tiempo, los agregados de células formados desde las células aisladas, ganan la habilidad para el desarrollo de embriones cuando la auxina es eliminada del medio, dando lugar al estadio 1 (agregado celular). Este agregado es inducido a un nuevo medio libre de auxina en el cual ocurre una rápida división celular de ciertas

partes del agregado celular, dando origen a la fase 2 (globular). En esta fase se produce una división celular acelerada de ciertas partes del agregado producto de la polarización de la síntesis de ADN, dando lugar al embrión globular en la fase final (fase 3), prosigue el continuo desarrollo del embrión al estado de corazón, posteriormente al estado de torpedo, denominados así por la apariencia que estos presentan.

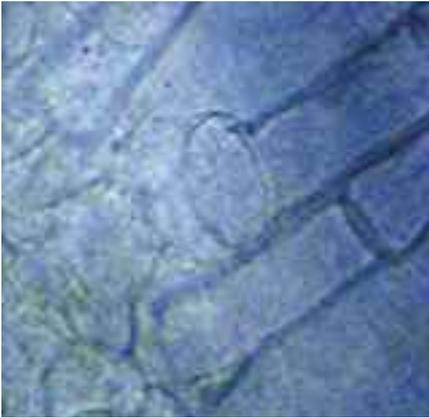


Figura 2. Diferentes formas de células desdiferenciadas en violetas (*S. ionantha*)



Figura 3. Embriones en estado globular

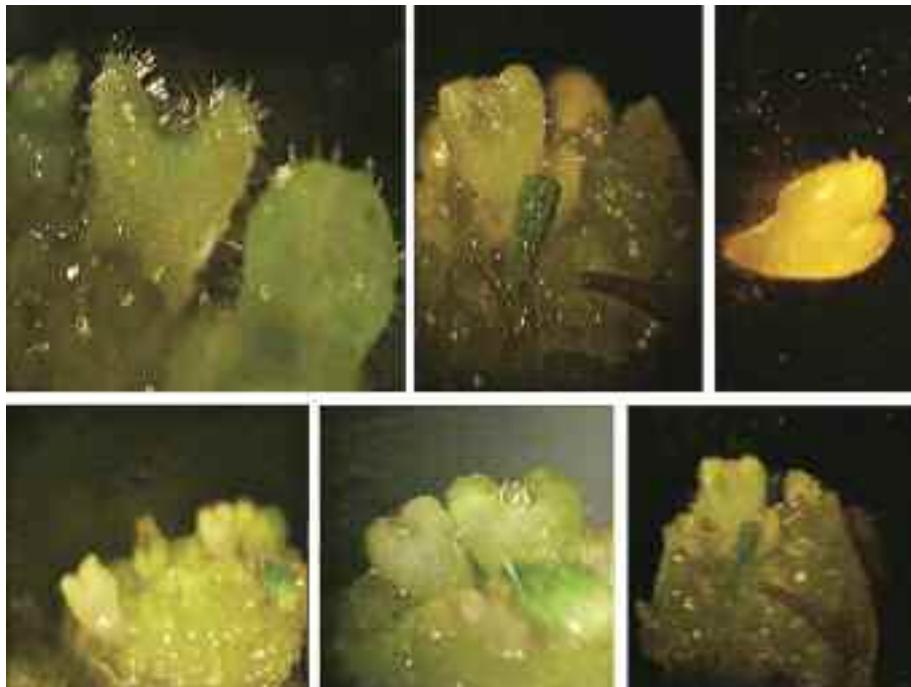


Figura 4. Embriones en estado de corazón

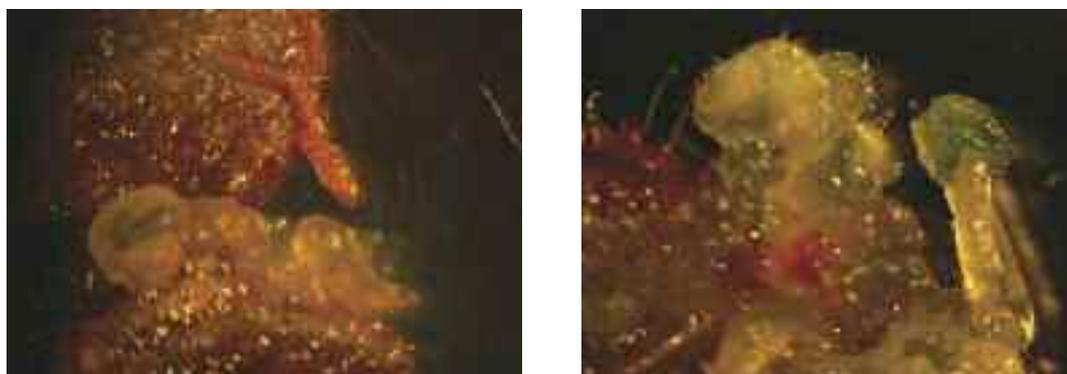


Figura 5. Embrión en estado de torpedo



Figura 6. Embriones en estado cotiledonar

9.10. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Los factores que influyen en la embriogénesis somática son: Tipo de explante, genotipo, estado fisiológico, edad de la planta donadora, medio de cultivo, interacción de los reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas), ambiente, y otros (Radice, 2008).

9.11. INDUCCIÓN MUTAGÉNICA

Con el propósito de observar la acción mutagénica en el cambio del color de las flores en *Saintpaulia ionantha* (violeta africana), se realizó una investigación con la tesis de Chávez Alcoba Nelson, en el que se mostró los cambios en los colores de las flores por efecto de la inducción mutagénica de la luz ultravioleta, 2,4-D y la colchicina.

Las mutaciones somáticas se originan mediante cambios en las células del individuo en vías de desarrollo en diversas partes del vegetal, en cultivo de tejidos estas variaciones son muy frecuentes y aún más cuando se usan agentes mutagénicos, Nodarse *et al.* (1992).

Al respecto E. Mendoza de Gyves (1994) indica que las mutaciones son esencialmente cambios imprevistos que tienen lugar en el material hereditario de un organismo, es decir, comprenden todas las alteraciones que no se pueden explicar como consecuencia de la normal recombinación de la unidad hereditaria. Estas alteraciones son la fuente verdadera de la variabilidad genética responsable en última instancia de la evolución de todas las formas de vida actuales, una mutación cambia la estructura o la función de un organismo y de su descendencia modificando la naturaleza química del material genético o alterando la estructura cromosómica. La mayoría de las veces, tal mutación es nociva (desventajosa) y el cambio que determina será eliminado por selección natural. De vez en cuando, una mutación puede resultar ventajosa o sea que aumenta la probabilidad de sobrevivencia y de

reproducción de los vegetales que son directamente útiles al ser humano.

La mutación es el cambio en la secuencia de bases del ácido desoxirribonucleico (ADN) de un organismo, como fuente primaria de variabilidad genética en las poblaciones. Un agente mutágeno es todo factor capaz de aumentar la frecuencia de mutación natural, existen diversos factores, tanto físicos como químicos, capaces de actuar como agentes mutágenos. En realidad, actuarán como agentes mutágenos todos aquellos agentes capaces de alterar el material genético y en particular, aquellos que alteren la secuencia del ADN.

Las mutaciones son fuente de variabilidad genética en los organismos. La variabilidad causada por las mutaciones inducidas no es esencialmente diferente de la causada por las mutaciones espontáneas durante la evolución. El uso directo de las mutaciones es una herramienta muy valiosa para el mejoramiento de plantas, particularmente cuando se desea mejorar uno o dos caracteres fácilmente identificables en una variedad bien adaptada (Suárez, 2006).

9.12. TIPOS DE MUTACIONES

Las mutaciones pueden ser espontáneas o inducidas, las primeras son aquellas que surgen normalmente como consecuencia de errores durante el proceso de replicación del propio DNA. Tales errores ocurren con una frecuencia de 10^{-7} a 10^{-11} .

Las mutaciones inducidas surgen como consecuencia de la exposición a mutágenos químicos, biológicos o a radiaciones. En cualquier caso, las mutaciones pueden ser: Puntuales (cuando afectan a un par de bases) o mutaciones que afectan a muchos pares de bases. Cuando es puntual, el resultado puede ser una proteína defectuosa (entonces la mutación se conoce como mutación por cambio de sentido, pues origina la sustitución de un aminoácido por otro), o una proteína incom-

pleta (mutación sin sentido, porque la mutación ha originado un codón de fin antes de tiempo), o bien una proteína normal (mutación silenciosa), porque el aminoácido al que ha dado origen es el mismo debido a la degeneración del código genético. Estas mutaciones puntuales son reversibles.

9.13. MUTACIÓN ESPONTÁNEA E INDUCIDA

Según Sánchez (2007) las mutaciones pueden ser espontáneas e inducidas:

9.13.1. Mutación espontánea

Se produce de forma natural o normal en los individuos. Las principales causas de las mutaciones que se producen de forma natural o normal en las poblaciones son tres:

- Errores durante la replicación.
- Lesiones o daños fortuitos en el ADN.
- Los elementos genéticos transponibles.

9.13.2. Mutación inducida

Se produce como consecuencia de la exposición a agentes mutagénicos físicos o químicos que producen mutaciones (cambios) en la secuencia del ADN.

a) Mutaciones Físicas. Las mutaciones resultan de la aplicación de agentes físicos como radiaciones:

- Las radiaciones electromagnéticas como los rayos X y los rayos gamma.
- Las radiaciones corpusculares como los rayos α , los rayos β y los flujos de protones neutrones que generan los reactores nucleares u otras fuentes de radiactividad natural o artificial.
- Factores físicos como los ultrasonidos, los choques térmicos, la centrifugación, etc.

Microsof Encarta (2006), indica que las radiaciones ionizantes (rayos X, rayos cósmicos y rayos gamma), no ionizantes (sobre todo la radiación ultravioleta) también inducen mutaciones en el DNA; las primeras se originan por los radicales libres que reaccionan con el DNA inactivándolo, y las segundas aparecen como consecuencia de la formación de dímeros de pirimidina en el DNA, es decir, como consecuencia de la unión covalente de 2 bases pirimidínicas adyacentes.

Así mismo las mutaciones que afectan a muchos pares de bases pueden ser deleciones (en las que se elimina una región del DNA), inserciones (se añaden nuevas bases), translocaciones (grandes fragmentos de DNA se cortan e integran en nuevas localizaciones, incluso a veces en diferentes cromosomas) e inversiones (en las que la orientación de segmentos particulares del DNA resulta invertida con respecto al resto del cromosoma).

Los productos más importantes de la acción de la luz UV son dímeros (timina-timina; timina-citosina; citosina-citosina) que se forman entre pirimidinas (T-C) adyacentes, lo que incrementa enormemente la probabilidad de que durante la replicación del DNA, la DNA polimerasa inserte un nucleótido incorrecto en tal posición.

b) Mutaciones Químicas. Las mutaciones químicas son cambios producidos en el DNA resultado de la aplicación de productos químicos como:

- Los análogos de las bases nitrogenadas.
- El ácido nitroso (HNO_2), porque desamina ciertas bases nitrogenadas.
- Los alcaloides como la cafeína, la nicotina y otros.
- El colchicinum, que produce alopoloidias en las estructuras de las células.

- 2-4 Diclorofenoxiacético, provoca cambios en la estructura de la cromatina, también en cultivos de células humanas.

La sustancia por excelencia utilizada para inducir la poliploidía es la colchicina, que es un alcaloide que se encuentra en las semillas y en los bulbos de *Colchicum autumnale* L. Éste afecta a las células en división de tal forma que, a la separación de las cromátidas de cada cromosoma no sigue la migración de las mismas hacia los polos opuestos porque el efecto de la misma es inhibir la formación del huso acromático. Al no haber movimiento de las cromátidas a los polos no se establecen las corrientes citoplásmicas que determina la formación de la membrana celular que se formará entre las dos células hijas; por lo tanto, la mitosis que se produce bajo la influencia de la colchicina se denomina c-mitosis dando lugar a la duplicación del complemento cromosómico completo.

9.14. NIVELES MUTACIONALES

Los niveles mutacionales es una clasificación de las mutaciones basada en la cantidad de material hereditario afectado por la mutación, descrito como sigue:

- Mutación génica
- Mutación cromosómica
- Mutación genómica

9.14.1. Mutación génica

Las mutaciones pueden ser:

- Sustituciones de bases. Cambio o sustitución de una base por otra en el DNA.
 - Transiciones: cambio de una purina (Pu) por otra purina, o bien cambio de una pirimidina (Pi) por otra pirimidina. (Mutación silenciosa).
 - Transversiones: cambio de una purina (Pu) por una pirimidina (Pi) o cambio de una pirimidina (Pi) por una purina (Pu).
- Inserciones o adiciones y deleciones de nucleótidos. Se trata de ganancias de uno o más nucleótidos (inserciones o adiciones) y de pérdidas de uno o más nucleótidos (deleciones). Tienen como consecuencia cambios en el cuadro o pauta de lectura cuando el número de nucleótidos ganado o perdido no es múltiplos de tres.
 - Duplicaciones. Se origina con la repetición de un segmento de DNA en el interior de un gen.
 - Inversiones: Se produce cuando un segmento de DNA del interior de un gen se invierte, para ello es necesario que se produzcan dos giros de 180°, uno para invertir la secuencia y otro para mantener la polaridad del DNA.
 - Transposiciones. Es producida cuando un segmento de un gen cambia de posición para estar en otro lugar distinto del mismo gen o en otro lugar del genoma.

9.14.2. Mutación cromosómica

La mutación que afecta a un segmento cromosómico que incluye varios genes, puede dar origen a cambios cromosómicos estructurales; estos son los cambios en la estructura interna de los cromosomas, los cuales se pueden agrupar de acuerdo a las pérdidas o duplicaciones y reparto.

- Las que suponen pérdidas o duplicaciones de segmentos de cromosoma:
 - Delección cromosómica: Es la pérdida de un segmento de un cromosoma.
 - Duplicación cromosómica: Es la repetición de un segmento del cromosoma.
- Las que suponen variaciones en la distribución de los segmentos de un cromosoma:
 - Inversiones: Son producidas cuando un segmento cromosómico de un cromosoma se encuentra situado en posición invertida.

- Translocaciones: Son dadas cuando uno o varios segmentos cromosómicos de un cromosoma se sitúan en otro cromosoma.

9.14.3. Mutación genómica

Cuando la dotación cromosómica normal de un individuo está compuesta por varios genomas o juegos completos de cromosomas se dice que es un poliploide. Si los genomas son iguales, el poliploide es un autopoliploide y se lo denomina autotriploide, autotetraploide, autopentaploide, n-ploide según el número de juegos idénticos de cromosomas que tengan sus células somáticas (3, 4, 5 ó n). Sus números cromosómicos serán por tanto 3x, 4x, 5x, nx, siendo x el número básico antes definido. Así mismo si los genomas que componen la dotación cromosómica del poliploide no son iguales, entonces se llama alopoloide. El alopoloide reúne en su complemento cromosómico dos o más especies diploides. Si una especie alopoloide está formada por dos genomas distintos, se llama alotetraploide ($G_1 G_1 G_2 G_2$), si son tres lo genomas, se trata de un alohexaploide ($G_1 G_1 G_2 G_2 G_3 G_3$), etc.

La mutación que afecta a cromosomas completos (por exceso o por defecto) o a juegos cromosómicos completos. Puede dar origen a cambios cromosómicos numéricos como las producidas por la colchicina, producto de una duplicación cromosómica.

Es importante aclarar el concepto de mutación silenciosa, una mutación silenciosa es cualquier alteración en la secuencia de nucleótidos del DNA que no produce cambio en el fenotipo estudiado. Imaginemos que la característica externa o fenotipo analizado es simplemente la función de un enzima, es evidente que existen mutaciones en la secuencia de nucleótidos del DNA que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos, pero también hay mutaciones en el DNA que producen cambios en la secuencia de aminoácidos que no alteran la función del enzima

analizado. Ambas tipos de mutaciones son silenciosas ya que ninguna altera la función del enzima.

9.14.4. Especificidad mutacional

La especificidad mutacional significa que muchos agentes mutágenos tienden a producir un determinado tipo de mutación, por ejemplo:

- Etilmetanosulfonato (EMS): produce fundamentalmente transiciones GC, AT.
- Nitrosoguanidina (NG): produce esencialmente transversiones GC, TA.
- Luz ultravioleta (UV): produce transiciones y transversiones.
- Colchicina: produce duplicaciones cromosómicas

9.15. BIBLIOGRAFÍA

- Cardone, S. Olmos, S. Echenique, V. 2004. PARTE III Métodos para generar variabilidad Capítulo 1 Variación somaclonal. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales (en línea). Consultado 20 de dic. 2007. En www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte3_ap1.pdf. Formato pdf.
- Chavez, A. N. 2008 Embriogénesis somática y mutagénesis por medios físicos y químicos en el cultivo de la violeta africana (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl) Tesis de grado para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Mayor de San Simón. Bol.
- Florero, M.L. 2001. Embriogénesis somática en el cultivo de zanahoria Tesis de grado para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Mayor de San Simón. Bol.
- Gómez, R. 1999. VI Curso de post-grado por tutoría a distancia en tecnología de semilla. Modulo 1. Santa Clara, Cuba. Instituto de biotecnología de las plantas. UCLV, pp. 3-87.
- Haensch, Kt. 2007. Influence of 2, 4-D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryos in long-term cultures of *Pelargonium x domesticum* cv. Madame Loyal by Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. CL. Electronic Journal of Biotechnology 10 (1)69-77. En (línea) Consultado el 20 octubre

- del 2008. En: www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue1/full/9/
- Jimenes G.E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. In Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Ed. Las villas, Cuba, ed. GEO, pp. 45-56.
- Marcano, A.K., Molina, P. G., Oropeza, M., De Garcia, E. 2002. Optimización del proceso de embriogénesis somática en variedades venezolanas de caña de azúcar. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. *Botánica Acta Científica Venezolana*, 53: 251-257.
- Mateos P.F.M. 2005. Tema 9: mutación. I bases moleculares de la mutación (en línea). Consultado 20 de agosto 2007. En: nostoc.usal.es/sefin/MI/tema09MI.html – 22
- Nodarse, O; I. Santana, I; Chinea, A; Carbó, L; Díaz, A; Hernández C. 1992. Obtención y selección de sub-clones de caña de azúcar resistentes a la roya a partir de la variedad c127-78 mediante cultivo de tejidos. *Caña de azúcar Vol. 10(02): 61-70*. La Habana, CU.
- Radice, S. 2008. Parte Ii Herramientas Básicas. (en línea) Consultado 20 de marzo del 2008. En www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap1.pdf. Formato de archivo: PDF/Adobe Acrobat.
- Reyes M.E. 2001 Ajuste de medios nutritivos para la obtención de callos embrionarios de zanahoria (*Daucus carota*), Tesis de grado para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Mayor de San Simón. Bolivia.
- ROCA M.; MROGINSKI L., 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura. CIAT. Cali, Colombia. Liahona, pp. 960.
- SANCHEZ, J.L.G. 2007. Las Mutaciones. Consultado 20 de noviembre del 2007. En: www.ucm.es/info/genetica/grupo/Mutacion/mutacion.htm Formato de archivo: htm.
- SUAREZ, E.C. 2006. Mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones. EN I CURSO DE CAPACITACIÓN EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL ARROZ (30 de octubre ala 10 de noviembre del 2006). Instituto de Investigaciones del Arroz (IIArroz). La Habana, CU. E.mail: enrique@iiarroz.cu. pp. 12.

Capítulo 10

Conservación *in vitro* de especies vegetales

Ximena Cadima & Carmen L. Villarroel

10.1. CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

La gran mayoría de las especies cultivadas se han originado en ocho centros de origen donde se conserva la mayor diversidad genética. Bolivia está ubicada dentro de uno de estos centros de origen y en su intrincada geografía, que ha dado origen a innumerables microclimas, se han diversificado de manera particular numerosas especies de importancia económica mundial y especialmente local.

Los recursos genéticos son la base de la alimentación de la humanidad, suplen la mayoría de necesidades (incluyendo el vestido y el refugio) y se utilizan en la industria para fabricar combustibles, medicinas y otros productos (Jaramillo & Baena, 2000). Por lo tanto, son recursos estratégicos para el desarrollo de todo país, ya que se relacionan con la satisfacción de necesidades básicas del hombre y con la solución de problemas severos como el hambre y la pobreza. Sin embargo, a pesar de la invaluable importancia económica, productiva y cultural de estos recursos, ellos están en riesgo de erosionarse y hasta de desaparecer. Las causas son diversas, como cambios en el ambiente y en los hábitos alimentarios, destrucción de hábitats naturales, sustitución de variedades nativas, cambios en las prácticas agrícolas y otras.

En consecuencia, es de fundamental importancia el desarrollar estrategias integrales para la conservación de los recursos genéticos particularmente en los países poseedores de gran diversidad como Bolivia.

La conservación de recursos genéticos puede ser a nivel *in situ* en sus hábitats naturales, *ex situ* fuera de sus hábitats naturales bajo condiciones controladas, o bien combinando de manera complementaria los métodos *ex situ* e *in situ*. La selección de uno o un conjunto de métodos depende de las necesidades, los recursos disponibles y de la(s) especie(s) objetivo (Jaramillo & Baena, 2000).

La **conservación *in situ*** de especies agrícolas se realiza fortaleciendo la conservación en los campos de agricultores donde se cultivan desde tiempos ancestrales en zonas cuyas características medioambientales y socioculturales son favorables al mantenimiento y evolución de la diversidad genética, tanto cultivada como silvestre (García *et al.*, 2003). La conservación *in situ* es dinámica en relación a la naturaleza semi-estática de la conservación *ex situ*, porque mantiene el potencial evolutivo de las especies y las poblaciones (Ramanatha Rao, 2001).

La **conservación *ex situ*** es la conservación de genes o genotipos fuera de su ambiente de ocurrencia natural, para uso actual o futuro

(Jaramillo & Baena, 2000). Se aplican diferentes técnicas de conservación que varían de acuerdo a la especie objetivo. Para las especies vegetales que se propagan vía semilla botánica y son ortodoxas (es decir soportan la disminución del contenido de humedad de la semilla sin perder su viabilidad), la forma de conservación es por semilla en contenedores almacenados a bajas temperaturas. Las especies de propagación vegetativa o de semilla recalcitrante (que no soportan la disminución del contenido de humedad), deben conservarse clonalmente para lo cual se utilizan campos de cultivo o también técnicas de cultivo de tejidos.

Brevemente, la conservación *ex situ* puede realizarse en forma de (Ramanatha Rao, 2001):

- Plantaciones en campo
- Colecciones en invernaderos
- Colecciones de semilla y/o polen a bajas temperaturas
- Colecciones de ADN
- Jardines botánicos
- Colecciones *in vitro*

10.2. CONSERVACIÓN *IN VITRO*

Una gran cantidad de especies vegetales no pueden ser conservadas por semilla, y para varias otras incluso la conservación por tubérculos, rizomas, raíces o árboles resulta complicado. En este sentido, para algunas especies la conservación *in vitro* es la única opción disponible (Ramanatha Rao, 2001). Las colecciones de campo a menudo están expuestas al ataque de enfermedades o adversidades climáticas severas, que ponen en riesgo las colecciones de germoplasma. Una alternativa valiosa para complementar estas colecciones es la conservación *in vitro* (Hor, 2001).

En general, las técnicas de cultivo de tejidos se aplican para apoyar procesos de manejo y aprovechamiento de germoplasma en forma

más eficiente, como ser: la recuperación de la sanidad de las plantas, la producción de semilla, la micropropagación masiva de material vegetal, y la conservación de “semilla” por mayor tiempo y de manera menos costosa.

Estas técnicas son particularmente importantes para especies de propagación vegetativa y cuando la intención es mantener uniformidad, calidad genética y fitosanitaria.

Normalmente, la conservación *in vitro* es considerada parte fundamental de las estrategias de conservación *ex situ* de colecciones de germoplasma (Cadima & Rojas, 2004; Cadima *et al.*, 2004). Las primeras experiencias sobre conservación *in vitro* reportadas en Bolivia datan de la década del 90 en papa y otros tubérculos andinos (Cadima *et al.*, 1996; Cadima, 1996), que sirvieron de base para la aplicación posterior en diferentes cultivos en el país. Actualmente, se utilizan técnicas de cultivo de tejidos para conservar clonalmente colecciones de germoplasma de diferentes especies en laboratorio (papa y otros tubérculos andinos, yacón, arracacha, achira, banano, frutilla, manzano, durazno, uchuva, pasifloras, especies forestales leñosas, plantas medicinales, entre otros) (PROINPA, 2008; Coca *et al.*, 2007; Rojas, 2005; Coca *et al.*, 2004; Ugarte, 2004; Paz, 2004).

El cultivo de tejidos es una técnica complementaria de la conservación *ex situ*, porque permite salvaguardar material con riesgo de perderse en campo, adicionalmente, permite recuperar la sanidad de las plantas las cuales se mantienen limpias *in vitro*, permitiendo su aprovechamiento para producir semilla de alta calidad cuando es requerida para mejorar su conservación en campo debido a problemas de degeneración, o bien para la devolución o reposición de variedades saneadas a comunidades ya sea por demanda o porque se hayan perdido en sus zonas de producción (PROINPA, 2008).

10.2.1. Definición de conservación *in vitro*

Conservar *in vitro* consiste en aplicar técnicas de cultivo de tejidos para controlar el crecimiento de las plantas viables, ya sea reduciendo o deteniéndolo, a través de la manipulación de los componentes del medio de cultivo y/o las condiciones de almacenamiento (Jaramillo & Baena, 2000).

10.2.2. Géneros (cultivos) que se pueden conservar *in vitro*

Utilizando técnicas de cultivo de tejidos es posible conservar *in vitro* un amplio rango de especies en diversos tipos de muestra como plantas completas, semillas, retoños, yemas, ápices caulinares, meristemas, óvulos, embriones, células en suspensión, protoplastos, anteras, polen y ADN. En el Cuadro 1 se muestra un resumen de los cultivos reportados por Roca *et al.* (1991) que son conservados bajo condiciones *in vitro*. Engelmann (1991) menciona que las técnicas de cultivo de tejidos se aplican en más de 1.000 especies.

10.2.3. Ventajas y limitaciones de la conservación *in vitro*

Las ventajas de la conservación *in vitro* en relación a una conservación *in vivo* se listan a continuación:

- Permite ahorro de espacio y tiempo. Por ejemplo alrededor de 900 accesiones de la colección *in vitro* de papa custodiada por la Fundación PROINPA se mantienen en menos de 4 metros cuadrados, en tanto que en el campo se requieren al menos 5 mil metros cuadrados.
- Permite el almacenamiento de diferentes especies en un solo ambiente. Por ejemplo, en el caso de las colecciones de tubérculos y raíces custodiadas por PROINPA, es posible su almacenamiento *in vitro* en un mismo ambiente, en cambio en campo se requieren condiciones de puna para tubérculos y yungas para raíces.
- El cultivo *in vitro* permite conservar especies vegetales en peligro de extinción (Pierik, 1990).
- En condiciones *in vitro* se elimina el riesgo de ataque de factores bióticos y abióticos que normalmente ocurren *in vivo*.

Cuadro 1. Géneros que se pueden conservar *in vitro*

| Cultivos | Géneros | | |
|----------------------------|---|---|---|
| Propagados Vegetativamente | <i>Solanum</i> <i>Manihot</i> <i>Ipomoea</i> <i>Xanthosoma</i> <i>Colocasia</i> <i>Dioscorea</i> <i>Arracacia</i> <i>Smallanthus</i> | <i>Canna</i> <i>Saccharum</i> <i>Vitis</i> <i>Olea</i> <i>Oxalis</i> <i>Ullucus</i> <i>Tropaeolum</i> | <i>Ananas</i> <i>Ficus</i> <i>Agave</i> <i>Allium</i> <i>Vanilla</i> <i>Piper</i> <i>Musa</i> |
| Propagados sexualmente | <i>Citrus</i> <i>Elaeis</i> <i>Coccus</i> <i>Malus</i> <i>Persea</i> <i>Mangifera</i> | <i>Theobroma</i> <i>Prunus</i> <i>Durio</i> <i>Anacardium</i> <i>Hebea</i> <i>Chinchona</i> | <i>Macadamia</i> <i>Cinnamomum</i> <i>Coffea</i> <i>Camelia</i> <i>Artocarpus</i> <i>Arachis</i> |

Fuente: modificado de Roca *et al.* (1991).

- El costo de mantenimiento es inferior a cualquier otro sistema *ex situ*. Los costos de implementación *in vitro* son altos, pero los de mantenimiento en el largo plazo son menores a cualquier otro sistema *ex situ*.
- El intercambio de material es más fácil. Por cuanto cada planta se almacena en pequeños envases (como tubos de ensayo), se facilita el movimiento de material de un lugar a otro.
- El movimiento de germoplasma entre países o de centros internacionales hacia las entidades de investigación nacionales es mucho más seguro debido al mínimo riesgo que implican las plantas *in vitro*, de llevar enfermedades u otros patógenos de un lugar a otro.
- Permite el almacenamiento de plantas que no pueden reproducirse por semilla o cuyas semillas son difíciles de germinar (Pierik, 1990).
- Disponibilidad permanente de material genético. Las técnicas *in vitro* permiten planificar la producción, haciendo posible tener material disponible en cualquier momento del año (Pierik, 1990).
- Material almacenado libre de enfermedades. El establecimiento *in vitro* implica el manejo de material sano, lo cual puede incrementarse aplicando técnicas como de limpieza viral.
- Almacenamiento bajo condiciones que limitan el crecimiento. Con las técnicas *in vitro* es posible retardar el crecimiento de una forma eficaz, con lo que se disminuye el número de subcultivos necesarios (Pierik, 1990).
- Permite al fitomejorador contar con material libre de patógenos, listo para su multiplicación masiva, que puede llegar a volúmenes importantes en periodos de tiempo mucho más reducidos.

Además de las ventajas, también se encuentran algunas **limitaciones** de la conservación

in vitro que pueden ser superadas o disminuidas de acuerdo a los recursos disponibles y la(s) especie(s) objetivo(s):

- Los materiales, equipos y reactivos, son costosos y generalmente hay que importarlos. Esto es particularmente importante al momento de establecer un laboratorio, o para reponer o mantener los equipos dañados u obsoletos.
- Existe riesgo de perder material, cuando ocurre un corte de fluido eléctrico. La conservación *in vitro* es dependiente de un suministro permanente de energía eléctrica. Para disminuir los riesgos de cortes de energía, es necesario contar con un doble sistema de suministro de fluido eléctrico.
- Puede existir inestabilidad genética. Esto es relevante para algunas especies más susceptibles a mutaciones que otras. Sin embargo el riesgo es manejable al disminuir el número de subcultivos con la conservación *in vitro*.
- Eventual pérdida de potencial regenerativo. Podría suceder en caso de malformaciones o modificaciones del explante durante el almacenamiento *in vitro*, como por ejemplo ocurrencia de vitrificaciones, formación de callos o dormancia permanente de los meristemas.
- Se debe contar previamente con personal adecuadamente capacitado tanto en las técnicas de laboratorio como en el manejo de la documentación, ya que un error en el manipuleo causaría una desacreditación y pérdida de confiabilidad del laboratorio y del sistema de conservación *in vitro*

10.2.4. Requerimientos para la conservación *in vitro*

Los requerimientos para la conservación *in vitro* son muy semejantes a los de la micropropagación (Pierik, 1990; Engelmann, 1991; Hor, 2001):

- Aptitud del explante para ser introducido y multiplicado *in vitro*. Es importante elegir el explante más adecuado para facilitar el proceso de introducción y multiplicación *in vitro* previa a la conservación. Si el explante responde bien a estos procesos, entonces se incrementa la probabilidad de que tenga éxito durante el proceso de conservación *in vitro*.
- Mantener la viabilidad y el potencial regenerativo del material. Para ello los explantes más adecuados son los meristemos, ápices, yemas axilares y embriones cigóticos.
- Mantener la estabilidad genética. Para ello los explantes más adecuados son los meristemos, ápices, yemas axilares y embriones cigóticos.
- Garantizar la ausencia de enfermedades. Durante el proceso de establecimiento y multiplicación *in vitro* previos a la conservación, se debe garantizar que los explantes y plántulas regeneradas estén completamente libres de enfermedades (particularmente sistémicas).
- Debe existir una baja probabilidad de daño o muerte del material. Las condiciones del medio y del medio ambiente deben combinarse para disminuir los riesgos de pérdida del material conservado.
- Elegir el envase más apropiado para la conservación. El tipo de envase puede jugar un rol muy importante en la etapa de conservación. Son utilizados normalmente tubos de ensayo de diferentes tamaños de acuerdo a la especie objetivo (por ejemplo de 16 x 100 mm con tapas color neutro para papas, 25 x 150 mm para yacón), o bien frascos de vidrio o plástico (tipo Magenta) para plantas de mayor desarrollo. Lo importante es que el envase debe permitir un adecuado intercambio gaseoso, reducir los riesgos de contaminación y no ocupar mucho espacio en las cámaras de conservación.
- Documentación y sistematización de la información. Todo el proceso *in vitro* debe estar debidamente registrado y documentado en una base de datos, para permitir una adecuada toma de decisiones sobre el manejo del material en las diferentes etapas del proceso.

10.3. PROCEDIMIENTOS PARA INHIBIR O FRENAR EL DESARROLLO *IN VITRO*

Básicamente existen dos alternativas para la conservación *in vitro*: crecimiento lento para la conservación a corto y mediano plazo de colecciones activas, y la criopreservación para la conservación a largo plazo de colecciones base (Hor, 2001). Se indican a continuación algunos procedimientos disponibles para estos fines:

10.3.1. Conservación a corto y mediano plazo

- Cambiando la composición del medio nutritivo. Haciendo cambios en los componentes del medio de cultivo se puede ya sea estimular el crecimiento o bien retardar el desarrollo de las plántulas para el caso de una conservación *in vitro*.
- Deshidratación, disminuyendo el potencial osmótico (con el uso de manitol o sorbitol). El potencial osmótico de un medio nutritivo resulta de sumar los potenciales osmóticos de sus constituyentes (minerales, azúcares, agar o phytigel, etc.). Cuando el potencial osmótico es bajo, el crecimiento y organogénesis son reducidos como consecuencia de la imposibilidad de absorción de agua. El potencial osmótico de los medios nutritivos utilizados para cultivo *in vitro* puede bajarse por la adición de manitol o sorbitol, que son sustancias fisiológicamente inactivas (Pierik, 1990).
- Modificando los gases del medio ambiente. Esto se logra disminuyendo la presión

atmosférica, por ejemplo a través de la reducción de la presión del oxígeno por sustitución de otro gas como el nitrógeno. También disminuyendo la cantidad de oxígeno colocando una capa de aceite mineral sobre los tejidos (Engelmann, 1991).

- Uso de inhibidores como ABA (Acido abs-císico) y carbón activado (Engelmann, 1991).
- Almacenamiento a bajas temperaturas que provocan la inhibición del crecimiento de las plántulas *in vitro*. Para especies de hábitats fríos y templados se recomienda temperaturas entre 2 a 15° C, y entre 8 a 15° C para especies tropicales y subtropicales.
- Otros procedimientos menos frecuentemente utilizados pero citados por Engelmann (1991) son la encapsulación o el uso de semillas sintéticas (revestimiento de embriones somáticos con perlas de alginato) y desecación parcial de tejidos (callos y embriones somáticos). Dehmer (2008, comunicación personal¹⁸) menciona también la conservación *in vitro* de papa a través de microtubérculos por un período de 12 a 15 meses aplicado rutinariamente en la colección de papa del IPK de Alemania.

10.3.2. Conservación a largo plazo

- El único procedimiento disponible para la conservación a largo plazo, es la criopreservación donde el material se congela en nitrógeno líquido (-196° C) y se detiene completamente el crecimiento (Engelmann, 1991; Hor, 2001).
- De acuerdo a la disponibilidad de recursos y la(s) especie(s) objetivo(s), y para tener mejores resultados, se pueden combinar

18 Dr. KLAUS J. DEHMER. Curator Gross Luesewitz Potato Collections, Head IPK Branch Station North Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK). Genebank Department / GLKS.

dos o más de los procedimientos arriba indicados.

10.3.3. Ventajas de la conservación *in vitro* a bajas temperaturas

De acuerdo a Pierik (1990), algunas ventajas de la aplicación de bajas temperaturas para la conservación *in vitro* son:

- Se frena el crecimiento y desarrollo de una forma natural:
 - Crecimiento inhibido a bajas T°.
 - Completamente detenido por congelación.
- Se limita el número de subcultivos:
 - A bajas T° 1-2 subcultivos.
 - 0 subcultivos material congelado.
- Disminuye el riesgo de mutaciones.
- Es fácil planificar la producción porque hay disponibilidad de material todo el año.
- Material haploide puede ser conservado a bajas T° (se vuelve diploide a T° más altas).
- Material rejuvenecido *in vitro* se mantiene juvenil durante el almacenado en frío.

10.4. BANCO GENÉTICO *IN VITRO* ACTIVO

La conservación de un banco genético *in vitro* activo se realiza a corto y mediano plazo: 1-3 años. Los métodos elegidos para este fin deben permitir minimizar la división celular y el crecimiento, pero incrementando la longevidad de las plántulas sin provocar cambios genéticos (Hor, 2001).

10.4.1. Etapas para el establecimiento de un banco genético *in vitro* activo

El procedimiento para la implementación de un banco *in vitro* activo incluye el establecimiento, el saneamiento de las plantas, la se-

lección y preparación de los medios de cultivo más adecuados, el establecimiento de las condiciones físicas de conservación, las labores de mantenimiento durante la conservación, el monitoreo de la estabilidad genética del material conservado, y la documentación y sistematización de la información durante todo el proceso *in vitro*.

a) Establecimiento *in vitro*. El proceso para la conservación *in vitro* se inicia con el establecimiento de los explantes a condiciones *in vitro*. El procedimiento es el mismo que para el caso de la micropropagación. Es importante resaltar el cuidado que se debe tener en la desinfección de los explantes al momento de establecer para evitar problemas de contaminación posteriores. Son recomendables los explantes obtenidos de invernadero donde se aplica una pre-desinfección a las plantas. Entre las soluciones desinfectantes más utilizadas están: NaOCl, CaOCl.

b) Saneamiento de las entradas. Es altamente recomendable conservar *in vitro* material libre de enfermedades. Durante el proceso de establecimiento y desinfección de los explantes se eliminan particularmente hongos y bacterias, pero si el material estuviera infectado de virus, entonces se prefiere la aplicación de técnicas adicionales como la termoterapia y/o cultivo de meristemas para limpiar de virus o al menos disminuir la concentración de las partículas virales en las plantas antes de su conservación.

c) Medios de cultivo. Se utilizarán los medios de cultivo apropiados para cada etapa durante el proceso de conservación *in vitro* de acuerdo a la(s) especie(s) objetivo. Para la etapa misma de conservación se cambiará la composición del medio nutritivo. Son comunes los cambios en la cantidad de sales minerales y/o azúcar (por ejemplo la mitad de la solución de sales del medio estándar, altas concentraciones de azúcar), el uso de ácido abscísico, la disminución del potencial osmótico del medio añadiendo

do manitol o sorbitol, entre otros (Westcott, 1981b; Engelmann, 1991; Cadima *et al.*, 1996; Cadima, 1996; Sarkar & Naik, 1998).

d) Condiciones físicas para la conservación *in vitro*. En la cámara de conservación, es recomendable aplicar una reducción en la intensidad lumínica (por ejemplo 1.000 – 1.500 lux para el caso de tubérculos andinos, 1.000 lux para banana), combinado con bajas temperaturas (por ejemplo 6-8 °C para conservación a mediano plazo de tubérculos y raíces andinas) y un fotoperiodo de 16 horas. Aunque de acuerdo a Engelmann (1991) la necesidad de intensidad lumínica no es estándar y puede variar de una especie a otra, y la temperatura de conservación también dependerá de la sensibilidad al frío de la(s) especie(s) objetivo, por ejemplo la yuca y la palma aceitera no resisten temperaturas menores a 18°C.

e) Labores de mantenimiento. Una vez transferidos los explantes al medio de cultivo de conservación apropiado, es recomendable mantener el material en la cámara de crecimiento normal hasta que desarrollen las raíces. Tal como menciona Engelmann (1991), la presencia del sistema radicular incrementa las capacidades de sobrevivencia de las plántulas en conservación. Sin embargo este mismo autor también menciona que algunas veces es mejor trasladar el material inmediatamente a las condiciones de conservación para evitar la ocurrencia de necrosis y producción de componentes fenólicos. Esto deberá ser evaluado para el caso de las especies con alta tendencia a la fenolización, como algunos tubérculos y raíces (oca y yacón en particular), y frutales. Antes de llevar a la cámara de conservación se deben sellar los envases con parafilm para evitar una mayor desecación del medio de cultivo.

Durante la etapa misma de conservación, es necesario realizar un seguimiento y monitoreo

del material conservado controlando los siguientes aspectos:

- Condiciones de la temperatura y humedad de la cámara de conservación.
- La iluminación (focos en buen estado), intensidad lumínica y número de horas luz.
- Estado del material en conservación, que debe ser evaluado periódicamente (por ejemplo cada mes) monitoreando el crecimiento de las plántulas, yemas viables, formación de raíces, etc. Plántulas bajo largos periodos de conservación podrían presentar anormalidades fenotípicas como vitrificación, formación de callos, tallos flácidos, raíces engrosadas, etc., debido a una limitada nutrición de las plántulas por efecto de las condiciones de estrés a las que están sometidas (Sarkar *et al.*, 2005); esto puede variar, sin embargo, por la especie y la variedad, por ejemplo, se ha observado que en papa, algunos materiales pueden presentar anormalidades después del año en conservación, aunque especies como *S. x curtilobum* y *S. x juzpeckzukii* altamente tolerantes a las bajas temperaturas en campo, también resultaron ser las más vigorosas *in vitro* a bajas temperaturas (Westcott, 1981a). Especies tropicales son generalmente sensibles a bajas temperaturas y pueden sufrir daños fisiológicos durante largos períodos en conservación (Engelmann, 1991). Especies arbóreas como las palmeras han reportado plántulas vigorosas después de 12 años bajo conservación (Litz *et al.*, 2004).
- Medio nutritivo, verificar la cantidad de medio y controlar la presencia de agentes contaminantes.

10.4.2. Renovación o refrescamiento del material (transferencia a condiciones de crecimiento normal)

Normalmente se conservan varios envases con varias plantas de cada accesión/variedad, se recomienda eliminar los que presenten contaminación, y renovar (cambiar a condicio-

nes de crecimiento normal) las plántulas que presenten síntomas de degeneración o mucho estrés. Para ello se debe retirar el material de condiciones de conservación, sembrar en un medio de multiplicación y dejar crecer en la cámara de crecimiento normal hasta su recuperación. Si fuera necesario, realizar varios subcultivos hasta obtener plántulas vigorosas con suficientes yemas/brotos, ya sea para distribución del material, transferencia a condiciones *in vivo*, o bien para reingresar a condiciones de conservación.

10.4.3. Monitoreo de la estabilidad genética

Si bien las condiciones establecidas para la conservación *in vitro* debe asegurar en lo posible la estabilidad genética del material conservado, es necesario hacer una verificación periódicamente. Para esto es posible la aplicación de diferentes técnicas como la electroforesis de isoenzimas o bien herramientas de la biología molecular (RAPDs, ISSRs, SSRs, RFLPs, DNA fingerprinting) (Landsmann & Uhrig, 1985; Harding, 1991; Angel *et al.*, 1996; Harding & Benson, 2001; Mercado, 2008).

10.4.4. Documentación y sistematización de la información

Para un adecuado manejo del material bajo condiciones *in vitro*, es fundamental contar con un sistema de registro y documentación de la información generada durante el proceso. Se debe tener especial cuidado con las fechas de cambio de estado en las diferentes etapas *in vitro*, por ejemplo, las fechas de establecimiento, de limpieza viral, de ingreso a conservación (las veces que suceda), de renovación, de pérdida del material (muerte del explante), de transplante a condiciones *in vivo*, de distribución, entre otros. El almacenamiento de la información en una base de datos y su procesamiento permitirán contar con las herramientas necesarias para la toma de decisiones correctas de manejo del germoplasma.

10.5. BANCO GENÉTICO *IN VITRO* BÁSICO

Es evidente que un sistema de conservación *in vitro* a mediano plazo puede acarrear problemas de inestabilidad genética. Asimismo, resulta aún costoso (en términos económicos y de laboreo) para mantener bancos de germoplasma que cuentan con un sinnúmero de accesiones. Por lo tanto, lo más aconsejable es contar con un pool genético que represente toda la variabilidad de la especie, constituyendo un banco genético básico. El pool genético es crioconservado sin riesgo de erosión genética, durante períodos de tiempo indefinidos, con poco o ningún mantenimiento (Panis & Lambardi, 2005).

La técnica de crioconservación consiste en llevar material biológico, desde su temperatura fisiológicamente normal, hasta temperaturas ultra bajas por inmersión de los explantes en nitrógeno líquido (-196°C) y nuevamente sometiéndolos a su temperatura normal, sin causar daño (Abdelnour, 1992). La crioconservación se constituye en un sistema ideal de almacenamiento a largo plazo, bajo condiciones de alta estabilidad genética y con un mínimo de mantenimiento, donde se puede conseguir una supresión total del crecimiento de las plantas, debido a que los procesos biológicos cesan (Doods & Roberts, 1990; Abdelnour, 1992). Otras ventajas de este método de almacenamiento, son los bajos costos de labor y mantenimiento y el reducido espacio requerido. Además se constituye en una técnica valiosa para conservar material generado en laboratorio, como embriones somáticos, callos y suspensiones celulares (Abdelnour, 1992; Panis & Lambardi, 2005).

10.5.1. Requisitos para la crioconservación

Es importante considerar el grado de organización del material a congelar. En general se considera que a mayor organización del tejido, mayor su estabilidad (p.e. meristemos, embriones cigóticos y somáticos, suspensiones

celulares y protoplastos). Los requisitos más importantes para crioconservar un tejido son: la habilidad de cultivar y multiplicar el material *in vitro*; la habilidad de los tejidos para resistir los pretratamientos y crioprotectores y la habilidad del tejido para regenerarse después del congelamiento (Abdelnour, 1992).

10.5.2. Etapas de la crioconservación

De acuerdo a Abdelnour, (1992) y Panis & Lambardi, (2005), las etapas de la crioconservación incluyen la selección y aislamiento del material, el pretratamiento y crioprotección, el congelamiento y almacenamiento, y el descongelamiento y recuperación del material.

- a) **Selección y aislamiento del material.** La primera etapa en este proceso, es la selección y aislamiento del material a utilizar. Recientes avances en la técnica de cultivo de tejidos, han incrementado enormemente la variedad de órganos y tejidos que han sido probados para el almacenamiento en nitrógeno líquido. Es posible congelar además de meristemas apicales y laterales, embriones cigóticos y somáticos, callos, suspensiones celulares y polen.
- b) **Pretratamiento y crioprotección.** La segunda etapa consiste en el pretratamiento y crioprotección, donde se induce cierto grado de deshidratación, preparando a las células y órganos a resistir a las siguientes etapas del proceso; la función principal es evitar la formación de cristales de hielo durante los procesos de congelamiento y descongelamiento; tales cristales pueden causar daños irreversibles en las células como lesiones en las paredes o rupturas de membrana. El pretratamiento consiste en la utilización de sustancias crioprotectoras tipo DMSO, PEG o glicerol. También se pueden usar sustancias como azúcares (glucosa) y aminoácidos, el tipo y concentración de estos productos deben ser ajustados para cada material vegetal y especie.

c) Congelamiento y almacenamiento. Una vez concluidas estas etapas del proceso, se procede al congelamiento y almacenamiento en nitrógeno líquido. El congelamiento puede realizarse de varias formas, puede ser rápido, congelando directamente el material en nitrógeno líquido. El congelamiento lento se logra de modo gradual, donde la disminución de la temperatura oscila entre 0,1 a 3°C/min, lo que favorece que los cristales de hielo se formen extracelularmente; generalmente el material se congela hasta -40°C en un congelador y luego se pasa al nitrógeno líquido; también se ha reportado el congelamiento escalonado y el uso de un congelador case-ro antes del almacenamiento definitivo.

d) Descongelamiento y recuperación del material. La última etapa consiste en el descongelamiento y recuperación del material, cuando éste es requerido para su utilización. El descongelamiento en la mayoría de los casos, se lleva a cabo en forma rápida utilizando un baño de agua a 40°C por 1-3 minutos, también se ha utilizado el descongelamiento a temperatura ambiente y por corrientes de aire caliente.

En todo este proceso, es importante una etapa de recuperación, donde el material es sometido a tratamientos para asegurar su crecimiento. El lavado o dilución de los crioprotectores y finalmente el cultivo en medio normal de crecimiento, para la regeneración del material, donde es importante realizar pruebas de viabilidad para evaluar el éxito del proceso.

10.6. CONCLUSIONES

En las dos últimas décadas, las tecnologías de conservación de plantas han sido desarrolladas rápidamente abriendo un abanico de posibilidades para la conservación a mediano y largo plazo de recursos genéticos valiosos de muchos cultivos y especies forestales.

Las técnicas de conservación de germoplasma basadas en el almacenamiento de ápices o meristemas, bajo condiciones que permiten sólo mínimas tasas de crecimiento, han sido ampliamente difundidas. En Bolivia, son varios laboratorios que ya aplican rutinariamente este método de conservación.

La técnica de crioconservación ha sido mencionada como la más recomendable para la conservación a largo plazo de especies vegetales de propagación vegetativa. De los primeros emprendimientos de enfriamiento lento, las investigaciones se han dirigido hacia técnicas más fáciles y más reproducibles las cuales permiten una completa vitrificación de los líquidos extra e intra celulares, a través de la inmersión directa de los explantes en nitrógeno líquido. En Bolivia se han dado los primeros pasos para ajustar esta técnica en papa (PROINPA, 2008) y en passifloras (Aguilar et al., 2007).

10.7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour A. 1992. La Crioconservación de los Recursos Fitogenéticos. Curso Latinoamericano sobre Manejo de Germoplasma *in vitro*. Cali, Colombia.
- Aguilar, N.; T. Avila y E. Gonzales. 2007. Crioconservación de tres especies de pasifloras de valles interandinos. En: V Reunión Nacional de Biotecnología. REDBIO Bolivia. La Paz, Bolivia.
- Angel, F., Barney, V.E., Tohme, J., Roca, W.M. 1996. Stability of cassava plants at the DNA level after retrieval from 10 years of *in vitro* storage. *Euphytica* 90 (3): 307-313.
- Cadima, X. y W. Rojas. 2004. Entendiendo mejor la Estrategia de Conservación de los Bancos de Tubérculos y Granos Altoandinos. In Compendio 2002-2003. Fundación para la Promoción y la Investigación de Productos Andinos (PROINPA), pp. 15 -22.
- Cadima, X.; M.L. Ugarte y J. Zeballos. 2004. Estrategia de conservación *ex situ* del banco nacional de germoplasma de tubérculos y raíces andinas. En: Congreso Internacional de Cultivos Andinos (XI, 2004, Cochabamba). [Memorias]. Fundación para la Promoción y la Investigación de Productos Andinos (PROINPA).
- Cadima X., Aguirre G., Villarroel C. 1996. Conservación *in vitro* a mediano plazo de papa (*Solanum* spp). En: IV Reunión Nacional de la Papa.

- Cadima X. 1996. Conservación *in vitro* a mediano plazo de papa y otros tubérculos andinos. Tesis de grado para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. UMSS, Cochabamba, Bolivia pp. 178.
- Coca N., Avila T. & Guzmán L. 2004. La conservación *in vitro* como una alternativa para las pasifloras andinas. En: IV Reunión Nacional de Biotecnología y I Reunión Nacional de Bioseguridad. REDBIO Bolivia. Santa Cruz, Bolivia.
- Coca, N.; T. Avila y L. Guzmán. 2007. Efecto del sorbitol y de manitol sobre los explantes de pasifloras andinas en conservación *in vitro*. En: V Reunión Nacional de Biotecnología. REDBIO Bolivia. La Paz, Bolivia.
- Dodds J. & Roberts L. 1990. Experiments in Plant Tissue Cultures: Storage of Plant Genetic Resources. 2d. Ed. Cambridge University Press, pp. 172-179.
- Engelmann F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. Euphytica, 57 (3): 227-243.
- García, W.; X. Cadima; F. Terrazas y A. Gandarillas. 2003. La Agrobiodiversidad Sostenible: Conservación *in situ* y *ex situ*. En: García, W. & X. Cadima (eds.). 2003. Manejo sostenible de la agrobiodiversidad de tubérculos andinos: síntesis de investigaciones y experiencias en Bolivia. Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). 1. Fundación para la Promoción y la Investigación de Productos Andinos (PROINPA), Alcaldía de Colomi, Centro Internacional de la Papa (CIP), Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE). Cochabamba, Bolivia, pp. 208.
- Harding, K. 1991. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. Euphytica, 55 (2): 141-146.
- Harding K., Benson E.E. 2001. The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* L. *In vitro* plantlets derived from cryopreserved germplasm. Cryo-Letters 22 (3): 199-208.
- Hor Y.L. 2001. *In Vitro* Conservation and Cryopreservation of Plant Genetic Resources. En: Mohd Said Saad and V. Ramanatha Rao, eds. 2001. Establishment and Management of Field Genebank, a Training Manual. IPGRI-APO, Serdang, pp. 128.
- Landsmann J. & Uhrig H. 1985. Somaclonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level. Theoretical and Applied Genetics, 71 (3): 500-505.
- Litz R.E., Moon P.A., Benson E.M., Stewart J. & Chávez V.M. 2004. A biotechnology strategy for medium- and long-term conservation of cycads. Botanical Review 70(1): 39-46.
- Jaramillo, S. y M. Baena. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia.
- Mercado G. 2008. Identificación de posibles variantes comacloales producto de limpieza viral y conservación *in vitro* en plantas de *Solanum* spp. y *Ullucus tuberosus* mediante dos métodos moleculares. Tesis de Grado para optar Licenciatura en Biología. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias y Tecnología. Carrera de Biología. Cochabamba, Bolivia, pp. 74.
- Panis B. & Lambardi M. The Role Of Biotechnology. Status Of Cryopreservation Technologies In Plants (Crops And Forest Trees). Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005. pp. 43-54.
- Paz I. 2004. Optimización de metodologías de conservación *in vitro* de tres especies con potencial agroindustrial: *Mentha arvensis* (Linnaeus c.), *Minthostachys andina* (Hooker et Arnott) y *Eupatorium buniifolium* (Britton). En: IV Reunión Nacional de Biotecnología y I Reunión Nacional de Bioseguridad. REDBIO Bolivia. Santa Cruz, Bolivia.
- Pierik R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Versión española de L. Ayerbe Mateo-Sagasta. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 326.
- PROINPA. 2008. Informe Anual Gestión 2007 – 2008. Fundación para la Promoción y la Investigación de Productos Andinos. Cochabamba, Bolivia.
- Ramanatha Rao, V. 2001. Principles and Concepts in Plant Genetic Resources Conservation and Use. En: Mohd Said Saad and V. Ramanatha Rao, eds. 2001. Establishment and Management of Field Genebank, a Training Manual. IPGRI-APO, Serdang, pp. 128.
- Roca W.M., Arias D.I. & Chávez R. 1991. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. En: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M. y Mroginski L.A. (eds.). Cali, Colombia, pp. 697-713.
- Rojas K. 2005. Conservación *in vitro* a mediano plazo de *Physalis peruviana*. Tesis de grado para obtener la Especialidad en Manejo y Conservación de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Aplicada. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias. Dirección de Posgrado. Cochabamba, Bolivia.
- Sarkar D. & Naik, PS. 1998. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. Euphytica 102: 275-280.
- Sarkar D., Pandey S. K., Chanemougasoundharam S. & Sud K. C. 2005. The role of calcium nutrition in potato (*Solanum tuberosum*) microplants in

- relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81 (2): 221-227.
- Ugarte C. 2004. Laboratorio de cultivo *in vitro* de especies forestales. BASFOR- ESFOR/UMSS. En: IV Reunión Nacional de Biotecnología y I. Reunión Nacional de Bioseguridad. REDBIO Bolivia. Santa Cruz, Bolivia.
- Westcott R.J. 1981a. Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. *Potato Research*, 24 (3): 331-342.
- Westcott R.J. 1981b. Tissue culture storage of potato germplasm. 2. Use of growth retardants. *Potato Research*, 24 (3): 343-352.



Figura 1 y 2. Germoplasma de papa en conservación *in vitro* a mediano plazo, PROINPA 2008.

Capítulo 11

La Diversidad Microbiana y los Servicios Ambientales de las Micorrizas a la Agricultura

Noel Ortuño, Fátima Rojas, Deyby Felipez

11.1. DIVERSIDAD MICROBIANA DEL SUELO

En los suelos agrícolas donde existen plantas, también se forman comunidades microbianas, que abarcan una gran variedad de géneros y especies. Esta biota simbiote obligada o facultativa, está asociada al reciclaje de nutrientes, a la generación de fitohormonas, al aumento y/o aceleración del desarrollo; al mejoramiento de la resistencia, al estrés ambiental y a la supresión de patógenos de suelo o entomopatógenos (Sturz *et al.* 2000).

Eso demuestra la necesidad de estudiar y conocer las asociaciones de microorganismos-plantas, para comprender los beneficios que suministran los microorganismos al crecimiento de la planta y a la producción de alimentos.

Las ventajas naturales de simbiosis deben explorarse en las plantas cultivadas en su hábitat natural para detectar oportunidades de mejora en la productividad del cultivo a partir de la funcionalidad de los microorganismos. Este tipo de estudio permitiría desarrollar líneas de producción biotecnológicas contribuyendo a una agricultura saludable. En general, estos actúan como

promotores de crecimiento (reciclado de nutrientes y produciendo reguladores de crecimiento vegetal) o como agentes de control de enfermedades o ambos, por tanto, la producción agrícola puede ser mejorada incorporando estos microorganismos al suelo.

11.2. LA DIVERSIDAD MICORRIZICA

Se han descrito alrededor de 200 especies, clasificados en cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaeosporales; 11 familias y 17 géneros (Schübler y Walker, 2010; NCBI, 2010). Históricamente muchas especies de este phylum se han descrito y nombrado con base en la morfología de sus esporas, pero se ha visto que no es suficiente para conocer su verdadera filogenia, recientemente se está recurriendo al análisis de los genes para circunscribir los taxa (Schübler y Walker, 2010).

Con base en registros fósiles se calcula que el origen de los microscópicos hongos Glomeromycota, ocurrió o hace aproximadamente 600 millones de años, por otra parte esporas e hifas de hongos Glomerales fueron descubiertas en rocas que datan de hace 460 millones de años en el período Ordovícico

(Redecker *et al.*, 2000), se maneja la hipótesis de que fueron un valioso instrumento de las plantas al inicio de la colonización del ambiente terrestre.

Los hongos, micorrizas arbusculares (MA) pertenecen al phylum Glomeromycota (Shübler *et al.*, 2001) son poco conocidos por la mayoría de las personas, pero de gran importancia para los ecosistemas terrestres. El término micorriza hace referencia a la asociación simbiótica entre raíces de plantas y hongos, es llamada mutualista porque tanto los hongos como la planta hospedera se benefician. El hongo simbionte recibe carbohidratos de la planta ya que el es incapaz de realizar fotosíntesis y, a cambio, brinda a la planta varios beneficios reflejados en su crecimiento como se describe posteriormente.

El nombre micorriza proviene del término griego “mykos” = hongo y del vocablo latino “rhiza” = raíz. Esta asociación es benéfica, tanto para el hongo, como para la planta. El hongo coloniza el interior de la raíz y, por medio de la red externa de hifas, sirve de puente para obtener nutrientes minerales y agua que no están al alcance del sistema radicular de la planta. Por otro lado, la planta, a través de la fotosíntesis, proporciona alimento al hongo (Crovetto, 1992). Esta simbiosis se establece de forma natural con la mayoría de las plantas terrestres y algunas de las especies, principalmente árboles, dependen totalmente de esta simbiosis (Marchio, 1947). Estas asociaciones o simbiosis fueron descritas por el patólogo forestal alemán A. B. Frank, utilizando el término micorriza en 1885 (Benzing, 2001). Sin embargo, la existencia de las micorrizas data de hace al menos 370 millones de años (Coyne, 2000).

Los primeros estudios realizados en América Latina para entender mejor la simbiosis raíz – hongo se desarrollaron en Colombia y Cuba en la década de los años 80. Para Rivera *et al.* (2003), el estudio llevado a cabo en Colombia por Sieverding en 1990, es uno de los más completos y de mayor aporte para

comprender mejor las asociaciones micorrizas. Sieverding (1990), estudió el manejo de las especies nativas, encontrando que las especies de MA son específicas de un sitio y poseen comportamientos diferentes frente a distintas prácticas agronómicas utilizadas (Rivera *et al.*, 2003). A partir de diversos análisis concluyó que la utilización de micorrizas en la agricultura para fines productivos sería menos complicado mediante la inoculación de cepas eficientes y no siempre con cepas nativas (Rivera *et al.*, 2003).

11.2.1. Plantas simbiotes

En cuanto a plantas simbiotes, alrededor del 80% de las plantas que presentan la simbiosis en cuestión, forman el tipo de asociación endomicorrízica conocida como micorriza arbuscular (MA) reportándose en más de 200 familias y más de mil géneros de plantas, distribuidas en el grupo de las Briofitas, Pteridofitas, Angiospermas y Gimnospermas (Malloch *et al.*, 1980; Azcon *et al.*, 1980) y las familias de cultivos principales, Leguminosae y Gramineae (Sainz *et al.*, 1984). También el hospedante influye sobre la colonización micorrízica y producción de esporas, siendo generalmente las plantas con elevadas demanda de fósforo como las leguminosas, o con pobre sistema radicular (cebolla, papa), las que responden mejor a la micorrización, de tal manera que las plantas con pocos o cortos pelos radicales dependerán más de la formación de micorrizas que las dotadas de pelos bien desarrollados (Azcón, 1980).

Se menciona también que las gramíneas son menos micorrizadas que las leguminosas, debido a que poseen un sistema radical mejor desarrollado, que les permite obtener más fácilmente los nutrientes del suelo y hacerlas menos dependientes de las micorrizas (Sainz, 1984). Como señala Ribeiro (2005) las gramíneas forrajeras presentan menor respuesta a las MA respecto a las leguminosas

y, entre éstas, también se observan diferencias.

En un estudio realizado por Giovannetti *et al.*, (1988), al inocular con *Glomus monosporum* las plantas de trébol, vid, cebolla y pasto heno, que se caracterizan por la diversidad en la morfología y la extensión linear de sus sistemas radiculares encontraron a los 4 meses de la inoculación, la mayor respuesta en la colonización y producción de esporas en plantas de vid y trébol, y la más baja en pasto de heno. Esto prueba la correlación inversa entre la colonización de MA y plantas que poseen escasos o cortos pelos radicales, que es la cuarta característica de las plantas simbiotes más sobresalientes en este trabajo.

Sin embargo, cuando plantas de trébol fueron inoculadas con los hongos *Gigaspora gigantea* y *Glomus mosseae* en invernadero, por un período de 10 semanas, no se presentó la infección con ninguno de los dos simbiotes, en cambio *Gigaspora Gigantea* y *Glomus fasciculatum* mostraron una infección moderada en plantas de maíz, al igual que *Glomus calospora* en sorgo (Grada, 1979).

Los reportes anteriores ponen de manifiesto que el comportamiento del desarrollo de la infección y la producción de esporas es influenciado por la especie de planta hospedante y la especie de hongo micorrízico y no necesariamente las plantas con escasos pelos radiculares, son las que tienen una mayor respuesta a los endófitos MA.

Los resultados obtenidos luego de inocular plantas de maíz, pasto bahía, sorgo y soya con *Glomus claroideum*, *Glomus etunicatum*, *Glomus mosseae* y *Gigaspora margarita*, confirman lo antes mencionado, ya que la soya, que se caracteriza por la presencia de pocos pelos absorbentes, no fue apta para obtener una adecuada esporulación para cualquiera de las especies de hongos MA. En cambio, el maíz después de 12 semanas de la inoculación, presentó la mejor respuesta a la

producción de esporas, siendo superado a las 14 semanas por el pasto bahía, el cual mostró incrementos de 100-5 19% en las dos últimas semanas de incubación (Guzmán, 1991). También la cebolla se reporta como hospedante altamente susceptible a la micorrización y productor de esporas, obteniendo resultados satisfactorios con *Glomus macrocarpus var. geosporus*, *Glomus fasciculatus*, *Gigaspora margarita* y *Gigaspora gigantea* (Gonzales, 1983).

La edad de la planta también es un factor importante en el desarrollo de MA, como muestra un estudio hecho por Guzmán (1991), con tres especies: frijol, grama y sorgo, muestra que a la cuarta semana después de la siembra la colonización fue igual para los 3 hospedantes, en la sexta el sorgo fue superado por la grama y el frijol, mostrando este último su máximo valor (61.60%); en la octava semana, la colonización decreció para el frijol, y la grama registró su valor más alto (9.1.73%), lo mismo que el sorgo (6 1.68%), sin embargo no existió diferencia del frijol con el sorgo, pero, sí con la grama; a la décima semana el frijol mostró los valores más bajos fue ampliamente superado por el sorgo y la grama.

11.3. TIPOS DE MICORRIZAS

Las micorrizas (MA) son capaces de crecer dentro de las raíces sin causar síntomas de una enfermedad, el hongo coloniza las raíces con sus hifas, formando arbusculos con los cuales mantiene un intercambio bioquímico con la planta. Esta simbiosis altamente especializada anteriormente se le llamó "micorriza vesículo arbuscular" porque algunos hongos de los glomeromycoticos forman estructuras de almacenamiento dentro de las células corticales llamadas vesículas.

En 1969 se definió tres tipos de micorrizas basándose en la interrelación espacial de las hifas filamentosas del hongo y las células de

las raíces de la planta: ectomicorrizas, endomicorrizas y ectendomicorrizas. Esta clasificación se mantiene vigente en la actualidad.

Las ectomicorrizas (Figura 1) se limitan casi por completo a especies arbóreas de hoja perenne, donde la simbiosis se establece generalmente de forma natural. Son visibles a

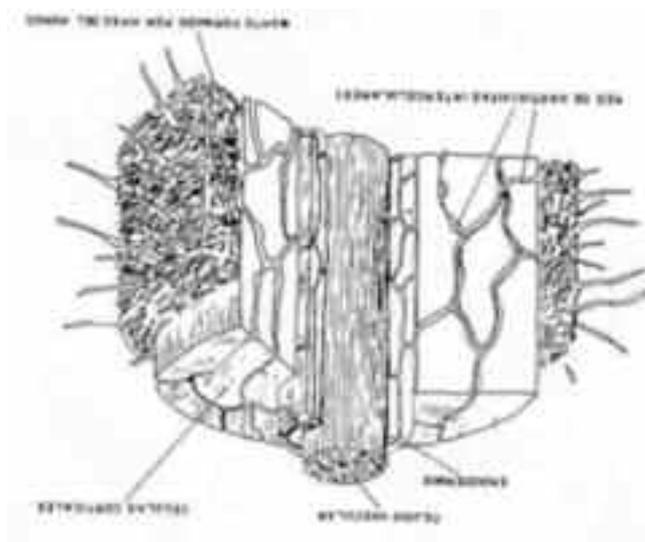


Figura 1. Ecto micorrizas simbiotes con las plantas perennes.

simple vista ya que las hifas se aglomeran alrededor de la raíz formando un manto fúngico que provoca modificaciones morfológicas en la raíz (Rivera *et al.*, 2003). A partir de esta estructura, las hifas se introducen entre las células de la corteza sin penetrarlas formando la llamada red de Hartig que es su característica más importante. De esta manera crecen en los espacios intercelulares sin llegar a penetrar al interior de la célula (Coyne, 2000).

Las ectendomicorrizas son muy limitadas. Presentan características tanto de las ectomicorrizas como de las endomicorrizas.

Las endomicorrizas, por otro lado, son las más importantes y las de mayor difusión. Se encuentran en la mayoría de los cultivos agrícolas y hortícolas (Coyne, 2000). Las endomicorrizas, llamadas también micorrizas

arbusculares son simbiontes obligados, ya que no pueden ser cultivadas en ausencia de la planta huésped (Xoconostle y Medrano, 2002). No son visibles a simple vista, para poder visualizarlas es necesario hacerlo mediante un microscopio óptico donde se puede observar las diferentes estructuras del hongo colonizando la raíz (Figura, 2).

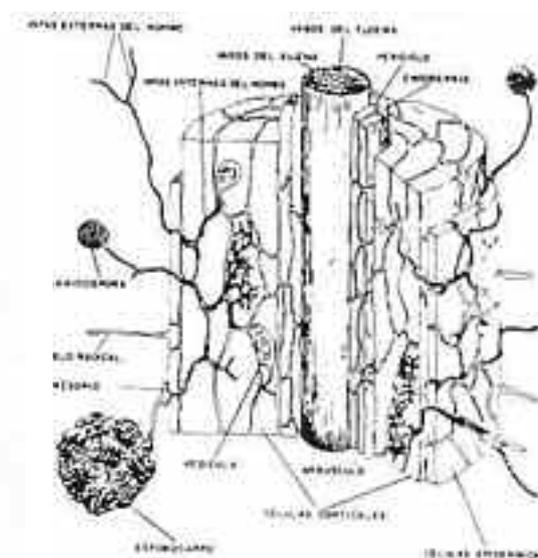


Figura 2. Endomicorrizas simbiotes de plantas anuales.

Los hongos micorrícicos (MA) que forman este tipo de micorrizas son Zygomycetos y Ficomicetos del orden Glomales. Los géneros son Paraglomus, Archaeospora, Glomus, Sclerocystis, Acaulospora, Entrophospora, Scutellospora y Gigaspora (Benzing, 2001).

La formación de MVA se inicia a partir de una espora germinada, hifas o una raíz colonizada presente en el suelo que infecta a las zonas pilíferas de la raíz. De esta manera, bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura, se inicia la colonización sin la formación del manto fúngico (Pritchell, 1990). Una vez que el hongo ingresa en las células epidérmicas de la raíz se forma una hifa especializada llamada apresorio que le sirve de sostén en la fase primaria de penetración de la raíz. La hifa de penetración avanza longitudinalmente a través de los

espacios intercelulares o ingresa directamente al interior de la célula donde finalmente se forman los arbuscúlos y vesículas en algunos casos (Rivera et al., 2003). En la Figura 3 se puede observar las diferentes fases del proceso de formación de la simbiosis.

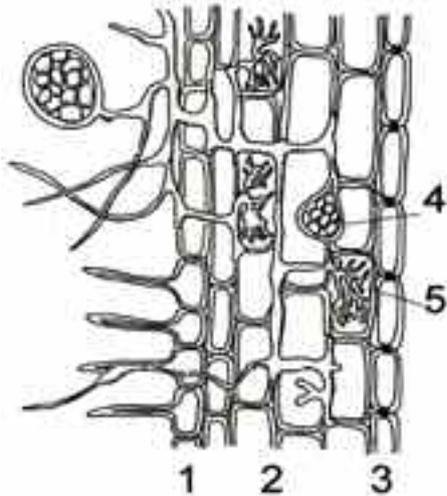


Figura 3. Endomicorrizas vesículo arbusculares
 1. Rizodermis (epidermis), 2. Córtex,
 3. Endodermis, 4. Vesícula, 5. Arbuscúlo.

El nombre de MVA se debe precisamente a la formación de las vesículas y arbuscúlos. Las vesículas son las hifas que penetran en las paredes de las células epidérmicas de la raíz y crecen en el interior de las células corticales, son órganos de almacenamiento, se encuentran llenos de lípidos, importantes para la alimentación del hongo. Los arbuscúlos no penetran en el interior de la membrana celular; en este órgano se realiza el intercambio de nutrientes captados por las hifas (Crovetto, 1992).

11.4. SINERGISMO CON OTROS MICROORGANISMOS

Las endomicorrizas no son tan específicas, pero es obvio pensar que la incidencia de estos microorganismos no es la misma para todas las especies. Se ha determinado que el comportamiento de las (MA) es modulado por diversos factores ambientales, que pueden

ajustar su comportamiento. Existe evidencia de que estas asociaciones presentan “especificidad ecológica” lo cual consiste en la posibilidad de encontrar en un inóculo mixto o bajo condiciones nativas un tipo particular de MA que colonice preferentemente a un hospedante (Mc Gonigle y Fitter, 1990).

Esta preferencia se debe principalmente a las condiciones del suelo que puede existir donde está anclada la planta principalmente en relación con otros microorganismos (Rabatin y Stinner, 1989) en su versión sobre la interacción de micorrizas arbusculares con micro invertebrados del suelo (ej. Lombrices, nematodos) concluyen que tienen un efecto neto positivo en las poblaciones de MA y contribuyen a su distribución espacial. Por otro lado Garbaye (1994), menciona que existen efectos estimulatorios de los procesos de germinación de las esporas y crecimiento de MA con bacterias endófitas de los géneros *Pseudomonas*, *Corynebacterium* y *Streptomyces*.

También existe evidencia de bacterias promotoras del crecimiento como *Pseudomonas putida* (cepa F-44) actúan sinérgicamente con algunas especies de hongos MA; el efecto es mayor si son inoculados simultáneamente a la siembra, el hongo es favorecido en una mayor producción de esporas, aspecto que podría considerarse en la producción de inóculo de MA (Sieverding, 1991). También se han observado interacciones positivas con asociaciones de bacterias solubilizadoras de P tal como lo reporta Young (1990).

Existe una relación positiva con rizobacterias estimuladoras del crecimiento vegetal en la colonización rizosférica, en el presente caso *Azospirillum brasilense* + *Glomus clarum* fueron más efectivas cuando están juntas, que individualmente, también se encontró que la micorrizica se incrementó con la presencia de *Azotobacter* sp. Por otra parte se demostró que la inoculación de *Pseudomonas fluorescens* en tomate, estimula la

colonización micorrizica en la raíz e incrementa la producción del cultivo (Terry, 2006).

11.5. IMPORTANCIA EN LA NUTRICIÓN VEGETAL

El uso de MA en la agricultura se ha extendido gracias a los múltiples beneficios que le proporcionan al cultivo.

Las micorrizas son microorganismos que mejoran la nutrición de planta. Al aumentar la superficie de absorción de nutrientes, aumenta la capacidad de las raíces para obtener nutrientes, especialmente Fósforo, pero también Potasio, Nitrógeno, Calcio, Magnesio, Zinc, Cobre, Boro y Molibdeno (Rivera *et al.*, 2003). Mejoran así aspectos morfológicos y de crecimiento: mayor altura, mayor número de frutos por planta, mayor diámetro de tallo, mayor área foliar, etc. De esta manera, aseguran cosechas con altos rendimientos.

La inoculación con micorrizas comerciales en cultivos de importancia económica se ha extendido en la actualidad en América Latina. Países como Cuba, Chile, México, Colombia, Ecuador han realizado numerosos estudios con el objetivo de observar el efecto benéfico de estos microorganismos en los cultivos. Particularmente se ha trabajado con hortalizas como tomate, cebolla, ajo, papa; cereales: maíz, trigo, soya, arroz y algunos frutales.

En nuestro país, a partir de 1997 en el departamento de Santa Cruz se empieza a introducir estos microorganismos a sistemas agrícolas de altos insumos con grandes áreas de producción como: soya, trigo, maíz, obteniendo cosechas con rendimientos superiores al testigo no inoculado. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Resultados de la inoculación de micorrizas (*G. fasciculatum*) en diferentes cultivos. Santa Cruz-Bolivia

| Cultivo | Área | HMA | Testigo | Incremento |
|---------|--------|----------------|---------|------------|
| | --ha-- | ----t ha-1---- | | ---%--- |
| Maíz | 150 | 2,92 | 2,16 | 35,1 |
| Maíz | 150 | 3,12 | 2,51 | 24,3 |
| Trigo | 50 | 3,19 | 2,75 | 16,0 |
| Trigo | 50 | 3,12 | 1,82 | 71,4 |
| Soya | 150 | 2,73 | 1,94 | 40,7 |
| Soya | 150 | 2,20 | 1,78 | 23,5 |
| Soya | 750 | 2,93 | 2,32 | 26,3 |

Fuente: Rivas y Ortuño, 2008.

11.6. BENEFICIOS PARA LA AGRICULTURA

Las micorrizas arbusculares (MA) son otros bioinsumos utilizados para combatir patógenos del suelo. Las micorrizas son hongos del suelo que pueden llegar a establecer asociaciones mutualísticas, tales como la simbiosis, con las raíces de las plantas. Las raíces micorrizadas alcanzan mayor superficie de exploración, aumentando así la absorción de agua y de nutrientes de la planta. Otra de las funciones que cumplen estos hongos benéficos es la protección de las raíces contra el ataque de patógenos del suelo, creando una barrera mecánica a través del manto de hifas que forman y generando competencia por nutrientes y espacio (Aguilar, 1990).

11.6.1. Beneficios de las micorrizas en el crecimiento de las plantas

La importancia de esta simbiosis en el desarrollo de las plantas se entiende al tener en cuenta que la raíz es el puente entre la planta y el suelo y que, a su vez, el micelio del hongo micorrizógeno es el puente entre la raíz

y el suelo. En consecuencia, la micorriza, como órgano de absorción y translocación de agua y nutrientes, es una de las más sobresalientes adaptaciones de la raíz para desenvolverse adecuadamente en el ambiente edáfico (Guerrero, 1996).

Durante la simbiosis, las plantas hospedantes reciben nutrientes minerales del suelo tomados por el hongo (principalmente fósforo), mientras que éste obtiene compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis (Brundrett *et al.*, 1996).

Esta mejor condición nutricional conlleva un significativo aumento en el crecimiento de las plantas que poseen esta asociación (plantas micótrofas), especialmente en aquellos suelos donde estos nutrientes son escasos. Otros beneficios de la asociación micorrízica son la protección contra patógenos radicales (Newsham *et al.*, 1995) y la mayor tolerancia al déficit hídrico (Ruíz *et al.*, 1995).

Según Coyne (2000), existen datos que demuestran que dos especies *Glomus* tienen un contenido de nutrientes considerablemente más elevado en la planta que el desprovisto de micorriza. Con excepción del Fe, *Glomus fasciculatum* presenta un nivel de adquisición de nutrientes superior al que *Glomus monosporus*, lo que demuestra que distintas simbiosis entre planta y micorriza presentan distintas capacidades de adquisición de nutrientes.

El papel de las micorrizas en la absorción de fósforo del suelo puede resumirse de la siguiente manera: las plantas con micorrizas absorben y acumulan más fósforo que las plantas sin micorrizas. Existe una mejor explotación de fósforo del suelo, puesto que el área y el volumen de las raíces aumenta, en primer lugar, porque las raíces son más sanas (mejor alimentadas) y, en segundo lugar, porque las hifas de los hongos actúan como una extensión de la raíz. Las micorrizas aumentan la disponibilidad del fósforo mediante una serie de mecanismos como la

excreción de fosfatasas, ácido carbónico y ácido orgánico, así como mediante la extensión de la superficie de las raíces expuestas al fósforo (Coyne, 2000).

Entre los beneficios observados de las micorrizas en las plantas se tienen (Benzing, 2001):

- 1) Mejoran el crecimiento de la planta al aumentar la superficie de absorción de agua y nutrientes (principalmente P, aunque también Ca, K, Zn, Cu).
- 2) Mineralización y solubilización de nutrientes por la producción de ácidos y enzimas.
- 3) Facilitan un mejor aprovechamiento del Fósforo y del Zinc de los fertilizantes.
- 4) Tolerancia a condiciones de estrés como baja humedad, las plantas micorrizadas se recuperan más rápido del marchitamiento y hacen un uso eficiente del agua absorbida.
- 5) Estimulan la fijación del nitrógeno en las plantas noduladas, aumentando el flujo de fósforo a través de sus raíces.
- 6) Menor susceptibilidad al ataque de patógenos mejorando su nutrición y compitiendo con microorganismos patógenos por el espacio en las raíces de las plantas.
- 7) Inmovilizan algunos metales pesados como el Zinc, Cadmio y Manganeso.
- 8) Mejoran la estructura del suelo ayudando a la formación de agregados.

La correlación entre el uso del agua la eficiencia y la tolerancia a la sequía mostró que AM hongos inoculación proporciona 30% más de agua de plátano después de 40 días de estrés y AM hongos inoculados micropropaga plátano proporcionado montón más grande que hizo las no inoculadas en condiciones de granja en un Oxisol. Estos resultados indican que la inoculación con Hongos MA podría ser un enfoque útil y

práctico hacia un sistema de producción sostenible del banano.

11.7. FACTORES DEL SUELO QUE AFECTAN EL DESARROLLO DE LAS MICORRIZAS

Para introducir MVA en la agricultura es importante conocer en que condiciones ambientales se lleva a cabo una efectiva micorrización.

La temperatura tiene un papel importante en el desarrollo de las micorrizas. La temperatura óptima para el crecimiento de los micelios oscila entre los 18°C y los 27°C para la mayoría de las especies, aunque en algunos casos la simbiosis se llevó a cabo a temperaturas mayores 33-34°C (Pritchell, 1990).

El pH óptimo para el desarrollo de micorrizas oscila entre 5,8 y 7,5, pero puede variar de acuerdo al tipo de suelo, planta y el tipo de hongo. Respecto a la humedad del suelo, ésta debe ser mediana, ya que en suelos muy húmedos o inundados el crecimiento de esporas disminuye considerablemente (Benzing, 2001).

Cuando hay poca agua disponible para el crecimiento de las plantas, sus raíces forman alianzas con los microorganismos del suelo que la ayudan a promover su crecimiento (Marasco *et al.*, 2012).

Es conocido que las relaciones simbióticas entre las plantas y comunidades microbianas del suelo son críticas para la salud de las plantas. Aunque los efectos de la sequía en las plantas son bien conocidos, se sabe poco acerca de cómo la falta de agua afecta a las bacterias alrededor de las raíces.

En este estudio, los investigadores cultivaron plantas de pimienta en condiciones de agua limitada y se analizaron las especies de bacterias alrededor de las raíces de las

plantas. Ellos encontraron que el estrés por sequía enriqueció las comunidades microbianas con bacterias capaces de aumentar la fotosíntesis de las plantas y la producción de biomasa de hasta un 40% en condiciones limitadas de agua.

Según los autores los resultados destacan que las plantas completamente funcionales no pueden ser considerados organismos individuales más, sino más bien un metaorganismo que incluye a la planta y su microbioma. Esto promueve las funciones esenciales como la resistencia al estrés hídrico. La promoción de la resistencia a la sequía por bacterias puede tener importantes aplicaciones, por ejemplo, en la retención de los altos rendimientos de las plantas, incluso en presencia de una menor irrigación.

Las plantas de cultivo sufren menos de los patógenos específicos transmitidos por el suelo, debido a las actividades de distintos microorganismos del suelo. Sin embargo, para la mayoría de las relaciones entre los microbios del suelo y las plantas, los mecanismos implicados en el control de los patógenos son desconocidos.

Un análisis genómico funcional de los suelos (metagenómica) mediante un PhyloChip que analizó el microbioma de la rizósfera de diferentes que permitieron identificar los grupos clave de bacterias y los genes implicados en la supresión de un hongo que ataca la raíz de las plantas.

El análisis identificó más de 33.000 especies de bacterias y archaeas, y particularmente las Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria consistentemente asociadas con la supresión de la enfermedad de hongo. También los miembros de las Proteobacteria demostraron tener actividad antimicrobiana mediante la síntesis de péptidos no ribosomales.

En otras palabras, las plantas aprovechan del manojo de bacterias que poseen en sus raíces para enfrentar las enfermedades.

11.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, V.F. 1990. *Mezclas y desinfección de suelo y formas de siembra en semilleros de cebolla (Allium cepa L.)*. Tesis de grado para obtener el título de ingeniero agrónomo, Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinaria, Cochabamba-Bolivia.
- Benzing, A. 2001. *Agricultura orgánica: fundamentos para la región andina*. Editorial Neckar- Verlag, Alemania. 628 pp.
- Bolletta, A.; Venanzi, S.; Krüger, H. 2005. *Respuestas de un cultivo de avena en siembra directa a la fertilización química y biológica en un ambiente marginal*. En <http://www.inta.gov.ar> (18/03/2005).
- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove y N. Malajczuk 1996. Working with mycorrhiza in forestry and agriculture, first edition, Aciar Monograph publisher, Australia, 185 p.
- Coyne, M. 2000. *Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio*. Editorial Paraninfo, España. 1ra Edición. 416 pp.
- Franco, J; N. Ortuño y J. Herbas. 2004. *Potencial de rehabilitación de tierras degradadas por el desarrollo y uso de un biofertilizante en beneficio de los agricultores pobres de Bolivia*. Revista de Agroecología LEISA. Volumen 19. Perú.
- Guerrero, E. 1996. "Micorrizas Recurso Biológico del Suelo" Fondo Fen. Bogotá, Colombia.
- Newsham, K. K. A. H. Fitter y A. R. Watkinson 1995. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *Journal of Ecology* 83: 991-1000
- Nwaga, D.; A. Tenkouano, K. Tomekpe, R. Fogain, D.M. Kinack, G. Tsané, and O. Yombo. 2011. Multi-functional Properties of Mycorrhizal Fungi for Crop Production: The Case Study of Banana Development and Drought Tolerance. P. 523-531.
- Pritchell, W. 1990. Suelos Forestales. Limusa, México. Pp 233-251.
- Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, van der Voort M, Schneider JH, PicenoYM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PA, Raaijmakers JM. **Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria**. *Science*. 2011, 332(6033):1097-100.
- Marasco R., E. Rolli, B. Ettoumi, G. Vigani, F. Mapelli, S. Borin, A. F. Abou-Hadid, U. A. El-Behairy, C. Sorlini, A. Cherif, G. Zocchi, D. Daffonchio. 2012. Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *PLoS ONE*, 2012; 7 (10): e48479 DOI: 10.1371/journal.pone.0048479
- Redecker, D., Kodner, R. And Graham, L. E. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289(5486): 1920-1921
- Rivera, R; Fernández, F; Hernández, A. y Martin, J. R. 2003. *El manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible Estudio de caso: El Caribe*. Ediciones INCA, Cuba. 189 pp.
- Rivas K. y N. Ortuño. 2007. Introducción y evaluación de micorrizas arbusculares como biofertilizante en la producción hortícola del Valle Alto de Cochabamba-Bolivia. *Revista ACTA NOVA*. 4(12):31-37.
- Ruíz, L. J. M., R. Azcon, y M. Gomez, 1995. Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2): 456-460.
- Shüßler, A., Schwarzott, D. and Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- Shüßler, A. and Walker, Ch. 2010. The Glomeromycota: species list with new families and new genera.
- Xoconostle, B. y R. Medrano. 2002. Impacto de la biotecnología agrícola en cultivos: el caso de las micorrizas. En <http://www.cinvestav.mx/publicaciones/avayper/sep>

II PARTE



APLICACIONES PRÁCTICAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO*

Capítulo 12

La aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los Recursos Fitogenéticos

Jean Pierre Baudoin

12.1. INTRODUCCIÓN

La región andina se caracteriza por su elevada diversidad biológica que contribuye a la seguridad alimentaria, por la presencia de muchos centros de origen y domesticación ricos en endemismos y propicios para el desarrollo de una amplia variabilidad genética en poblaciones autóctonas de especies vegetales. La región andina también se caracteriza por la gran diversidad de condiciones ecológicas en espacios muy reducidos, así como por las condiciones sumamente limitantes. El poblador andino logró manejar esta diversidad ecológica, así como sus posibilidades, habiendo domesticado más de 40 especies alimentarias, muchas de las cuales están adaptadas a las condiciones extremas de sequía, frío y humedad de ciertas zonas.

En la región altiplánica, *Solanum tuberosum*, *Ullucus tuberosus*, *Oxalis tuberosa*, *Tropaeolum tuberosum*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium pallidicaule*, *Lupinus mutabilis* son los ejemplos de especies domesticadas más representativas de la diversidad de especies domesticadas. En los valles se domesticaron *Zea mays*, *Capsicum* spp., *Ipomoea batatas*, *Amaranthus caudatus* y diversas frutas. Las tierras bajas también fueron centros de domesticación de numerosas especies vegetales, como *Arachis hypogaea*, *Manihot* spp., *Zea mays*,

Capsicum, *Gossypium*, *Nicotiana tabaccum*, *Bixa orellana* y varios tipos de calabazas y frutas. Estas son sólo algunas de las especies domesticadas en estas zonas. Un gran número de especies alimentarias autóctonas hacen parte de la dieta de poblaciones locales de la región andina.

Aunque parte del germoplasma de estos cultivos ha sido recolectado y conservado en bancos de germoplasma (semillas y colecciones de campo), aún falta completar y manejar colecciones para muchas especies. Además, los cultivos andinos poseen un inmenso potencial para el mejoramiento y promoción de nuevas especies a través de la ampliación de la base genética de las colecciones, la introgresión genética a partir de acervos foráneos y el desarrollo y producción de nuevos materiales a partir de estas especies poco difundidas y potencialmente promisorias.

El manejo de recursos fitogenéticos incluye varias actividades como la prospección, la colecta, la caracterización, la evaluación, la conservación y el intercambio de germoplasma a nivel nacional e internacional. El seguimiento científico de todos estos componentes garantiza una valoración promisoriosa de los recursos genéticos y su utilización en programas de mejoramiento varietal. Mediante técnicas biotecnológicas es posible lograr un desarrollo más eficiente de las

actividades mencionadas, proporcionando así nuevas alternativas para utilizar los recursos genéticos. La biotecnología, por medio de la genética molecular y el cultivo de tejidos o de células *in vitro* ofrece nuevas herramientas para alcanzar esas metas y racionalizar los usos de los recursos fitogenéticos. En particular, el cultivo *in vitro* contribuye de diferentes maneras al uso sostenible de los recursos genéticos.

En la actualidad se utilizan abundantemente las técnicas de cultivo de tejidos para la micropropagación de clones selectos y para conseguir material de plantación libre de patógenos; se utiliza cultivo de anteras y de microsporas para la obtención de haploides y a fin de facilitar y acelerar el mejoramiento genético. Una porción grande de la variabilidad genética para caracteres económicamente importantes, ocurre en el germoplasma silvestre o en especies relacionadas. Tradicionalmente, la identificación de genes que controlan esos caracteres en el germoplasma silvestre, y su utilización en el pre-mejoramiento ha encontrado dificultades. La hibridación interespecífica ayudada por el cultivo *in vitro* de embriones se está convirtiendo en una alternativa para la transferencia de caracteres útiles entre especies relacionadas, pero sexualmente incompatibles, o que presentan absorción temprana de embriones. Sin embargo, el objetivo del presente capítulo es destacar el papel del cultivo *in vitro* en la preservación y el manejo de los recursos filogenéticos.

12.2. CONTRIBUCIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO* EN LA CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS

Las estrategias de conservación de germoplasma dependen principalmente de las características biológicas de éstos, de los recursos humanos e infraestructura disponibles y del número de accesiones. Existen dos estrategias generales de conservación de ger-

masma: *in situ* (ecosistemas y hábitats naturales) y *ex situ* (bancos de germoplasma de semilla, colecciones de campo, jardines botánicos y colecciones *in vitro*), estos métodos no son mutuamente excluyentes sino más bien complementarios.

Si las semillas ortodoxas pueden ser conservadas sin mayores dificultades con baja temperatura y baja humedad relativa en bancos de germoplasma, existen sin embargo otras especies denominadas recalcitrantes cuyas semillas pierden su viabilidad en un corto período de tiempo al ser conservadas por métodos convencionales debido a sus elevados contenidos de humedad. En paralelo, existen especies que producen semillas después de un largo tiempo (plantas perennes) o producen semillas de alto grado de heterocigosidad debido a su naturaleza alógama o no producen semilla botánica verdadera, teniendo como alternativa de reproducción órganos vegetativos (tubérculos, rizomas, bulbos o semillas agamicas). Los recursos genéticos de estas especies son generalmente conservados como colecciones de campo o a través de medios más sofisticados como la conservación *in vitro*.

Precisamente, las dificultades derivadas de las colecciones de campo (elevados requerimientos de espacio y mano de obra, riesgo de infestación con plagas y enfermedades, daño provocado por catástrofes naturales y pérdida de la integridad genética de las accesiones) y la preservación de especies recalcitrantes han permitido desarrollar metodologías como la conservación *in vitro* de germoplasma, entendiéndose por cultivo *in vitro* al conjunto de técnicas mediante las cuales un explante, es decir, una parte de la planta (órgano, tejido, célula o protoplasto) se cultiva asépticamente en un medio nutritivo bajo condiciones de luz y temperatura controlada.

El cultivo *in vitro* de especies vegetales nace con los estudios pioneros de Haberlandt al principio del siglo XX. El cultivo de los diferentes órganos de las plantas se ha ido desarrollando a fin de lograr tres fines: la micropro-

pagación vegetativa, la conservación de germoplasma y generar una herramienta para recortar los diferentes pasos de un programa de mejoramiento genético, ya sea por medio de la regeneración de nuevas plantas o de estructuras indiferenciadas (masas celulares o callos).

En el caso de la conservación de germoplasma, las principales finalidades del cultivo *in vitro* son la preservación de la integridad genética de cada entrada de la colección (se evita la segregación de las semillas sexuales) y el mantenimiento altamente seguro de los recursos al quedar eliminados los riesgos de pérdidas por causa del medio ambiente; como es una técnica axénica, no hay detrimentos o daños por plagas o enfermedades y no existe peligro de infecciones por patógenos ni plagas. Sin embargo, como siempre, existe la probabilidad de contaminación debido a hongos o bacterias ambientales, necesitando de un monitoreo específico del material en conservación a fin de mantener bajo cierto nivel de control los explantes.

En el manejo de los recursos fitogenéticos, la utilización del cultivo *in vitro* empieza directamente a partir de la recolección del germoplasma en el terreno para reducir las dificultades prácticas de colectas de germoplasma, especialmente en especies cuyo traslado hacia los bancos de germoplasma causa deterioros por daño mecánico y/o ataques de plagas y enfermedades. Lo anterior, esencialmente consiste en esterilizar explantes del material colectado para posteriormente depositarlos en medios de cultivo estériles a través de un procedimiento simple que sólo requiere equipo rudimentario. La técnica ha sido utilizada exitosamente en algodón (*Gossypium spp.*), cacao (*Thebroma cacao*), vides (*Vitis spp.*) y algunas forrajeras. El traslado de material *in vitro* desde el sitio de colecta es especialmente conveniente para especies alógamas, especies con semillas de reducido poder germinativo, especies con semillas recalcitrantes y aquellas de reproducción vegetativa.

Pero es principalmente para la conservación de los materiales colectados que las técnicas del cultivo *in vitro* han sido objeto de esfuerzos de investigación. Las técnicas de conservación por cultivo *in vitro* se empezaron a aplicar en los años 80 y actualmente se utilizan de forma sistemática en la conservación e intercambio de germoplasma de varias especies como raíces y tubérculos, árboles frutales y otras.

Entre las ventajas que presenta la manutención *in vitro* de germoplasma destacan: conservación de un gran número de plantas en espacios pequeños; mayor control sobre el estado fitosanitario de las plantas; reducción en los tiempos de multiplicación; facilidad de intercambio de material genético debido a su sanidad e incremento de la tasa de multiplicación de germoplasma valioso.

12.3. CONSERVACIÓN A CORTO, MEDIANO Y LARGO PLAZO

El cultivo *in vitro* comprende una sucesión de pasos: (i) desinfección, disección y extracción del tejido de la planta (ii) determinación de una técnica adecuada y establecimiento de la colección *in vitro* (iii) recuperación del tejido viable de la fase de conservación a través del trasplante a macetas (iv) regeneración de plantas.

Diversos órganos o tejidos pueden conservarse *in vitro*, pero usualmente se dividen los materiales vegetales iniciales en dos categorías: diferenciados y no diferenciados. En los tejidos diferenciados, el cultivo se deriva de meristemas provenientes de yemas y brotes o de meristemas adventicios derivados del cultivo *in vitro*. Esta técnica incluye la micropropagación en la forma de cultivo de tallos, de hojas, de raíces, de microtubérculos y de embriones. En los tejidos no diferenciados se cultivan callos o células en suspensión en medios sólidos o líquidos. Dentro del marco de la conservación del germoplasma se debe mantener la composición genética de cada entrada,

razón por la cual se utiliza preferentemente los meristemas. El cultivo de meristemas es apropiado para la conservación porque que no solamente el meristema tiene una estabilidad genética muy alta, sino porque además tiene un potencial de propagación alto y de facilidad de saneamiento. Al contrario, el cultivo de células somáticas, no meristemáticas y las de origen germinal presentan con frecuencia inestabilidad citogenética (euploidia, aneuploidia, alteraciones cromosómicas), sobre todo cuando se prolonga el estado *in vitro*.

En las técnicas convencionales de los meristemas, el objetivo es obtener un crecimiento continuo de los explantes a tasas normales, a través de sub-cultivos sucesivos de meristemas en medios frescos. Cada sub-cultivo aumenta la posibilidad de pérdidas debido a accidentes o contaminación microbiana.

La conservación del germoplasma *in vitro* puede realizarse a corto-mediano plazo y a largo plazo mediante métodos criogénicos. La alternativa a utilizar dependerá del progreso de la capacidad tecnológica, infraestructura disponible, objetivos de conservación y la naturaleza de las especies a conservar.

12.4. CULTIVO *IN VITRO* DE CRECIMIENTO LENTO

La conservación *in vitro* a corto y mediano plazo necesariamente requiere de subcultivos periódicos, actividad que generalmente dificulta su conservación. Para prolongar el período de conservación *in vitro*, aumentando de esta forma los tiempos requeridos entre los sucesivos subcultivos, se han desarrollado métodos que permiten retardar el crecimiento de los explantes y así prolongar el tiempo requerido entre los sucesivos subcultivos. Esos métodos llamados «cultivo *in vitro* de crecimiento lento o a tasas mínimas» se basan en la reducción del crecimiento mediante diferentes métodos: modificación de nutrientes del medio de cultivo, uso de reguladores o inhibidores de crecimiento, reducción de la tempe-

ratura de incubación, desecación y cambio de la concentración de gases atmosféricos, reducción de tensión de oxígeno, defoliación de brotes y manipulación de la presión osmótica de los medios de cultivo, tamaño de los envases o tubos, intensidad de luz y fotoperiodo. La temperatura interacciona con casi todos esos factores.

En resumen, el crecimiento y desarrollo puede ser reducido agregando o modificando los medios de cultivo en dos formas básicas: generando estrés (principalmente osmótico) o utilizando reguladores de crecimiento para reducir la elongación y multiplicación celular.

Diferentes investigaciones fueron conducidas en varios cultivos ecológicamente diferentes, poniendo en evidencia principios o tendencias. La reducción de la temperatura disminuye el crecimiento de los cultivos, pero ésta depende del cultivo. También se reduce el crecimiento privando al medio de ciertos nutrientes inorgánicos y orgánicos. El crecimiento varía según el contenido total del nitrógeno, el balance Carbono/Nitrógeno y el contenido de sacarosa. Los reguladores de crecimiento actúan en forma antagónica al ácido giberélico, reduciendo la elongación y multiplicación celular. El ácido abscísico es retardante del crecimiento. La concentración osmótica del medio es otro factor importante. Los azúcares-alcoholes (sorbitol, manitol) no asimilables por las plantas, son sustancias que generan estrés osmótico y reducción del crecimiento de los explantes. El uso de carbón activado combinado con baja concentración osmótica del medio permite aumentar el tiempo de conservación. En condiciones de baja temperatura se necesita reducir la intensidad de la luz. Cada especie tiene un óptimo de conservación *in vitro* y se debe diseñar el protocolo más adecuado para cada especie. Desafortunadamente en algunos casos esos factores combinados varían con la variedad y el tiempo de conservación.

Cabe recalcar que esos métodos pueden ocasionar alteraciones no deseables para la con-

servación del germoplasma. Por ejemplo, las células de plántulas bajo estrés son de menor tamaño, con vacuolas muy pequeñas y en menor número. Por otro lado, los reguladores de crecimiento pueden producir condiciones de senescencia que limitan el rango de concentración de esas sustancias químicas. El otro problema es la reacción diferente de genotipos del banco de germoplasma debido a una condición hormonal no igual entre los explantes. Otra alternativa es reducir la temperatura ambiental de la cámara de crecimiento *in vitro* hasta los límites en que se logre la mayor longevidad de las plántulas. El principio es la reducción del sistema metabólico de la planta debido a la alta sensibilidad de enzimas, hormonas y reguladores, al efecto de las temperaturas.

Protocolos que permiten la efectiva conservación de germoplasma *in vitro* han sido desarrollados para aproximadamente 37.600 accesiones en el mundo. Si bien el cultivo *in vitro* elimina los problemas asociados con la conservación en campo, su éxito es función de la eficiencia de la micropropagación y de la manutención de la integridad genética de las colecciones.

Ciertas propiedades del cultivo *in vitro* reducen la fidelidad de los sistemas de manutención *in vitro* de germoplasma. La variabilidad asociada al cultivo *in vitro* se denomina variación somaclonal, es decir, alteraciones genéticas de los materiales conservados *in vitro* respecto a la planta madre, situación no deseada desde el punto de vista de la conservación de germoplasma. Algunas de estas variaciones son heredables mientras que otras son epigenéticas, de tipo reversible y no hereditaria. La variación somaclonal puede ser atribuida a diversos factores como la especie, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento, el tipo de explante y el número de repicajes requeridos entre subcultivos. Por lo tanto, es importante manejar los factores que inducen variación somaclonal y evaluar posibles

alteraciones, utilizando análisis citológicos y/o moleculares en los materiales conservados *in vitro*. La variabilidad asociada al cultivo *in vitro* puede ser parcialmente minimizada utilizando ápices meristemáticos, los cuales poseen células con un menor grado de diferenciación y genéticamente más estables. El riesgo de cambio genético en este tipo de material es mucho menor que cuando se emplean "callos" o estructuras desorganizadas. La elección del explante y el monitoreo de las colecciones son importantes a fin de detectar posibles variantes en relación al material original, el cual puede ser efectuado mediante marcadores moleculares.

12.5. CRIOPRESERVACIÓN O SUSPENSIÓN TOTAL DEL CRECIMIENTO Y METABOLISMO

Actualmente, debido a los inconvenientes de los métodos antes descritos, se han derivado crecientes recursos a la búsqueda de otros métodos de conservación a largo plazo, como la criopreservación. El desarrollo de métodos de conservación de germoplasma a temperaturas criogénicas ha surgido como una nueva alternativa de conservación a largo plazo (colección base) para un gran número de especies. La criopreservación se basa en la reducción y subsecuente detención de las funciones metabólicas y la división celular de los tejidos vegetales debido a la disminución de su temperatura al nivel del nitrógeno líquido (-196° C), manteniendo así la viabilidad de los materiales conservados por periodos indefinidos de tiempo.

El proceso de criopreservación comprende diferentes pasos:

- aislamiento y deshidratación del tejido
- enfriamiento
- congelación
- almacenamiento
- descongelamiento
- recuperación y crecimiento de plantas

Una etapa muy crítica es la formación de cristales de hielo intra y extracelular. Durante el proceso de congelación se inicia la formación de cristales de hielo en la solución extracelular del tejido, produciendo un desequilibrio termodinámico, perdiéndose agua desde el interior de las células hacia los cristales de hielo ubicados al exterior. El equilibrio se produce formándose hielo intracelular, lo que mata las células. El éxito del proceso depende de la velocidad y evolución del enfriamiento y congelación. Si el enfriamiento es lento, toda el agua congelable sale de la célula produciéndose daño por deshidratación, aumento de la concentración osmótica interna y desintegración de la membrana celular. Si el enfriamiento es rápido, el agua congelable no sale de la célula por falta de tiempo y se forman cristales intracelulares. El enfriamiento moderado controla la salida del agua de la célula así como la deshidratación y congelamiento intracelular, debido al contenido suficiente de la célula. El control de la rapidez del enfriamiento se ejerce hasta cierta temperatura límite, después de la cual ya no existe peligro. Las temperaturas límite y las tasas de enfriamiento deben ser investigadas para cada especie. A fin de superar el problema de la formación de hielo, se puede usar agentes crioprotectores, como glicerol, sorbitol y manitol; el objetivo es de reemplazar el agua de la célula por crioprotectores. Según las especies, varias técnicas han sido usadas para evitar el daño causado por el congelamiento: reducción rápida de la temperatura mediante inmersión directa del explante en nitrógeno líquido, enfriamiento lento y continuo hasta una cierta temperatura (- 40° C) y posterior inmersión en nitrógeno líquido.

El descongelamiento de los tejidos es otra etapa crítica. El método más eficiente es poner en baño maría a 40° C por algunos minutos hasta que el hielo se transforme en agua. Durante el descongelamiento, se produce la hidratación del ambiente intra y extracelular. Si el descongelamiento es lento, en presencia de microcristales, estos se cristalizan formando

cristales de hielo más grandes, produciendo la destrucción de organelos y membranas celulares. Si la deshidratación es extrema, el descongelamiento tiene que ser más lento para prevenir una plasmólisis masiva. Después del descongelamiento, se debe cambiar el contenido del medio debido a la presencia de sustancias tóxicas provenientes de las necrosis de las células.

Una exitosa criopreservación depende de numerosos factores como el tipo y condición fisiológica del explante, los crioprotectores empleados, la rapidez del proceso de congelamiento y descongelamiento, la temperatura de manutención y la estrategia de recuperación de los tejidos, entre otros. Varias técnicas existen para reducir o eliminar estos problemas: pretratamientos con crioprotectores, enfriamiento y descongelamiento rápido o lento, reducción o absorción de las sustancias tóxicas que se generan de las células muertas del tejido criopreservado, etc.

Esta metodología ha sido utilizada en aproximadamente cien especies a nivel mundial, lo que permite suponer que en un futuro cercano se convertirá en la metodología de conservación más eficaz, segura y de bajo costo. Los tejidos más apropiados para criopreservar son varios como granos de polen, protoplastos, semillas, yemas invernales, meristemas, embriones cigóticos y somáticos, cultivos en suspensión y callos. Las primeras investigaciones en criopreservación identificaron los meristemas de tallos como lo más conveniente. Actualmente se demostró que los cultivos de embriones tienen ventajas y un bajo riesgo de variación somaclonal, particularmente los embriones cigóticos y somáticos de tamaño pequeño. Otra innovación de la técnica es la aplicación de la vitrificación. Los tratamientos se basan en un enfriamiento muy rápido, causando la vitrificación interna de los solutos dentro de las células, evitándose la formación de hielo intracelular.

12.6. INTEGRIDAD Y ESTABILIDAD EN CULTIVO *IN VITRO*

El objetivo básico de los bancos de germoplasma de propagación clonal es el de mantener la identidad genética de cada accesión. Desde el punto de vista del cultivo de tejidos, está ampliamente demostrado que mientras más directa sea la regeneración de una nueva plántula, la probabilidad de variación es mucho menor. Sin embargo, variaciones epigenéticas, puntuales y quimeras pueden ocurrir en cualquier momento, particularmente en los bancos de germoplasma clonales *in vitro* a mediano plazo usando bajas temperaturas y/o reguladores de crecimiento. Esto significa una presión de selección sobre el material y una posibilidad de variación genética. Resulta que es necesario desarrollar programas de evaluación de la integridad genética de los materiales conservados *in vitro*. La comprobación de la integridad genética requiere observaciones morfológicas, comprobando los materiales mantenidos *in vitro* con los materiales semejantes multiplicados en los terrenos. Existen también pruebas bioquímicas, moleculares y cromosómicas para comprobar la integridad genética y reducir el riesgo de variación somaclonal.

12.7. BIBLIOGRAFÍA

- Acquaah G. 2007. *Principles of plant genetics and breeding*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp. 568.
- Castillo R., 1995. *Plant genetic resources in the Andes: impact, conservation, and management*. Crop Science 35: 355-360.
- Dillon S.L. 2006. *Strategies employed to collect plant genetic resources for ex situ conservation*. In: Henry R.J. (eds). Plant conservation genetics. Food Products Press, Binghamton, N.Y., pp. 37-56.
- Engelmann F., Engels J.M.M. 2002. *Technologies and strategies for ex situ conservation*. In: Engels J.M.M., Ramanatha Rao V., Brown A.H.D., Jackson M.T. (eds). Managing plant genetic diversity. CAB International and IPGRI, Wallingford, pp. 89-103.
- Hawkes J.G., Maxted N., Ford-Lloyd B.V., 2000. *The ex situ conservation of plant genetic resources*. Kluwer, Dordrecht, pp. 250.
- Henry R.J. 2006. *Plant conservation genetics*. Food Products Press, Binghamton, N.Y., pp. 180.
- Karp A. 2002. *The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity?* In: Engels J.M.M., Ramanatha Rao V., Brown A.H.D., Jackson M.T. (eds). Managing plant genetic diversity. CAB International and IPGRI, Wallingford, pp. 43-56.
- Lobo M., 2006. *Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual*. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria 7(2), 40-54.
- Luan H.Y. 2001. *In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources*. In: Saad M.S., Ramanatha Rao V. (eds). Establishment and management of field gene bank, a training manual. IPGRI – APO, Serdang, pp. 54-58.
- Paris B., Helliot B., Strosse H., Remy S., Lepoivre P., Swennen R. 2005. *Germplasm conservation, virus eradication and safe storage of transformation competent cultures in banana: the importance of cryopreservation*. Acta Horticulturae (ISHS) 692: 51-60.
- Pence V.C., Sandoval J.A., Villalobos V.M., Engelmann F. 2002. *In vitro collecting techniques for germplasm conservation*. IPGRI Technical Bulletin No. 7. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Popenoe H., 1989. *Lost crops of the Incas. Little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation*. National Research Council. National Academy Press Washington. D.C., pp. 415.
- Rao N.K., 2004. *Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology*. African Journal of Biotechnology 3(2): 136-145.
- Reed B.M., Chang Y. 1997. *Medium- and long-term storage of in vitro cultures of temperate fruit and nut crops*. Razdan M.K., Cocking E.C. (eds). Conservation of plant genetic resources *in vitro*, Volume 1: general aspects. Science Publishers Inc., Enfield, NH, pp. 67-105.
- Reed B.M., De Noma J., Chang Y. 2000. *Application of cryopreservation protocols at a clonal genebank*. In: Engelmann F., Takagi H. (eds). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp. 246-249.
- Sevilla R., Holle M. 2004. *Recursos genéticos vegetales*. Luis Leon Asociados, Lima, Perú, pp. 445.
- Takagi H. 2000. *Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical*

species, pp. 178-193. In: Engelmann F., Takagi H. (eds). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Thormann I., Dulloo M., Engels J. 2006. *Techniques for ex situ plant conservation*. In: Henry R.J. (eds). Plant conservation genetics. Food Products Press, Binghamton, N.Y., pp. 7-36.

Capítulo 13

Conservación *in vitro* y evaluación de la estabilidad genética

Raúl Blas Sevillano, Carmen L. Villarroel & Gino Aguirre

13.1. INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de colecciones de plantas mediante el empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* ha sido y es un método estándar de conservación que contribuye a la preservación de la diversidad genética en los cultivos y representa una práctica alternativa al mantenimiento de colecciones de campo, las cuales de forma general ocupan grandes áreas, las que son muy vulnerables y difíciles de mantener, encontrándose siempre bajo los riesgos de fenómenos naturales, plagas y enfermedades que pueden causar su desaparición.

Los trabajos relacionados con la micropropagación y la conservación *in vitro* de plantas incluyen una serie de riesgos donde las plantas micropropagadas podrían sufrir ciertas modificaciones en el genoma y producir plantas *in vitro* diferentes a la planta original. Para evitar en lo posible estos cambios, es necesario la estandarización de un protocolo de conservación para la especie, tanto los nutrientes del medio de cultivo y las condiciones medioambientales donde se establece el cultivo *in vitro*. En consecuencia, ello también implica, el establecimiento de un protocolo de monitoreo de posibles inducciones o generación de nuevos variantes.

13.2. CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA

En cualquier especie cultivada es muy importante conservar toda la variabilidad y también a las especies silvestres relacionadas para mantener su nivel de diversidad genética presente. Comúnmente, las técnicas más útiles para almacenar las entradas de los cultivares o especímenes silvestres son métodos de almacenamiento en frío o a temperaturas ultra bajas, porque demandan espacios pequeños, costos relativamente bajos, eliminando problemas externos que afectan la conservación *in situ* (Peredo *et al.*, 2008).

La conservación de los recursos fitogenéticos mediante técnicas de cultivo *in vitro* se realiza haciendo cambios en el ambiente de cultivo para reducir el crecimiento o desacelerar y/o suprimir totalmente el crecimiento de las células y tejidos. Con ello lo que se persigue es extender lo máximo el tiempo de renovación o refrescamiento de la entrada o, extenderlo indefinidamente. La conservación en frío *in vitro* reduce el crecimiento de la planta, minimizando los gastos y el tiempo de consumo de los protocolos, como el incremento del tiempo de los intervalos de subcultivo. Estos tiempos de subcultivo varían según los protocolos y especies entre 1 y 2 años.

En consecuencia hay dos sistemas básicos de conservación del germoplasma *in vitro*, uno mediante la limitación del crecimiento hasta tasas mínimas, llamada en frío, y otro mediante la supresión total del crecimiento y del metabolismo celular, conocido también como criopreservación (Roca *et al.*, 1993).

En ese afán, son numerosas las sustancias que han sido empleadas en los medios de cultivo para reducir el ritmo de crecimiento de las plantas, entre las que pueden citarse el manitol, sorbitol, ácido acetil salicílico (ASA) y otras. Sin embargo, tanto la sustancia como su concentración, estarán en dependencia de la especie y dentro de éstas, los genotipos a conservar, así como las condiciones de temperatura, intensidad luminosa, fotoperiodo y otros factores a los cuales son conservadas las plantas, por lo que resulta de gran importancia probar, en cada laboratorio cuál es la sustancia idónea y qué dosis emplear para lograr los mejores resultados.

En este sentido, existen esfuerzos en los estudios sobre la fisiología de las plantas conservadas *in vitro* para lograr mejor respuesta en el desarrollo y su mantenimiento de la identidad genética (Cárdenas & Villegas, 2002). El crecimiento de los explantes en un ambiente pequeño y controlado, llevaría a la generación de algunos problemas diferentes a los que ocurren cuando una planta se desarrolla en un ambiente natural. Por ejemplo, en general, en plántulas *in vitro* se generan hojas de apariencia translúcida, húmeda y vidriosa, conocida como hiperhidratación. Esto significa conocer el efecto de los solutos del medio del cultivo que tienen en el potencial osmótico, debido a que pueden ocasionar que los explantes *in vitro* absorban mayor cantidad de agua y ocurra hiperhidratación de tejidos (Cárdenas & Villegas, 2002). Entre las principales causas de la hiperhidratación están el potencial osmótico y la concentración del agar en el medio del cultivo. En consecuencia, conforme el potencial osmótico es más negativo y se cambia el potencial matricial del medio, la hiperhidra-

tación disminuye como consecuencia de una menor absorción de agua, además el explante tiene un contacto menos eficiente con el medio, lo que dificulta la disponibilidad de los macro y micronutrientes del medio, dependiendo de la concentración del agar (George, 1993, citado por Cárdenas & Villegas, 2002).

El potencial osmótico es uno de los componentes del potencial del agua. Al aumentar la concentración de la solución, la presión osmótica también aumenta. La concentración total de las sales de un medio de cultivo determina el potencial osmótico del medio. Este se obtiene de la suma de los potenciales osmóticos de los componentes, donde influyen no sólo los pesos sino también el grado de disociación de las sales que lo constituyen. Lo mismo sucede con los azúcares. El efecto que tienen los azúcares y los micro y macronutrientes en el potencial osmótico es diferente en los distintos medios de cultivo. El crecimiento y organogénesis del cultivo *in vitro* se detendría si el potencial osmótico fuera más negativo que aproximadamente $-3 \times 10^5 \text{ Pa} = -3 \text{ bar} (= -0.3 \text{ MPa})$, por que se impide la absorción del agua (Pierik & Steegmans, 1975; citado por Cárdenas & Villegas, 2002). Por ello, se han hecho muchos esfuerzos en el mundo en estandarizar medios de cultivo y el ambiente para diferentes cultivos. Así por ejemplo, en el Centro Internacional de la papa (CIP) se han establecido los protocolos de conservación de los tubérculos y raíces andinas incluyendo papa y camote (Cuadro 1), los que actualmente se encuentran disponibles para su aplicación en diferentes bancos de germoplasma, particularmente en la región andina. Como se observa en el Cuadro 1, el agente osmótico más utilizado es el sorbitol. Para el caso de las especies de arracacha, achira y yacón, los protocolos de conservación *in vitro* aún no están bien establecidos. Considerar estos aspectos que generan estrés en los explantes en el proceso de conservación *in vitro* de germoplasma, son esenciales para reducir en lo posible cambios potenciales de la identidad genética del germoplasma *in vitro*.

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo para la conservación *in vitro* de raíces y tuberosas andinas incluyendo papa y camote

| | Papa * | | | Camote | Oca | Ulluco | Mashua | Achira | Yacón | Arracacha |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|-----|--------|--------|--------|-------|-----------|
| | No. 22 | No. 32 | No. 42 | | | | | | | |
| Sales MS | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Ácido ascórbico (g/L) | - | - | - | 0,2 | - | - | - | - | - | - |
| ANA (mg/L) | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,05 | - |
| BAP (mg/L) | - | - | - | - | - | - | - | 4 | - | 4 |
| Nitrato de calcio (g/L) | - | - | - | 0,1 | - | - | - | - | - | - |
| Pantotenato de calcio (mg/L) | - | - | - | 2 | 2 | 2 | 2 | - | 2 | - |
| Ácido giberelico Glicina-HCl (mg/L) | 2 | 2 | 2 | - | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| L-Arginina (g/L) | - | - | - | 0,1 | - | - | - | - | - | - |
| mio-inositol (mg/L) | 100 | 100 | 100 | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Ácido nicotínico (mg/L) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | - | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Putrescina-HCl (mg/L) | - | - | - | 20 | - | - | - | - | - | - |
| Piridoxina-HCl (mg/L) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | - | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Tiamina-HCl (mg/L) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | - | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Sucrosa (g/L) | 20 | 20 | 20 | 30 | 20 | 20 | 20 | 25 | 30 | 25 |
| Sorbitol (g/L) | 20 | 30 | 40 | - | 30 | 30 | 30 | - | - | - |
| Agar (g/L) | 6,5 | 6,5 | 6,5 | - | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| Phytigel (g/L) | - | - | - | 3 | - | - | - | - | - | - |
| pH | 5,6 | 5,6 | 5,6 | 5,7 | 5,6 | 5,6 | 5,6 | 5,6 | 5,6 | 5,6 |

Sorbitol

El sorbitol es un poliol o alcohol de azúcar, conocido también como glucitol. Fue identificado por primera vez cuando se aisló del fruto del fresno de montaña en 1872. En la naturaleza es un glúcido principal producido por la fotosíntesis en las hojas adultas de ciertas plantas de las familias *Rosaceae* y *Plantaginaceae* y en los frutos como las

peras, las manzanas, las cerezas y los duraznos, etc. En la actualidad, el sorbitol, cuya fórmula empírica es $C_6H_{14}O_6$, se produce industrialmente mediante la hidrogenación catalítica de soluciones de D-glucosa (Figura 1). La presión osmótica ejercida por las soluciones de sorbitol es superior a la de las soluciones de sacarosa con una sustancia seca similar, razón por la cual se utiliza en los medios de cultivo *in vitro* para reducir el proceso de

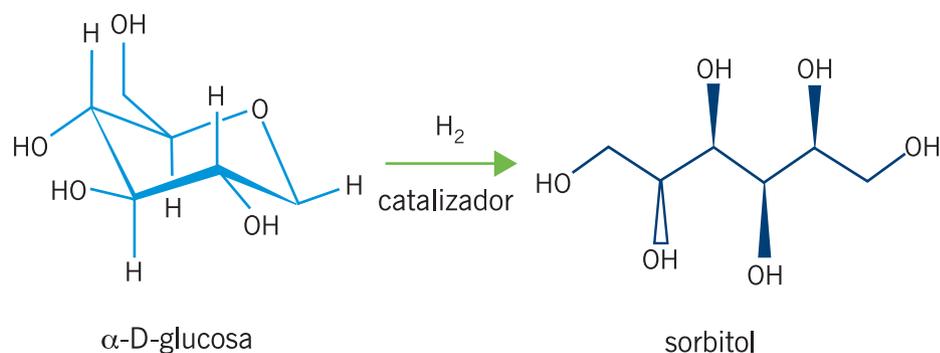


Figura 1. Proceso de obtención industrial y estructura química del sorbitol

asimilación de minerales y agua por las plántulas. Las soluciones de sorbitol estabilizan las fórmulas más eficazmente contra el deterioro microbiológico que sus equivalentes de sacarosa. En contraste con los azúcares, el sorbitol es absorbido por transporte pasivo. Esto, origina menores porcentajes de absorción. Además, la lenta absorción y el complejo metabolismo del sorbitol implica que tiene menos valor calórico que los azúcares normales.

Por otro lado, la preservación a ultra baja temperatura, o llamado también criopreservación, es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre el punto de ebullición del nitrógeno líquido (-196 °C). Esta baja temperatura disminuye las funciones vitales de una célula o un organismo y puede mantenerlos en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo, con ello se reemplaza la rutina de subcultivos. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas. Para ello, es necesaria la utilización de un criopreservante, que es un compuesto químico que permite la mantención de un tejido o de células por mucho tiempo cuando se las mantiene a baja temperatura. Los criopreservantes se catalogan de acuerdo a la velocidad para penetrar los tejidos, el grado de protección al cristal de agua que confieren y por la toxicidad química que pueden tener sobre las células. El grado de protección a las células está directa-

mente vinculado al grado de asociación que tengan con el agua molecular. A mayor afinidad, menor el agua disponible para la cristalización dañina.

Además, estos productos se utilizan en conjunto con los medios nutritivos líquidos que conforman las mezclas congelantes. Las concentraciones criopreservantes son lamentablemente tóxicas para el tejido a temperatura ambiente, por lo cual, en el procedimiento de congelado, se deben respetar ciertos tiempos de exposición del material a 4° C, para que el producto protector penetre el tejido sin alcanzar los niveles tóxicos referidos, antes del inicio del proceso de congelamiento propiamente del explante. En el mismo sentido, cuando se procede a la técnica de descongelado, previo al uso del material, se debe someter a un lavado minucioso con medios nutritivos a concentraciones decrecientes del criopreservante, para su total eliminación evitando de esa forma los efectos tóxicos. Los criopreservantes más usados son: Dimetil-sulfóxido (DMSO), es muy tóxico a temperatura ambiente, pero si se aplica a baja temperatura es el que posee mejor resultado; Polivinil pirrolidona (PVP), que no tiene un movimiento rápido tisular (a través de los tejidos), por lo que se utiliza mucho en embriones; Glicerol, muy utilizado para mantener enzimas entre los -5 a 4° C sin congelar; etilenglicol, propanodiol, entre otros. Además se ha observado que la glucosa, la trealosa y otros glúcidos pueden actuar como criopreservantes naturales.

En los protocolos de criopreservación de la yuca y papa, el criopreservante usado es el DMSO (Gonzales-Arno *et al.*, 2008), este disolvente sería el menos tóxico, razón por la cual su uso es bastante generalizado. El dimetil sulfóxido (DMSO, CH_3SOCH_3) es un líquido orgánico sin color que contiene sulfuro, usado como disolvente orgánico industrial, criopreservante y como un medicamento (reduce el dolor y la inflamación). Por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares el DMSO sirve también como acarreador de drogas o venenos. El uso de DMSO como criopreservante tiene el objetivo de prevenir la muerte celular cuando ellas son enfriadas. También, el DMSO es usado en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para evitar la formación de estructuras secundarias tanto en el DNA blanco y en los iniciadores. La adición de DMSO es beneficioso cuando el DNA molde posee regiones ricas en GC y forma potentes estructuras secundarias del DNA que puede provocar que la polimerasa se detenga. El DNA con regiones ricas en GC puede ocasionar una ineficiente separación de las dos cadenas del DNA, por lo tanto la adición de aditivos en estos casos es beneficiosa, pues el DMSO interfiere en la formación de enlaces de hidrógeno entre ambas cadenas (Chakrabarti & Schutt, 2001; Musso *et al.*, 2006). Sin embargo, el uso de DMSO en PCR incrementaría la tasa de mutación.

Técnicas de criopreservación existen para alrededor de 100 especies vegetales. Aunque los efectos de los criodaños sobre el genoma son en general desconocidos, el polimorfismo de DNA acumulativo son el resultado del proceso conjunto de cultivo-criopreservación-regeneración (Harding, 2004). Sin embargo, varios factores pueden causar variación somática, como la exposición de los tejidos a los estreses físicos, químicos y fisiológicos. Estos factores generarían criodaños que tendrán efectos en el genoma. Otros factores tradicionalmente descritos que pueden causar variación somaclonal son la fuente del

explante, la edad del cultivo y el genotipo (Peredo *et al.*, 2008).

Por ello, es recomendable estimar la integridad genética de las plantas sobrevivientes del almacenamiento criogénico para determinar si ellas son los tipos verdaderos luego de la criopreservación. Esta estimación puede ser realizada al nivel fenotípico, histológico, citológico, bioquímico y molecular.

13.3. VARIACIÓN SOMACLONAL

El cultivo *in vitro* puede ser muy estresante para las células vegetales e involucra procesos mutagénicos durante el establecimiento del explante, la inducción de callo, la formación de embriones y la regeneración de plantas. Este proceso denominado variación somaclonal por Larkin y Scowcroft (1981), involucra cambios en las plantas regeneradas y en algunos casos en sus progenies. Estas variaciones, son los resultados tanto de las diferencias genéticas que preexisten en las células somáticas del explante como de efectos inducidos por los componentes del medio de cultivo.

Además, en la conservación de germoplasma *in vitro* se debe tener en cuenta que los explantes utilizados son yemas apicales o axilares, las que son completadas en su desarrollo y promovidas en un medio de cultivo estandarizado según la especie y variedad (Cuadro 1). Este crecimiento y desarrollo del explante ocurre gracias al proceso de división mitótica, ello implica la replicación del genoma en cada división. Aunque esta replicación del DNA es de alta fidelidad por los mismos procesos de control durante la división celular, ocurre cambios en los nucleótidos por la ineficiencia del control de las DNA polimerasas $1/10^{10}$ (Reece, 2004). Esto junto con el medio estresante puede generar aun cambios más altos en proceso de conservación *in vitro*.

El término variación somaclonal es un término amplio que engloba diferentes fenómenos que causan variación genética o epigenética, que

pueden ser reflejados en cambios fenotípicos en las plantas regeneradas. Al mismo tiempo se debe asumir que la probabilidad del cambio está distribuido en forma al azar a lo largo del genoma. Aunque se han reportado la existencia de ciertas regiones del genoma con mayor susceptibilidad a la mutación. Los cambios no genéticos se denominan como la variación epigenética.

La variación epigenética

La variación epigenética hace referencia, en un sentido amplio, al estudio de todos aquellos factores no genéticos que intervienen en la determinación de la ontogenia. El término fue acuñado por Waddington (1942) para referirse al estudio de las interacciones entre genes y entorno que producen los organismos. Por otro lado, Holliday (1994), definió la epigenética como “el estudio de los mecanismos de control espacial y temporal de actividad del gen durante el desarrollo de organismos complejos”. La herencia epigenética resulta de la trasmisión de información que no depende de secuencias de las bases nitrogenadas del DNA a través de la meiosis o mitosis. La información epigenética modula, por tanto, la expresión de los genes sin alterar la secuencia de DNA. Los tres principales tipos de información epigenética son:

a) Metilación de la citosina del ADN: La metilación es la adición de un grupo metilo (-CH₃) a una molécula. Aquí la metilación consiste en la transferencia de grupos metilos a algunas de las bases citosinas (C) del DNA situadas previa y contiguamente a una guanina (G). El grupo metilo es transferido desde S-adenosilmetionina a una posición C-5 de citosina por una DNA-5 metiltransferasa. Puesto que la metilación es fundamental en la regulación del silenciamiento de los genes, puede provocar alteraciones en la transcripción genética sin necesidad de que se produzca una alteración en la secuencia del DNA, siendo uno de los mecanismos responsables de la plasticidad fenotípica. También pueden ser

metilados los productos de los genes, es decir, las proteínas, regulándose así también su función.

b) Marca o impronta genética (imprinting):

Esto se refiere a genes que pueden modificar su funcionamiento sin necesidad de un cambio en la secuencia del DNA. Este cambio en su forma de manifestarse que tienen los genes “imprantados” está generalmente relacionado a su origen parental. Un gen imprantado se manifiesta de una manera cuando su origen es paterno y de otra cuando proviene del gameto materno. Parece ser que existe un mecanismo celular que de algún modo “marca” o deja una impronta sobre todos los genes “imprantables” de acuerdo al sexo del individuo.

c) Modificación de histonas: Incluye acetilación, metilación y fosforilación (Watson *et al.*, 2004).

La metilación puede ser inducida en cultivo de tejidos estresados, vitrificados. El estado estresado puede activar DNA metilasas específicos que resultarían en dominios altamente metiladas dentro del genoma como una respuesta adaptativa, especialmente en las condiciones de alto estrés osmótico durante la crioprotección (Harding, 2004).

13.4. ESTABILIDAD GENÉTICA

En general, el objetivo de la conservación *ex situ*, como por ejemplo la de conservación *in vitro* es mantener la fidelidad genética de cada una de las entradas conservadas. Sin embargo, se ha reportado que el cultivo de tejidos induce la variación genética, a esta variación se le conoce como variación somaclonal. Este aspecto es muy importante para las bases de la misma micropropagación, ya que el objetivo principal del proceso es el mantenimiento de la fidelidad genética de los regenerantes, como por ejemplo durante la micropropagación de genotipos selectos. Se han propuesto muchos factores que influyen el

tipo y la frecuencia de variación somaclonal, tales como el medio utilizado, fuente del explante, edad de la planta, y el genotipo utilizado. La técnica de micropropagación que utiliza como explante yemas laterales o apicales, es uno de los extensamente usados en sistemas de micropropagación y es considerada la más segura para garantizar la estabilidad genética de las plantas obtenidas (Martins *et al.*, 2004). Este tipo de explantes son los que se utilizan en la conservación *in vitro* de los tubérculos y raíces andinas, tales como en las siguientes especies: papa, oca, olluco (o papalisa), mashua (o isaño), arracacha y yacón. Sin embargo, es importante considerar que la micropropagación puede involucrar alteraciones relacionadas con el daño de la célula y DNA, incluyendo estrés oxidativo causado por el uso de agentes oxidativos en la esterilización de los explantes primarios y en las heridas de los tejidos tanto en el inicio del cultivo o en los subcultivos (Cassells & Curry, 2001).

13.5. MONITOREO DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA Y EPIGENÉTICA

La estabilidad genética de las entradas micropropagadas o conservadas *in vitro* y otras formas de conservación *ex situ* se pueden realizar considerando diferentes tipos de marcadores, entre ellos: los marcadores morfológicos, citogenéticos, bioquímicos y moleculares.

Los marcadores moleculares, que están basados en el DNA proporcionan una forma eficiente de tamizar mutaciones inducidas en el cultivo de tejidos, ya que estos no son afectados por los factores ambientales (Peredo *et al.*, 2009). Desde este punto de vista, una aproximación basada en el análisis al azar del genoma parece apropiada; a la fecha, no hay un solo ensayo apropiado desarrollado para estimar la variación somaclonal. Algunas de las técnicas usadas en la detección de la variación genética son marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tales como los marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - Fragmentos

polimórficos de DNA Amplificados al Azar), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat ó inter microsatélites), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados), SSR (Simple sequence Repeats - Secuencias simples repetidas o microsatélites). De las cuales, los más útiles serían RAPD y AFLP, particularmente la última, que puede muestrear la variabilidad al azar de muchos *loci* a lo largo del genoma. Por ello, como ejemplo, se desarrolla brevemente estas dos técnicas.

13.5.1. Marcadores RAPDs

La técnica de RAPD detecta polimorfismo de la secuencia de los nucleótidos en una prueba basada sobre la amplificación de DNA usando iniciadores sintéticos cortos (generalmente de 10 bases). En esta reacción, se utiliza un único iniciador, y este se ancla al DNA genómico en 2 sitios diferentes sobre las hebras opuestas del DNA molde. Si estos sitios de anclaje están dentro de una distancia amplificable entre los dos sitios de anclaje, un producto de DNA discreto se produce a través de amplificación termocíclica. La presencia de cada producto de amplificación identifica homología completa o parcial de la secuencia de nucleótidos, entre el DNA genómico y el oligonucleótido iniciador en cada final (terminal) del producto amplificado. Fragmentos amplificados (0,5 - 5 kb) son separados por electroforesis en geles de agarosa y el polimorfismo es detectado como la presencia o ausencia de fragmentos de un tamaño particular (Figura 2).

El polimorfismo RAPD es el resultado del cambio de una base de nucleótido que altera el sitio de anclaje del iniciador, o una inserción o delección dentro de la región amplificada. Los polimorfismos son usualmente evidenciados por la presencia o ausencia de un producto de amplificación de un solo *locus*, esto significa que la técnica RAPD tiende a proveer solamente marcadores dominantes (Figura 3). Las ventajas de marcadores RAPDs son que ellos pueden ser bastante polimórficos, simple

provisto de una metodología rigurosamente estandarizada con los controles necesariamente adheridos. El ensayo es no radioactivo, requiriendo solamente cantidades nanogramos de DNA, y es aplicable a un amplio rango de

especies. Las desventajas incluyen información limitada acerca de la estabilidad ambiental del polimorfismo y las bases moleculares de RAPDs.

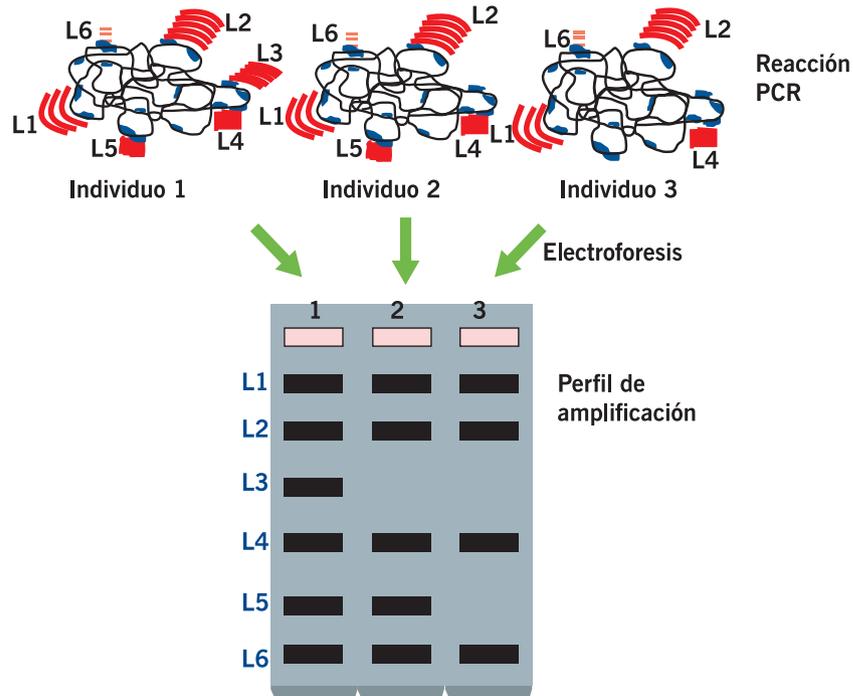


Figura 2. Diagrama de obtención de los marcadores RAPDs

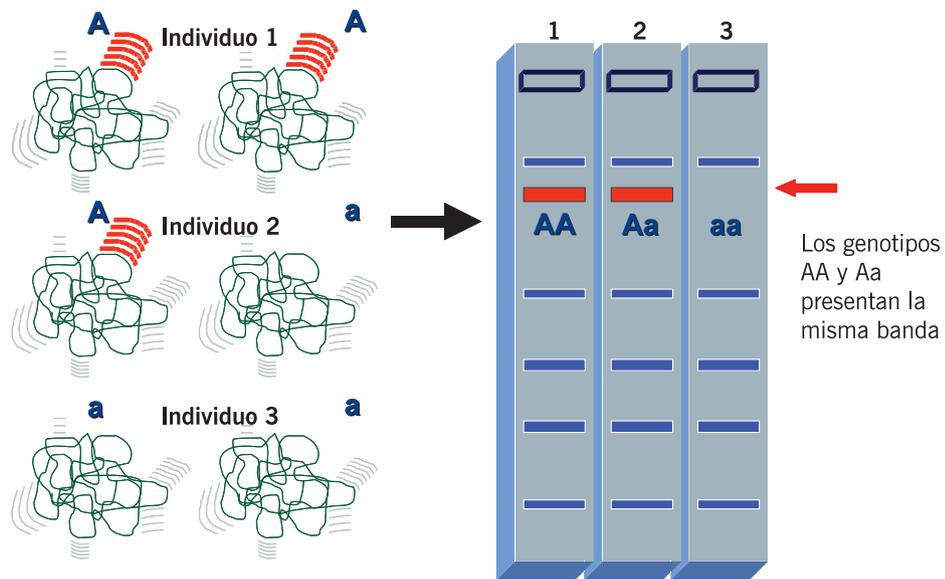
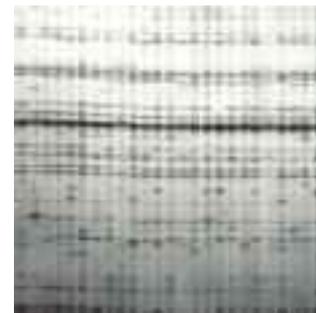
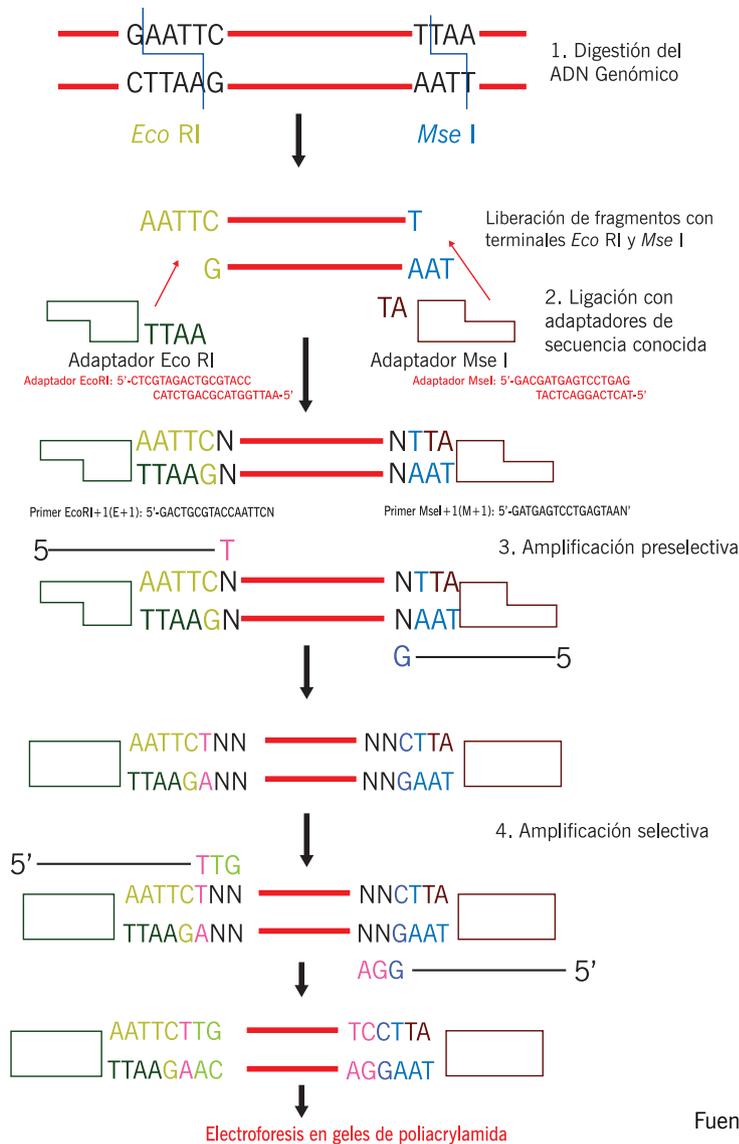


Figura 3. carácter codominante de los marcadores RAPD

13.5.2. Marcadores AFLPs

AFLPs son fragmentos de DNA (80 - 500 pb) obtenidos por restricción con endonucleasas y amplificadas por PCR. La técnica involucra tres etapas: (a) restricción del DNA y ligación de los oligonucleótidos adaptadores; (b) amplificación selectiva de los grupos de los fragmentos de restricción; (c) análisis de gel de los fragmentos amplificados (Figura 4). La amplificación PCR de los fragmentos de restricción se logra usando el adaptador y secuencias de sitios de restricción como sitios

blancos para el anclaje del iniciador. La amplificación selectiva se logra por el uso de iniciadores que extienden dentro de los fragmentos de restricción, amplificando solamente estos fragmentos flanqueados. Usando este método, grupos de los fragmentos de restricción pueden ser visualizados por PCR sin conocer la secuencia de nucleótidos. El método permite la co-amplificación específica de números altos de los fragmentos de restricción. generalmente 50 - 500 fragmentos de restricción son amplificados y detectados sobre geles de poliacrilamida (Vos *et al.*, 1995).



Polimorfismo obtenido con la técnica AFLP en el cultivo de arracacha.

Fuente: Adaptado de De Viene, 1998.

Figura 4. Principio de la técnica AFLP

Estos marcadores fueron desarrollados para detectar diferencias entre los genotipos. A pesar de las especificidades de cada una de las técnicas, las ventajas de tales como: su amplio rango de tamizado del genoma, el alto número de marcadores obtenidos en cada reacción y la confiabilidad para diferentes genomas, sin la necesidad de hacer un conocimiento previo sobre el perfil de estas poderosas técnicas multilocus en el estudio de estabilidad genética luego del cultivo de tejidos, hacen que en diferentes estudios estos marcadores hayan sido una ayuda exitosa en la búsqueda de puntos de mutación en plantas derivadas de cultivo de tejidos y conservadas *in vitro*.

Por otro lado, se están desarrollando marcadores para detectar variación epigenética. Recientemente, en la evaluación de la variación somaclonal han sido utilizadas otras técnicas basadas en las secuencias de los transposones como el polimorfismo amplificado de inter-retrotransposon (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism, IRAP) y el Polimorfismo Amplificado De Microsatélite Retrotransposon (REMAP). La dispersión, presente en todas las partes del genoma y la abundancia de los retrotransposones en el genoma de plantas provee una excelente base para desarrollar el sistema de marcadores. Ellos contienen secuencias largas, definidas y conservadas, las que pueden ser usadas para clonar marcadores específicos y las secuencias flanqueantes.

Además, miembros de replicación activa de la familia de retrotransposones pueden producir nuevas inserciones en el genoma, lo que originaría nuevo polimorfismo. La activación del retrotransposon relacionados con los procesos del estrés, como los que se producen durante el cultivo *in vitro* ha sido ampliamente descrito (Grandbastien, 2004). La activación también ha sido asociada con el decrecimiento de la tasa de metilación del genoma con respecto al cultivo *in vitro* (Liu *et al.*, 2004), tal como fue reportado para *H. lupulus* (Peredo *et al.*, 2006). Sin embargo, el planteamiento hipoté-

tico sobre las variaciones de metilación del DNA no solamente sería por la activación de los elementos transponibles, sino también bajo los mecanismos de inducción de mutagénesis del cultivo de tejidos como las alteraciones fenotípicas debido a la activación del gen, o silenciamiento del gen, eventos de ruptura de los cromosomas y cambios en la secuencia. Actualmente, varios métodos para medir la estabilidad de los niveles de metilación son disponibles, incluyendo metilación global, métodos de secuencia específica basada en modificaciones del bisulfito del DNA, y el polimorfismo amplificado de metilación sensitiva (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism, MSAP). MSAP es una técnica basada en AFLP que usa metilación sensitiva isozimómeros. MSAP ha sido ampliamente utilizada para estimar la estabilidad epigenética en plantas micropropagadas (Smykal *et al.*, 2007).

Perazzo *et al.* (2000) realizaron análisis de variación somaclonal en diferentes entradas de papa (*Solanum tuberosum* L). Para ello, utilizaron 20 entradas de conservación *in vitro* mantenidas de tres a cinco años sin subcultivo y 18 entradas criopreservadas por un año. En el análisis utilizaron 23 descriptores morfológicos y todas las entradas fueron comparadas con clones originales para verificar si ellas correspondían al tipo original parental verdadero. Las 20 entradas conservadas *in vitro* también fueron analizadas utilizando 14 *loci* microsatélites altamente polimórficos y los perfiles de amplificación obtenidas fueron comparadas con los perfiles de sus respectivos clones originales mantenido en campo. Seis entradas mostraron variaciones en diferentes caracteres morfológicos, cuatro entradas de conservación *in vitro* (en frío) y dos de criopreservación. En el análisis con microsatélites (SSR) se observaron variaciones remarcables de los alelos en cinco entradas, de las cuales, cuatro entradas fueron encontradas diferentes del clon parental original tanto por análisis morfológico como molecular, y una entrada mostró diferencia a nivel molecular sin ninguna diferencia morfológica.

Estos resultados sugieren cambios somaclonales, pero los autores interpretaron que probablemente estas variaciones serían debido a la mala identificación de las entradas durante la gestión del banco de germoplasma de la papa. Sin embargo, existen reportes de variaciones somaclonales en otros cultivos como el caso del plátano, observadas usando técnicas de isoenzimas y RAPD (El-DougDoug *et al.*, 2007).

Peredo *et al.* (2008) analizaron la estabilidad genética y epigenética de clones conservados *in vitro* y criopreservados en el lúpulo (*Humulus lupulus* L.). Para estimar la estabilidad genética utilizaron las técnicas de RAPD y AFLP, las cuales revelaron que no había ninguna variación cuando compararon con los controles conservados en el invernadero y los respectivos clones conservados *in vitro* y criopreservación. La estabilidad epigenética fue evaluada utilizando la técnica de MSAP y reportaron que alrededor de 36% de los *loci* fueron polimórficos cuando fueron comparados clones conservados *in vitro* y criopreservados con los respectivos clones parentales mantenidos en el invernadero. Los responsables de esta variación epigenética serían las variaciones en los patrones demetilación y metilación.

A pesar del poder de cada una de las técnicas moleculares mencionadas previamente, no existe una sola técnica ideal o suficiente, tomada como única para la estimación de la variación. Una combinación de varias técnicas debe ser usada para evaluar las plantas micropropagadas.

13.6. ESTRATEGIAS PARA REDUCIR VARIACIÓN SOMACLONAL

Criopreservación y almacenamiento en frío (*in vitro*), son las técnicas más utilizadas para satisfacer los requerimientos de la conservación del germoplasma por largos periodos. Para ello, el cultivo de tejidos continúa con su rol fundamental en el desarrollo de la técnica

de conservación de germoplasma y particularmente en la criopreservación. Pero también, quedan muchos retos científicos con respecto a la detección de la variación genómica en las plantas recuperadas luego de la conservación *in vitro* y/o criopreservadas.

Actualmente, existen diferentes aproximaciones para la estimación de las variaciones somaclonales, tales como:

- a) el análisis **fenotípico**, los cuales se realizan para un grupo de especies cultivadas importantes, a través de los descriptores morfológicos,
- b) las técnicas **citológicas** disponibles para detectar varios tipos de inestabilidad cromosómica, que incluyen análisis de poliploidía, aneuploidía, y otras anomalías mitóticas,
- c) los perfiles **bioquímicos** de los metabolitos, proteínas (isoenzimas) son útiles para comparar plantas recuperadas de la criopreservación o conservación *in vitro* con el material parental original por el cambio de los patrones de expresión del gen,
- d) el análisis de la **secuencia de DNA** genómico se realiza usando técnicas de hibridación (DNA-DNA) y técnicas de PCR y,
- e) el análisis de **variación epigenética** en cromatina y la metilación de las secuencias de DNA, encontrándose en diferentes especies de plantas cambios luego de la criopreservación, lo que sugiere alteración de los patrones de expresión del gen.

Para garantizar en lo posible el desarrollo clonal por división mitótica, se deben usar explantes diferenciados lo que comprende estructuras organizadas como yemas apicales, yemas laterales, o embriones. Estos ya están programados genéticamente para desarrollar plantas tipo verdaderas o idénticas al original. Con ello, se reduciría drásticamente potenciales mutaciones y la inducción de variación en plantas regeneradas sería mínima. Esta forma de propagación de las plántulas *in vitro* para su conservación debe ir con una estandariza-

ción adecuada para cada especie de los nutrientes, aminoácidos, y reguladores osmóticos como el sorbitol.

Por lo tanto, es importante determinar en las plantas conservadas por estos métodos de almacenamiento, el verdadero tipo original y la estabilidad genética como la epigenética. Para ello son esenciales el establecimiento de las técnicas de monitoreo usando marcadores morfológicos complementados con los marcadores moleculares que diferencien cambios genéticos y epigenéticos.

13.7. BIBLIOGRAFÍA

- Cárdenas A. & Villegas. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex.* 25(2): 213-217.
- Cassells A.C. and Curry R.F. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagation and genetic engineers. *Plant Cell Tissue Org Cult.* 64: 145-57.
- Chakrabarti R. & Schutt C. E. 2001. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Nucleic Acids Research*, 29(11): 2377-2381
- De Vienne D. 1998. Les Marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA editions. Paris, pp. 195.
- El-DougDoug, Kh.A., El-Harhi H.M.S., Korkar H.M. and Taha4R.M. 2007. Detection of somaclonal Variations in Banana Tissue Culture Using Isozyme and DNA Fingerprint Analysis. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(7): 622-627
- Golmirzaie, A.M. & A. Panta. 1997. Tissue culture methods and approaches for conservation of root and tuber crops. **In:** Conservation of Plant Genetic Resources *In vitro*. M.K. Razdan and E.C. Cocking (Ed.), pp. 123 - 152.
- Gonzales-Arno, M., A. Panta, W. Roca, R. Escobar & F. Engelmann. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot tips and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, and Tissue and Organ Culture*, Vol. 92:1-13.
- Grandbastien MA. 2004. Activation of plant retrotransposon under stress conditions. *Trends Plant Sci*; 3: 181-7.
- Harding K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *Cryoletters*, 25 (1): 3-22.
- Holliday R. 1994. Epigenetics: An overview. *Dev Genet* 15: 453-457
- Larkin P.J. & Scowcroft W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability for plant improvement. *Theor Appl Genet*; 60:197-214.
- Liu Z.L., Han F.P., Tan M, Shan X.H., Dong Y.Z., Wang X.Z. 2004. Activation of a rice endogenous retrotransposon Tos17 in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions. *Theor Appl Genet*, 109:200-9.
- Martins M, Sarmento D & Oliveira M.M. 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep.* 23: 492-6.
- Musso M., Bocciardi R., Parodi S., Ravazzolo R., and Ceccherini I. 2006. Betaine, Dimethyl Sulfoxide, and 7-Deaza-dGTP, a Powerful Mixture for Amplification of GC-Rich DNA Sequences. *Technical Advance, Journal of Molecular Diagnostics*, 8(5): 544-550.
- Perazzo G., Panta A., Rodríguez F., Gómez R., Toledo J., Huamán Z., Ghislain M., Golmirzaie A. M., & Roca W. 2000. Clonal True-to-Type Verification of Potato Accessions Retrieved from *In Vitro* Conservation and Cryopreservation. CIP Program Report 1999 – 2000, pp. 175-183.
- Peredo E.L., Revilla M.A & García-Arroyo R. 2006. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures. *J. Plant Physiol*, 163:1071-1079.
- Peredo E. L., Arroyo-García R., Reed B. M. & Revilla M. A. 2008. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology* 57: 234-241.
- Peredo E. L., Arroyo-García R. & Revilla M.A. 2009. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. *Journal of Plant Physiology* 166: 1101-1111
- Reece R. J. 2004. Analysis of genes and genomes. John Wiley & sons, ltd, Chichester, England.
- Roca W., Arias D. I. & Chácez R. 1993. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. En: Cultivo de tejidos en la agricultura- Fundamentos y aplicaciones. W.M. Roca & L.A. Mroginski (Eds). Centro Internacional de agricultura Tropical, Cali, Colombia, pp. 970.
- Smykal P, ValledorL, Rodriguez R & Griga M. 2007. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep*; 26:1985-98.
- Vos, P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M. & Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21): 4407-4414.
- Waddington C.H. 1942. The epigenotype. *Endeavour* 1: 18-20.
- Watson J. D., Baker T. A, Bell S. P, Gann A., Levine M. & Losick R. 2004. Molecular biology of the gene. Fifth edition, Benjamin Cummings, CA, USA, pp. 732.

Capítulo 14

Micropropagación y Conservación de Achira (*Canna edulis*)

Eva Dancé Sifuentes, María de Lourdes Tapia & Rosario Lucero

14.1. INTRODUCCIÓN

Entre los cultivos “olvidados” en los Andes destaca la achira (*Canna edulis*) que se considera como uno de los primeros cultivos domesticados en la Región Andina. Es fácil de cultivar y se desarrolla muy bien produciendo rizomas subterráneos, comestibles y algunas veces, muy grandes. El valor de este cultivo se basa en la calidad de sus granos de almidón que se consideran los más grandes reportados y se pueden ver a simple vista, siendo tres veces más grandes que el almidón de papa. Este almidón sometido a cocción es brillante y transparente, y no opaca como el de papa, maíz o el arrowroot (*Maranta arundinacea*). Este almidón cocinado es muy digestible y tiene características muy importantes para niños, inválidos, ancianos y personas con problemas de digestión.

14.2. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Evidencias arqueológicas muestran que el rizoma de achira (*Canna edulis*) fue utilizado desde la época pre-hispánica, encontrándose rizomas crudos, cocidos y sus representaciones en la cerámica de la cultura Wari 100 a 700 d.C. y de la cultura Chimú (Jaroslow Soukup, 1979). En excavaciones realizadas en la Huaca Prieta del Valle de Chicaza se encontraron restos arqueológicos de achira

pertenecientes al período temprano pre-cerámico (Gade, 1966). También en el centro ceremonial y ritual de la cultura Nazca de Cahuachi (se halla aproximadamente a 30 Km al Sudeste de la actual ciudad de Nazca), se encontró representación de rizomas de achira en su cerámica (Piacenza, 1993). Por todas estas evidencias arqueológicas, lingüísticas, culturales y de la variabilidad genética existente podría decirse que Sudamérica es centro de origen de la achira (Vavilov, 1951).

La achira jugó un rol importante en la agricultura prehispánica, su cultivo fue intensivo y se distribuyó desde Venezuela hasta el Norte de Chile, en los valles sub-tropicales de los Andes y en el Amazonas (Gade, 1966). Es conocida desde tiempos muy remotos por los antiguos peruanos con los nombres de achira o *sumaj achira*, cultivada en gran escala en tiempos de los incas, donde se le dio diferentes usos en la alimentación, medicina y en sus rituales religiosos.

Seminario y Ruiz (1999) señalan que la achira es de origen sudamericano, hallazgos arqueológicos en el Perú demuestran que su cultivo data de 2.500 años a.C. (Gade, 1966). Los incas la cultivaron hace once siglos.

Actualmente, la achira es conocida y se cultiva en Quenstand, Australia y Vietnam. En este último donde se estima se cultiva de 20.000

a 30.000 Ha, hay una gran demanda en almidón de achira, el cual es utilizado en la fabricación de fideos transparentes, muy populares en el sudeste de Asia. Estos fideos son 100% almidón gelatinizado de achira con alto contenido de amilasa y con alta viscosidad a temperaturas empleadas para elaborar pastas, lo que permite una mayor facilidad de manipular geles calientes en comparación con otros almidones (Hermann, 1994).

14.3. TAXONOMÍA

Según Montaldo (1967), la achira pertenece a la familia Zingiberacea. Sin embargo, la mayoría de los autores (Barret, 1930; Gutiérrez, 1953; Pérez, 1947; Standley, 1937; y Valverde, 1966), presentan la siguiente clasificación:

| | |
|----------|---------------------|
| Reino | Vegetal |
| Subreino | Fanerógamas |
| División | Angiospermae |
| Clase | Monocotiledóneas |
| Orden | Scitaminales |
| Familia | Cannaceae |
| Género | <i>Canna</i> |
| Especie | <i>Canna edulis</i> |

Según Standley (1937), esta familia se caracteriza por presentar un solo género, el cual es muy abundante en especies (Gade, 1966), en América Tropical y con pocas especies en África, Asia y Europa.

Seminario y Ruiz (1999), corroboran que taxonómicamente la achira pertenece al orden de las *Escitamineas*, familia *Cannaceae*, en la cual se han descrito más de 100 especies. Las *Cannas* son cultivadas como flores predilectas de jardín y algunas especies como la *Canna edulis* para la obtención de almidón.

14.4. MORFOLOGÍA

León (1987) describe la Achira como una planta monocotiledonea, de porte herbáceo y

que se propaga vegetativamente. Existe cierta confusión en la denominación de los tallos subterráneos, mientras unos autores les denominan rizomas (Montalvo, 1991; Leiva, 1964), otros los reconocen como cormos (León, 1972).

Seminario y Ruiz (1999), indican que la achira presenta las siguientes características generales: rizomas abundantes, esféricos, cilíndricos o en forma de trompos, miden de 5 a 20 cm de largo por 3 a 12 cm de ancho. En su superficie presentan surcos transversales que marcan la base de las escamas que los cubren; de la parte inferior del rizoma salen generalmente las raicillas blancas y cilíndricas, y del ápice el pseudo tallo, las hojas y el vástago floral. Los tallos son de 0.40 a 2.5 metros de altura, están cubiertos por las vainas envolventes de las hojas; los pecíolos son generalmente oblongos, ovales, oblongo elípticos de 0 a 70 cm de largo y de 5 a 30 cm de ancho. Las flores tienen racimos laxos, simples o bifurcados de color amarillo, rojo; son rojas por dentro y por fuera anaranjadas, son zigomorfas y con dos brácteas en la base; el cáliz tiene tres sépalos, la corola tres pétalos de color intenso, los estambres son petaloides de un color rojo vistoso, uno de ellos lleva las anteras funcionales y otro forma el labelo. Los frutos son cápsulas de tres celdas con gran cantidad de semillas esféricas de color negro y muy duras.

14.5. ECOLOGÍA DE LA ACHIRA

La achira se cultiva principalmente en los valles cálidos desde los 1.000 hasta los 2.900 msnm (Arbizu, 1994). Esta altitud comprende valles interandinos y valles hacia la costa, con diferentes tipos de suelo desde los más fértiles (Valles interandinos de Santa, Urubamba, Tarma, etc.) hasta los suelos susceptibles a la erosión y pérdida de fertilidad a lo largo de la costa. La achira se cultiva en menor intensidad en los valles cálidos de los andes desde el centro al sur del Perú en las zonas bajas de Puquio del departamento de Ayacucho; en

Coris, departamento de Huancavelica; en Sandía Puno; en Marcapata y Quispicanchis, departamento de Cuzco.

Según su hábito de cultivo, es un monocultivo en la región de Pauza, mientras que en las demás zonas se cultiva en asociación con otros cultivos como: cebolla, orégano, hinojo, ruda, culantro, col, arracacha, camote, yacón, caña de azúcar (Arbizu, 1964). En la región de Pauza se cultivan tipos blancos, verdes y morados claro.

14.6. USOS DE LA ACHIRA

El almidón de la achira constituye una gran fuente de materias primas para las más variadas industrias, las cuales van desde los pegamentos hasta el área de los alimentos. Según Arbizu (1994) la achira se utiliza principalmente para la producción de almidón industrial y para la preparación de mazamorras, panes, bizcochos, galletas. Las raíces de la Achira se comen asadas o cocidas. De sus rizomas o cormos se obtiene la harina "almidón" con la que se preparan galletas, panecillos y dulces, pues contiene 4% de azúcar. Del almidón se prepara un budín que se usa como alimento para bebés y personas convalecientes. Los tallos tiernos son comestibles y los rizomas pueden utilizarse como alimento del ganado.

En la industria farmacéutica se utiliza como relleno en la elaboración de drogas en pastillas, que sirven para la tos seca, infecciones de la piel, cefaleas, reumatismos, úlceras (Dancé, 2001).

En la industria textil se usa para almidonar prendas y lograr que luzcan de mejor apariencia y para lograr adhesión en las fibras que constituyen las telas (Seminario, 1999).

En la actualidad, la Comunidad Económica Europea ha centrado su atención en el uso de pegamentos naturales derivados especialmente de plantas. El almidón de achira gracias a

sus propiedades, es una alternativa que se ha venido explotando dentro de estas industrias, debido a que no presenta toxicidad y no es obstáculo en el reciclaje del papel. Además, da mejores acabados al papel (Seminario, 2004). Las semillas se usan para la elaboración de rosarios y collares. Por la belleza de sus flores la mayoría son ornamentales.

La parte aérea de la achira y el bagazo resultante de la extracción de almidón, no sólo constituyen importantes fuentes de materia orgánica para el suelo, sino que también son utilizados como forraje, los mismos que son preferidos por cabras y cerdos (Dancé, 2001).

14.7. CULTIVO *IN VITRO* DE ACHIRA

Los primeros trabajos de cultivo *in vitro* en Achira fueron realizados en Ecuador en la Estación Experimental de Quito, se utilizaron yemas axilares o apicales, el tamaño del explante es de 4-8 mm; la desinfección que mejor resultado dio fue un enjuague con etanol al 75% por 30 segundos, lejía 25% + Twen 20 por 15 minutos y lavados sucesivos con agua destilada estéril, los explantes fueron implantados en medio de cultivo MS 1/2 + 3% de sucrosa + 0,4% Agar, con 4 ppm BAP + 0,5 ppm ANA y pH 5,7; los explantes dieron 1,03 brotes y su tamaño promedio de 10,22 mm con un sistema radicular bien desarrollado en un período de 10 semanas (Landázuri, 1996). En el Instituto de Biotecnología de la UNALM se utilizan como explantes ápices meristemáticos de hijuelos jóvenes de plantas madres de Achira.

La predesinfección de los explantes consiste en trasladar los hijuelos más jóvenes, previamente seleccionados, al laboratorio para su introducción *in vitro*, donde se procede al corte de hojas y raíz inutilizables, sometidos a un lavado general con un detergente líquido al 1%, se enjuaga en agua destilada y luego se procede a reducir los explantes a 5 cm de longitud.

14.8. DESINFECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LOS EXPLANTES

Una vez realizada la pre-desinfección, los hijuelos se sumergen en alcohol al 70% por 30 segundos, se realizan dos enjuagues con agua destilada estéril y se sumergen los explantes en NaOCl (0,5% por 10 minutos) +

Twen 20 (3 gotas). Inmediatamente se procede a enjuagar en tres oportunidades con agua destilada esterilizada. Posteriormente se reducen los explantes a un tamaño aproximado de 0,5 cm, se sumergen en una solución antioxidante de ácido cítrico a 0,25 gr/100 ml de agua durante 5 minutos y se los siembra en el medio de cultivo.



Figura 1. Explantes de achira 30 días después del establecimiento

El medio de cultivo para la fase de inicio, multiplicación y enraizamiento utilizado en el

Laboratorio de Biotecnología de la FCAPFyV de la UMSS es el siguiente:

Cuadro 1. Multiplicación o proliferación de brotes laterales

| Medio de cultivo | Fase de inicio | Multiplicación | Enraizamiento |
|------------------|----------------|----------------|---------------|
| Sales MS | Completo | Completo | Completo |
| ANA | - | - | 0,1 mg/l |
| BAP | - | 1 mg/l | - |
| Sacarosa | 20 g/l | 20 g/l | 0,2 g/l |
| Agar | 4,5 g/l | 4,5 g/l | |

Luego de la fase de establecimiento, los explantes son transferidos al medio de multiplicación, el cual tiene una mayor concentración de citoquininas para de esta manera estimular la formación y multiplicación de brotes. El período de formación de brotes es de 30 días aproximadamente.

El período de multiplicación desde el inicio hasta el enraizamiento puede durar 10 semanas. Las condiciones de incubación adecuadas son de 22 a 29° C, con una intensidad de luz de 2.000 a 3.000 lux y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

La emisión de raíces generalmente no requiere la adición de auxinas, habiéndose observado la presencia de éstas directamente en los frascos en la fase de multiplicación.



Figura 2. Proliferación de brotes en achira

14.9. ACLIMATACIÓN

La fase de aclimatación se desarrolla en invernadero, es posible someter a las plantas a un proceso de endurecimiento previo abriendo los frascos ligeramente tres a cuatro días antes de la aclimatación.

El sustrato que se utiliza debe ser previamente desinfectado, las plantas en esta fase son muy susceptibles a deshidratarse, por lo que se recomienda regar con una solución fungicida inmediatamente después del trasplante y cubrir el conjunto con un plástico transparente.

Una vez finalizado el trasplante a condiciones de invernadero, se debe cubrir las bandejas con un material que garantice una alta humedad interna y permita un porcentaje de luminosidad del 50%. El tiempo que las plantas deben permanecer en invernadero es de 30 días, luego, las plantas están listas para ser transplantadas a campo.

Una alternativa interesante que favorece el proceso de aclimatación, es efectuar una última multiplicación en frascos conteniendo sustrato inerte embebido en el medio de cultivo, de esa manera se favorece a un mejor endure-

cimiento de las plántulas. Similares técnicas han sido utilizadas exitosamente en la aclimatación de banano (Aguirre, comunicación personal).

14.10. CONSERVACIÓN POR CRECIMIENTO MÍNIMO

En experiencias preliminares en el Laboratorio de Biotecnología de la FCAPFyV, se utilizaron brotes de plántulas de achira provenientes de la fase de multiplicación, con la finalidad de minimizar el crecimiento y desarrollo fisiológico normal en condiciones *in vitro*. La intensidad luminosa evaluada fue de 1.000 a 1.500 lux; a una temperatura de 21° C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. En estas pruebas, sometiendo a los explantes a temperaturas de 8° C, se observó un total necrosamiento en los explantes evaluados.

El medio de conservación utilizado fue el MS al 50% de concentración, con diferentes niveles de sorbitol (20, 40, y 60 gr/l) y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento.

Las diferentes pruebas han permitido generar información valiosa para poder conservar a mediano plazo colecciones *in vitro* de esta raíz andina.

14.11. BIBLIOGRAFÍA

- Arbizú C. 1994. Agroecología de la achira en el Perú. Vol. 20 N° 3. Centro Internacional de la Papa, pp. 13.
- Cárdenas, M. 1969. Manual de plantas económicas de Cochabamba Bolivia. Imprenta Icthus, pp. 421.
- Dance E. 2006. Efecto de los reguladores de crecimiento (ANA, BAP y GA3) en la micropropagación de *Canna edulis* "Achira". Tesis. Lima, Perú, pp. 15-20.
- Gade D. W. 1966. Achira. The Edible Canna. Lts Cultivation and Use in the Peruvian Andes. Economic Botany N° 20 (4); 1966, pp. 407-415. New York. EE.UU.
- Gutierrez, V. 1953. Botánica taxonómica. Generalidades y angiospermae vol. XIV. No. 44, pp. 293.

- Landazuri P. 1996. Introducción *in Vitro*, micropropagación, conservación y aclimatación de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*) y achira (*Canna edulis* Ker). Tesis previa a la obtención del título de licenciado en ciencias biológicas. Universidad Católica de Quito. Ecuador, pp. 116.
- León J. 1987. Botánica de los Cultivos Tropicales IICA. Costa Rica, pp. 103-105.
- Montaldo, A. 1967. Bibliografía de raíces y tubérculos tropicales Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay. Alcance No. 13.
- Montalvo, A. 1991. Cultivo de Raíces y Tubérculos Tropicales IICA. San José de Costa Rica, pp. 323-325.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A recived médium for rapad growth and bioassays with tabaco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473 – 497.
- Palomino D. R. 2006. Caracterización morfológica y recuento cromosómico en Achira *Canna edulis* del Perú. Tesis UNALM. Lima, Perú, pp. 5-16.
- Pérez, A. 1947. Plantas útiles de Colombia. Imp.n.c. Bogotá Colombia, pp. 537.
- Piacenza L. 1993. Ofrendas agrícolas de Cahuachi. Tema presentado al "I Congreso Italo Peruano de Etnomedicina Andina del 27-30 Octubre 1993. Publicado en el diario El Comercio sección D-6 (Noviembre de 1993).
- Seminario J.; B.J. Ruiz. 1999. Recursos genéticos de raíces andinas: I Exploración para Chago, Yacón, Achira y Arracacha en el norte del Perú. En: Raíces y Tubérculos Andinos. Avances de Investigación I. Fairlie, Tommy, Morales, Bermúdez, Marciano, Holle, Miguel. CIP. Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina.
- Seminario, J. 2004. Raíces Andinas: Contribuciones al Conocimiento y a la Capacitación. Serie: Conservación y uso de la Biodiversidad de Raíces y Tubérculos Andinos.
- Vavilov N.I. 1951. The Origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Selected writing translated from the Russian by K. Stan Chester. New York. Ronald Press. C., pp. 364.

Capítulo 15

Cultivo *in vitro* de Pasifloras

Teresa Ávila, Sara de la Barra, Nidia Coca, Noemí Aguilar & Janett Céspedes

15.1. INTRODUCCIÓN

El género *Passiflora* de la familia *Passifloraceae*, contiene más de 400 especies distribuidas en el continente americano. En Bolivia se han encontrado alrededor de 60 especies (Vásquez, 1998). A pesar de que muchas de estas especies son permanentemente utilizadas en el ámbito local, ninguna ha sido sometida a mejoramiento. Estas plantas poseen una diversidad genética única y características de rusticidad como resistencia o tolerancia a condiciones adversas de clima, suelo, enfermedades y plagas. Los frutos son consumidos localmente como frutas, bebidas y en postres (Guzmán, 1999) y poseen un importante uso potencial que podría ser ampliado por la utilización de material élite o mejorado genéticamente.

El Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani (CIFP), posee una colección de pasifloras de fruto comestible pertenecientes a las especies: *Passiflora mollissima*, *P. tarminiana* (ambas tumbo) y *P. ligularis* (granadilla), además de muestras de las especies silvestres: *P. pinnatistipula*, *P. umbillicata*, *P. amethystina*, *P. naviculata*, *P. mandonii*, *P. morifolia*, *P. quadrangularis* y *P. caerulea*.

Estas muestras se conservaron primeramente en forma de semillas en el banco de germo-

plasma del CIFP en una cámara a 0°C y aquellas que lograron aclimatarse a las condiciones de Pairumani, fueron también conservadas en campo. Debido a que algunas especies del género *Passiflora* muestran dificultad de germinación cuando son desecadas (Guzzo *et al.*, 2003) y conservadas, se propuso la conservación *in vitro* como alternativa para mantener la colección de germoplasma.

Dada la amplia distribución geográfica de las accesiones y el poco conocimiento de la variabilidad genética en este grupo de plantas, esta colección ha sido evaluada mediante marcadores moleculares RAPD e ISSR. Entre accesiones de la misma especie se mostró bajo nivel de polimorfismo, sin embargo se encontró un alto nivel de polimorfismo entre especies. Estos resultados permitirán trazar estrategias de conservación y utilización de estos recursos, así como planificar nuevas colectas (Guevara *et al.*, 2007).

El cultivo de tejidos vegetales permite la conservación de material en condiciones *in vitro* como una alternativa útil de conservación *ex situ* para aquellas especies de semillas recalcitrantes o intermedias y de reproducción vegetativa. Se la puede utilizar como un sustituto y/o como complemento de la conservación en campo, ya que ofrece mayor seguridad y fácil acceso e intercambio del germoplasma (Withers, 1993). Algunas limitaciones que

restringen el acceso a este tipo de metodologías son el nivel tecnológico, el costo y la necesidad del desarrollo de protocolos particulares para cada especie e incluso para variedades dentro de una misma especie (Van der Hurk, 1999).

Como resultado de las investigaciones realizadas en el CIFP se proponen los siguientes protocolos para el establecimiento, multiplicación, conservación *in vitro* y crioconservación de passifloras.

15.2. ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*

Las pasifloras son establecidas a partir de embriones (Figura 1). Las semillas son desinfectadas de acuerdo a la siguiente metodología de trabajo (Ávila *et al.* 2004a; Avila *et al.* 2004b; Avila *et al.* 2004d):

Remojar las semillas en el insecticida-acaricida Vertimax (1ml/litro de agua) durante 15 minutos, seguido de cinco enjuagues con agua destilada.

En la cámara de flujo laminar, sumergir las semillas en hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos, luego proceder a enjuagarlas cinco veces durante 3 minutos con agua destilada esterilizada.

Luego de la desinfección, las semillas se remojan en agua estéril por 24 horas y posteriormente se extrae el embrión y se lo coloca en el medio de cultivo.

El cultivo de embriones permite un mayor porcentaje de germinación (41%) comparado con el 13% de las semillas, además de acortar el periodo necesario para la germinación, de más de cinco meses en la semilla a una semana con los embriones. Se estudió también la escarificación de las semillas, con la que no se obtuvieron buenos resultados.

El medio de cultivo optimizado para el establecimiento *in vitro* de las pasifloras tiene la siguiente composición (por litro): sales mine-

rales Murashigue y Skoog (MS) diluidas a la mitad de la concentración, vitaminas Gamborg, 5 g de carbón activo, 200 mg de caseína hidrolizada, 1 mg de GA₃, 20 g de sacarosa y 2 g de phytigel. Los medios de cultivo que contienen sales minerales enteras no dan lugar a plantas germinadas, solamente los medios con sales diluidas a la mitad de la concentración dan lugar a plantas germinadas, sin embargo el medio que contiene carbón activo permite además el desarrollo de las mismas.

Se observa también una influencia de la especie en el establecimiento *in vitro*, los embriones de tumbo (*P. mollissima*) germinan a partir de la primera semana, pero los embriones de granadilla (*P. ligularis*) germinan a partir de la quinta semana de puestos en cultivo.



Figura 1. Establecimiento *in vitro* de la colección

15.3. MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*-MICROPROPAGACIÓN

Se optimizaron medios para las diferentes especies (Avila *et al.* 2004a; Avila *et al.* 2004b; Avila *et al.* 2004c; Avila *et al.* 2004d), que permitan obtener una adecuada brotación de la yema y desarrollo y enraizamiento de la plántula (Figura 1).

Los medios de cultivo tienen como base: sales minerales de MS, vitaminas de Gamborg, 20 g de sacarosa, 200 mg de caseína hidrolizada

y 7 g de agar. En el cuadro 1 se observan los otros componentes de los medios y en el cuadro 2 se observan los medios optimizados para cada especie.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo para micropropagación

| Compuesto | Medio 1 | Medio 2 | Medio 3 | Medio 4 | Medio 5 |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Carbón activo | 2 g | 2 g | - | - | 2 g |
| GA3 | - | 0,5 mg | - | 0,5 mg | 0,5 mg |
| NAA | - | - | - | - | 0,5 mg |

Cuadro 2. Medios de cultivo por especie

| Especie | Medio |
|--------------------------|----------|
| <i>P. mollissima</i> | 1, 2 |
| <i>P. amethystina</i> | 1, 3 |
| <i>P. pinnatistipula</i> | 2 |
| <i>P. naviculata</i> | 3 |
| <i>P. tarminiana</i> | 1, 2 |
| <i>P. ligularis</i> | 5 |
| <i>P. morifolia</i> | 1,2 |
| <i>P. quadrangularis</i> | 1, 2 |
| <i>P. tricuspis</i> | 1, 2 |
| <i>P. caerulea</i> | 1, 3 , 4 |

La especie *P. ligularis* muestra problemas durante la micropropagación, las plantas presentan poco desarrollo, tienen pocas yemas y además pierden las hojas, estas presentan una mejor respuesta con el medio de cultivo propuesto por Quoirin & Lepoivre (1977) más la adición de sulfato ferroso.



Figura 1. Multiplicación de pasifloras

15.4. ACLIMATACIÓN DE LAS PLÁNTULAS

Las plantas son aclimatadas en laboratorio e invernadero para su posterior trasplante al campo. De acuerdo con las investigaciones realizadas para probar diferentes metodolo-

gías con el fin de evitar que las plántulas se deshidraten y se contaminen con hongos del ambiente, se propone la siguiente metodología de aclimatación (CIFP, 2006; CIFP, 2007).

Uso de envases de plástico con tapa, tierra esterilizada en autoclave, riego con agua

estéril y asperjado periódico con Benlate al 0,1%. Los envases deben destaparse para evitar el desarrollo de hongos, a partir del segundo día y por periodos que van incrementándose a partir de cinco minutos.

Las plantas son mantenidas por 15-30 días en estas condiciones (Figuras 2 y 3) y luego destapadas en condiciones de laboratorio por otros 7 días, para luego ser llevadas al invernadero.



Figuras 2 y 3. Acclimatación en laboratorio

15.5. CONSERVACIÓN *IN VITRO*

Se ha estudiado el efecto del sorbitol y el manitol en distintas concentraciones, sobre el crecimiento de los explantes y la viabilidad de los mismos, durante y luego del proceso de conservación por nueve meses (Avila *et al* 2004c; CIFP 2007; CIFP 2008; Coca *et al.*, 2005 y Coca *et al.*, 2007).

El medio más adecuado para la conservación de las especies: *P. mollissima*, *P. morifolia*, *P. pinnatistipula* y *P. tarminiana* es el que contiene por litro: sales minerales MS, vitaminas

Gamborg, 200 mg de caseína hidrolizada, 2 g de carbón activo, 20 g de sacarosa y entre 10 a 20 g de sorbitol, de acuerdo a la especie. Se utiliza la misma concentración de reguladores de crecimiento que para la multiplicación de acuerdo a cada especie. Este medio permite retardar el crecimiento de las plantas, las cuales presentan entrenudos cortos y yemas numerosas (Figura 4). Al final de los nueve meses, las yemas son viables en un medio de multiplicación. El medio que contiene una combinación de sorbitol y manitol no muestra buenos resultados.



Figura 4. Conservación *in vitro*

15.6. CRIOCONSERVACIÓN

Se ha desarrollado protocolos de crioconservación de pasifloras a partir de semillas y de ápices utilizando diferentes metodologías, con la finalidad de minimizar las manipulaciones que se realizan para la conservación *in vitro*. Los protocolos optimizados se presentan a continuación (Aguilar *et al.* 2007a y Aguilar *et al.* 2007b):

15.6.1. Crioconservación de semillas

Se determinó que el contenido óptimo de humedad de las semillas debe ser de alrededor del 5%, para que estas no sufran daños durante su exposición al nitrógeno líquido. Las semillas son deshidratadas utilizando silicagel en el interior de recipientes de plástico con cierre hermético, para posteriormente ser introducidas, dentro de crioviales, al nitrógeno líquido.

Para el descongelamiento, los crioviales se dejan a temperatura ambiente por tres horas y luego las semillas se colocan en el interior de envases de plástico con cierre hermético, con una atmósfera saturada de vapor de agua durante 24 horas. Posteriormente se sumergen en agua con 500 ppm de ácido giberélico (GA_3) durante 48 horas para proseguir con el cultivo de embriones.

Las semillas que no son deshidratadas sufren daños durante la exposición al nitrógeno líquido, en las especies *P. mollissima* y *P. tarminiana* no se obtienen embriones germinados luego de la crioconservación cuando estos no son deshidratados. *P. pinnatistipula* presenta un contenido de humedad inicial más bajo, lo que permite que algunos embriones de esta especie germinen luego de la crioconservación. Todas las plantas desarrolladas a partir de embriones obtenidos de las semillas crioconservadas, muestran morfología y crecimiento normal (Figura 5).



Figura 5. Plantas desarrolladas a partir de semillas crioconservadas:
A) *P. mollissima*, B) *P. tarminiana*, C) *P. pinnatistipula*

15.6.2. Crioconservación de ápices por vitrificación

La crioconservación de ápices se realiza utilizando plantas provenientes de micropropagación. Los ápices (1 a 1,5 mm) son precultivados en un medio de multiplicación adicionado con 0,3 M de sacarosa.

Los ápices se introducen en el crioval conteniendo un medio líquido adicionado con 2 M de glicerol y 0,4 M de sacarosa, durante 20 minutos. Los ápices son sumergidos en un medio líquido conteniendo 24% v/v de glicerol, 13,5% v/v de etilenglicol, 13,6% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 0,4 M de sacarosa, durante 150 minutos para posteriormente ser introducidos al nitrógeno líquido.

Después de la crioconservación, el descongelamiento se realiza sumergiendo los crioviales en agua destilada estéril a 40° C por 2 – 3 minutos y lavados en una solución con 1,2 M de sacarosa. Los ápices son entonces cultivados en un medio que contiene: sales minerales MS 1/2, vitaminas Gamborg, 2 g de carbón activo, 200 mg de caseína hidrolizada y 1,5 mg de GA₃ y 20 g de sacarosa. Los ápices deben incubarse a 25° C, los primeros 10 días en oscuridad y posteriormente a 600 -700 lux, con un fotoperiodo de 16 horas luz. En estas condiciones, los ápices dan lugar a plantas normales (Figura 6).

15.7. CRIOCONSERVACIÓN DE ÁPICES POR ENCAPSULACIÓN-DESECACIÓN

Se encapsulan los ápices en cuentas de alginato al 3% y éstos son desecados en el flujo laminar. Estos ápices luego de su exposición al nitrógeno líquido, no presentan germinación, sin embargo se mantienen vivos y mostrando color verde hasta 30 días de cultivo (Figura 7).



Figura 6. Ápices luego de ser crioconservados, a los 30 días de cultivo:
A) *P. mollissima* B) *P. tarminiana*



Figura 7. Ápices encapsulados de *P. mollissima* después de 30 días de cultivo:
A) Sin exposición al nitrógeno líquido B) Con exposición al nitrógeno líquido

15.8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar N., Avila T. & Gonzales E. (a). 2007. Crioconservación de tres especies de pasifloras de valles interandinos bolivianos. Reunión Latinoamericana y del Caribe de Biotecnología, Chile.
- Aguilar, N., Avila, T. y Gonzales E. (b). 2007. Crioconservación de tres especies de pasifloras de valles interandinos. Memorias de la V Reunión Nacional de Biotecnología, La Paz.
- Avila, T., De la Barra, S. y Guzmán, L. (a). 2004. Establecimiento y multiplicación de especies de altura del género *Passiflora*. Memorias de la IV Reunión Nacional de Biotecnología y I Reunión Nacional de Bioseguridad, Santa Cruz.
- Avila, T., Coca N. y Guzmán, L. (b). 2004. La conservación *in vitro* como una alternativa para las pasifloras andinas. Memorias de la IV Reunión Nacional de Biotecnología y I Reunión Nacional de Bioseguridad, Santa Cruz.
- Avila, T., De la Barra, S. y Guzmán, L. (c). 2004. Conservación *in vitro* de pasifloras de altura. Memorias del V Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola, editado en CD interactivo, República Dominicana.
- Avila T., De la Barra, S. y Guzmán, L. (d). 2004. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de la colección de pasifloras de altura". Memorias del XI Congreso Internacional de Cultivos Andinos, Cochabamba.
- CIFP. Informe anual de actividades 2008. Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, Sección Biotecnología.
- CIFP. Informe anual de actividades 2007. Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, Sección Biotecnología.
- CIFP. Informe anual de actividades 2006. Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, Sección Biotecnología.
- Coca N., Avila, T., y Guzmán, L. 2007. Efecto del sorbitol y el manitol sobre los explantes de pasifloras andinas en conservación *in vitro*. Memorias de la V Reunión Nacional de Biotecnología, La Paz.
- Coca N., Avila, T., y Guzmán, L. 2005. Conservación *in vitro* de pasifloras andinas. Memorias del V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, Uruguay.
- Guevara, N., Coca, N. y Avila T. 2007. Caracterización molecular de la diversidad genética de la colección de pasifloras andinas conservadas en Pairumani. Reunión Latinoamericana y del Caribe de Biotecnología, Chile.
- Guzmán, L. 1999. Colecta de Pasifloras en Bolivia. Memorias de la 2da. Reunión Boliviana sobre Recursos Fitogenéticos de Cultivos Nativos. Editado por la Fundación PROINPA. Cochabamba.
- Guzzo, F., Ceoldo, S. Andreetta, F., Marconi, A.M., y Levi, M. 2003. Strategies for the identification of bioactive molecules in *Passiflora* ssp. Proceedings of the XLVII Italian Society of Agricultural Genetics - SIGA Annual Congress, Italia.
- Van der Hurk, A. 1999. Complementariedad entre la conservación *ex situ* y la *in situ*. Memorias de la 2da Reunión Boliviana sobre Recursos Fitogenéticos de Cultivos Nativos. Editado por la Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia.
- Vásquez, R. 1998. Las especies de *Passiflora* subgénero Granadilla serie *Laurifoliae* (*Passifloraceae*) en Bolivia. Revista de la Sociedad Boliviana de Botánica 2(1): 36-45.
- Withers, L.A. 1993. New technologies for the conservation of plant genetic resources. International Crop Science. Crop Science Society of America. Madison, USA.

Capítulo 16

El cultivo *in vitro* en chilto (*Physalis peruviana*)

Katty Rojas, Gino Aguirre & Ximena Cadima

16.1. INTRODUCCIÓN

Physalis peruviana, conocida como *chilto*, *uchuwa*, *chilto chilto* o *capuli*, es una especie oriunda de la región andina. Se encuentra en las estribaciones occidentales de la cordillera de los Andes, desde Venezuela hasta Chile, incluyendo el Perú, entre los 600 y 2.000 msnm. Esta especie es muy importante por los usos fito terapéuticos que tiene (diurético, antipirético, vermífugo y antiespasmódico). También es utilizada en la alimentación debido a que los frutos de esta especie son consumidos por el ser humano; se pueden comer directamente o en forma de dulce, también se elaboran mermeladas por lo que presenta una interesante oferta comercial. La uchuwa o chilto chilto puede ser una planta de cobertura, protegiendo terrenos de la erosión, tiene un crecimiento vigoroso, extensión rápida en el suelo y fuerte sistema radical.

En la región andina es un cultivo de consumo interno y de exportación principalmente en Colombia, Ecuador y Perú. En Bolivia pese a compartir su centro de origen, crece espontáneamente en los valles interandinos y mesotérmicos sin que se haya cultivado, su aprovechamiento es mínimo, sin embargo al presentar características potencialmente favorables e interesantes, se hace necesario rescatar y promocionar su uso.

El cultivo *in vitro* de tejidos aplicado al chilto es una alternativa interesante para la conservación y el intercambio de germoplasma; convirtiéndose en una técnica para la conservación de valiosos genotipos, y evitando así, la pérdida de material debido a peligros ambientales como plagas, enfermedades, factores climáticos adversos, y a errores humanos. Por todas estas razones se vió por conveniente aprovechar las ventajas que ofrece el cultivo de tejidos *in vitro* para su multiplicación y conservación *in vitro*, como parte de un trabajo de fin de estudios en la Especialidad de Recursos Fitogenéticos.

16.2. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA Y MORFOLÓGICA DE CHILTO *PHYSALIS PERUVIANA*

La uchuwa o chilto pertenece a la familia *Solanaceae*, género *Physalis*. El género *Physalis* incluye más de 100 especies herbáceas entre perennes y anuales (Flores *et al.*, 2000). La más utilizada es la especie *Physalis peruviana* Linneo por su fruto con alto contenido de azúcares. Otras especies como *P. angulata* y *P. mínima* son usualmente utilizadas como comestibles en el sureste de Asia (Bernal & Correa, 1998).

La especie *P. peruviana* L., que fue descrita por Linneo de la América Tropical, se

encuentra en los Andes, desde Colombia hasta Chile (Cárdenas, 1989), incluyendo obviamente Bolivia. Es una planta herbácea de un metro de alto (Figura 1a), muy velluda que prefiere los rastrojos y lugares más o menos sombreados. Sus hojas son alternas, muy pecioladas, peludas, ovadas, de base obtusa o truncada, ápice acuminado; los bordes son enteros, crenados en parte; 2-7 cm de largo, 1,5-5,5 cm de ancho (Romero & Castañeda, 1991).

Según Cárdenas, 1989, es una planta baja de menos de 1 m de talla, de hojas cordiformes y pubescentes (Figura 1b). Las flores miden algo más de 1 cm. de diámetro, amarillas con manchas oscuras en la base de la corola y bayas lisas, esféricas amarillo verdosas de

más o menos 1 cm de diámetro (Cárdenas, 1989). El peciolo alcanza hasta 2,5 cm de longitud. El cáliz es verde, vellosos, venas moradas salientes; la porción soldada tiene forma cilíndrica y la libre es triangular (Figura 1c).

La corola está íntegramente soldada, amarilla, de cinco puntos morados en el fondo, glabra por dentro, una línea de pelos por fuera y ciciolados los bordes. Tiene anteras oblongas, polen amarillo, y su ovario empotrado en un disco (Popenoe *et al.*, 1989).

El fruto es una baya carnosa, globosa u ovoide y posee una piel acre resinosa (Figura 1d), aproximadamente 2 cm de diámetro de olor agradable; pulpa jugosa, de buen sabor que contiene numerosas semillas pequeñas, esta



a



b



c



d

Figura 1. Planta de *P. peruviana*. a) frutos tiernos, b) hojas y flores, c) Flor, y d) fruto maduro

encerrado en el cáliz acrescente que tiene forma de vejiga y es globoso (Romero y Castañeda, 1991). Los frutos del chilto están rodeados del cáliz muy desarrollado y membranoso que los cubre por entero, quedando un espacio apreciable entre estos (Cárdenas, 1989). *P. peruviana* presenta como fruto una especie de bolsa que ha originado el nombre de “motojobobo embolsado” que se da a esa planta en Santa Cruz de la Sierra – Bolivia (Cárdenas, 1989).

16.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE *P. PERUVIANA*

P. peruviana es una hierba ruderal común en climas fríos (Pérez & Arbeláez, 1975). En Bolivia crece espontáneamente en los valles mesotérmicos sin que se haya cultivado nunca (Cárdenas, 1989 citado por Bernal y Correa, 1998). *P. peruviana* es una especie que crece en los Yungas en la región de Coroico a 1.700 msnm (Girault, 1987), también se ha reportado su presencia en Cochabamba, en los valles de Independencia y Morochata, conocida con el nombre de *chilto chilto*.

De Luca (2004) presenta nombres comunes conocidos en el territorio boliviano: Camamabú, Motojobobo embolsado (Santa Cruz), Chilto (La Paz); Iva vau (Yuqui), Shubsi (Yuracaré), Maigochi (Chácobo); Yahua jababa (Cavineño); Chajiki (Ignaciano); Muchii (Trinitario); Notimorr (Chiquitano).

16.4. USO E IMPORTANCIA ECONÓMICA DE *P. PERUVIANA*

P. peruviana puede ser consumida cruda y muy rara vez en la confección de dulces. Excepcionalmente aparece en el mercado de frutas para la fiesta de Corpus Christi (Cárdenas, 1989). El fruto se usa mucho para hacer dulce con almíbar, es rica en vitamina C. El valor de este cultivo radica en sus aptitudes medicinales; purifica la sangre y elimina la albúmina de los riñones. También se ha señalado que

reconstruye y fortifica el nervio óptico, es una medicina eficaz en el tratamiento de las afecciones de la garganta. Es calcificador de primer orden y pueden consumirlo los diabéticos.

Empleando frutos de *P. peruviana* y el cocimiento de las hojas como diurético y antiasmático; es útil para la depresión nerviosa y para curar la tuberculosis. Los frutos son comestibles y de sabor agradable, contienen un aceite, por lo que son utilizados como vermífugo, y en forma de infusión son utilizados contra la tosferina de los niños (Bernal & Correa, 1998). El fruto de *P. peruviana* es una fuente excelente de pro vitamina A (3.000 U. I. de caroteno por 100 g.), vitamina C y además contiene complejo B (tiamina, niacina y vitamina B 12). La proteína y los volúmenes de fósforos son excepcionalmente altos para una fruta, pero los niveles del calcio son bajos (Popenoe *et al.*, 1989).

La infusión de ocho frutos maduros y machacados de capulí en un frasco conteniendo 1 litro de agua hirviendo, detiene la diarrea, fortifica el estómago, expulsa gases, tonifica los nervios y calma los latidos del corazón. Reduce la inflamación de la vejiga, hígado, testículos, alivia la inflamación de los riñones y las vías urinarias, elimina el ácido úrico y cura el reumatismo (De Luca, 2004).

Es una planta que sirve como pionera para campos recientemente creados y todavía sin vegetación y con robustez, habilidad de adaptación y predestinada para áreas marginales. Es una planta que se puede sembrar en asociación con más cultivos que se adapten a sus condiciones de temperatura y latitudinales, como tubérculos, maíz, fréjol entre otros (Flores *et al.*, 2000).

16.5. PROPAGACIÓN

16.5.1. Reproducción Sexual

El método más utilizado para propagar tradicionalmente el capulí o chilto es por vía sexual o por semilla. Este tipo de propagación puede

proporcionar plantas con mejor anclaje, más vigorosas, con raíces más fuertes que resisten mejor las condiciones adversas del suelo pero la heterogeneidad del material es muy amplia, tanto genotípica como fenotípicamente, llegando esto último a alterar la producción y la uniformidad deseada en frutos de exportación. Sin embargo, para que la propagación sexual por semilla tenga éxito se deben tener en cuenta las características de la planta madre, del fruto y de la semilla (Angulo, 1998).

La desinfección de la semilla se debe realizar con fungicidas. Otra forma de desinfectar la semilla es mediante su inmersión en agua a 50° C por 25 minutos y luego pasarla por una solución de sulfato de cobre al 1,5%. La semilla una vez desinfectada puede ser inmediatamente sembrada o puede almacenarse refrigerada en un recipiente de vidrio sellado (Valderrama, 2002).

16.5.2. Reproducción asexual

La uchuva, se puede propagar asexualmente por esquejes, *in vitro* o por injerto. Estos sistemas de propagación vegetativa permiten obtener plantas (clones) de excelentes características en producción, resistencia y calidad de frutos; cuando provienen de plantas madres bien seleccionadas, y lo más importante es que se logra tener un material homogéneo en el cultivo (Flores *et al.*, 2000).

a) *Propagación in vitro*. El cultivo de tejidos es una herramienta de gran utilidad en la biotecnología. Esta técnica se basa en la “totipotencia celular”; capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa bajo ciertas condiciones químicas y físicas, dadas en el cultivo *in vitro*. Así se obtiene la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original a partir de trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas. Inicialmente se usó esta técnica para la multiplicación masiva de plantas élites o micropropagación y también en la obtención de clones libres de

virus (Tapia, 2001). En el caso de *P. peruviana*, los brotes se desarrollan *in vitro* con gran rapidez en condiciones adecuadas de temperatura e iluminación (Veramendi & Arregui, 2001).

16.6. CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA

La conservación *in vitro* a corto o mediano plazo necesariamente requiere de subcultivos periódicos, actividad que generalmente dificulta su conservación, aún cuando se han desarrollado métodos que permiten retardar el crecimiento de los explantes y así prolongar el tiempo requerido entre los sucesivos subcultivos (Lundergran & Janick, 1979; Oka y Niino, 1997). La técnica más desarrollada para la conservación *in vitro* es la del cultivo de ápices cuyos procesos se pueden sumar como sigue (Cadima, 1996):

- a) Selección del material adecuado.
- b) Aislamiento de individuos sanos.
- c) Desarrollo de métodos de aislamiento del meristema.
- d) Optimización de las condiciones de cultivo para la regeneración de las plantas a partir de meristemas.
- e) Almacenamiento de cultivares bajo condiciones de mínimo crecimiento (Inhibidores de crecimiento, bajas temperaturas), o criopreservación usando nitrógeno líquido
- f) Recuperación del tejido viable de la fase de conservación.
- g) Regeneración, crecimiento y propagación de las plantas.

Metodología

a) *Almacigado de Semillas de P. peruviana*

Con el propósito de obtener un material homogéneo listo para establecerlo *in vitro*, el protocolo sugiere almacenar las semillas de *P. peruviana* en un invernadero. Para inducir a una germinación en un menor

tiempo se deben remojar las semillas en una solución con 1,5 g/l de ácido giberélico, por 24 horas antes del almácigado. Al día siguiente se colocan las semillas a una distancia de 3x4 cm en el sustrato, se cubre la semilla con dos veces su tamaño, regando inicialmente el sustrato con Dhytane (2,5 g/l). Finalmente el sustrato se cubre con paja y todo el conjunto con un plástico para evitar la pérdida de humedad. Siete a diez días después, se realizan las primeras evaluaciones y conteo de las semillas que llegaron a germinar y de esa manera se determina el porcentaje de germinación con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Germinación} = (\text{N}^{\circ} \text{ de semillas germinadas} / \text{N}^{\circ} \text{ de semillas sembradas}) \times 100.$$

b) Establecimiento *in vitro*

El establecimiento *in vitro* de *P. peruviana* se realiza a partir de plantas de las diferentes variedades que se pretende conservar y que se encuentran ya sembradas en invernadero. Se realiza inicialmente una desinfección en alcohol al 70% (30 segundos), luego un lavado en agua destilada esterilizada y posteriormente una inmersión en hipoclorito de sodio al 0,8% (3 minutos) y tres enjuagues consecutivos en agua destilada estéril (cada uno de tres minutos). Luego se colocan los esquejes en un medio de cultivo de establecimiento. El proceso se realiza en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar.

c) Multiplicación masiva

Una vez obtenidas las plántulas provenientes del establecimiento *in vitro*, se procede a una multiplicación clonal de las plántulas por medio de esquejes, siendo colocados en un medio de multiplicación (cuadro 1). Cada 10 días se mide en mm el tamaño de las plántulas y se cuenta el número de yemas con la finalidad de evaluar la tasa de multiplicación.

Cuadro 1. Reactivos utilizados y condiciones para la preparación del medio de cultivo de establecimiento y multiplicación para *P. peruviana*

| Material | Cantidad |
|-----------------------------|-----------------|
| Sales minerales (MS) | 4,6 g/l |
| Tiamina | 0,4 mg/l |
| Myo-inositol | 100 mg/l |
| Azúcar comercial | 25 g/l |
| Kinetina | 0,02 mg/l |
| Ac. Giberélico | 0,2 mg/l |
| Ac. Indol-Butírico | 0,2 mg/l |
| Agar | 7,5g/l |
| Condición | Rango |
| pH | 5,7+/-0,1 |
| Temperatura | 22 a 24°C |
| Fotoperiodo (Luz/Oscuridad) | 16h / 8h |
| Intensidad luminosa | 2.000-2.500 lux |

d) Conservación *in vitro*

• Ingreso a condiciones de Conservación

Los explantes en proceso de multiplicación son transferidos a medios de conservación con presencia de agentes osmóticos (Manitol y/o Sorbitol), retardando su crecimiento, intensidad luminosa 1.000 a 1.500 lux y un fotoperiodo de 16h/8h (luz/oscuridad).

Cuadro 2. Medios de cultivo empleados para la conservación *in vitro* de *P. peruviana*. (Laboratorio de Biotecnología FCAPFyV – UMSS, 2004)

| Componentes | Cantidad (mg/l) |
|---------------------------|-----------------|
| Sales MS (g/l) | 2,3 – 4,6 |
| Thiamina (mg/l) | 0,4 |
| Myo-inositol (mg/l) | 100 |
| Azúcar comercial (g/l) | 30 |
| Sorbitol (g/l) | 40 |
| Manitol (g/l) | 40 |
| Phytigel (g/l) | 2,8 |
| pH | 5,7 |
| Temperatura (°C) | 20- 24 |
| Fotoperiodo (hrs) | 16-8 |
| Intensidad luminosa (lux) | 1.000 – 1.500 |

• **Cámara de Crecimiento**

Las plántulas sometidas a diferentes medios de conservación (tratamientos) se mantienen bajo condiciones de luz y temperatura controladas:

- Intensidad lumínica: 1.000 – 1.500 lux.
- Temperatura: 20 a 24 °C.

Se realizan revisiones periódicas tanto de la cámara como del material en conservación, considerando los siguientes factores:

- Condiciones de temperatura.

- Iluminación.
- Estado del material en conservación (viabilidad de los explantes, senescencia de las hojas, contaminación, presencia o ausencia de raíces).
- Medio nutritivo.

• **Introducción a conservación**

a) **Evaluaciones de las variables de respuesta.** Una vez introducidos los explantes de *P. peruviana* a condiciones *in vitro*, se realizan las evaluaciones de las variables de respuesta cada mes. La toma de datos se realiza llenando la siguiente tabla:

Cuadro 3. Parámetros de evaluación de *P. peruviana* bajo conservación *in vitro*

| Variedad | Tratamiento | Repetición | Viabilidad (S/N) | Contaminación (P/A) | Raíces (P/A) | altura (mm) | Nº nudos |
|----------|-------------|------------|------------------|---------------------|--------------|-------------|----------|
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

Se identifica el tubo de ensayo con los diferentes medios de cultivo, registrando la variedad y el número de muestras /variedad.

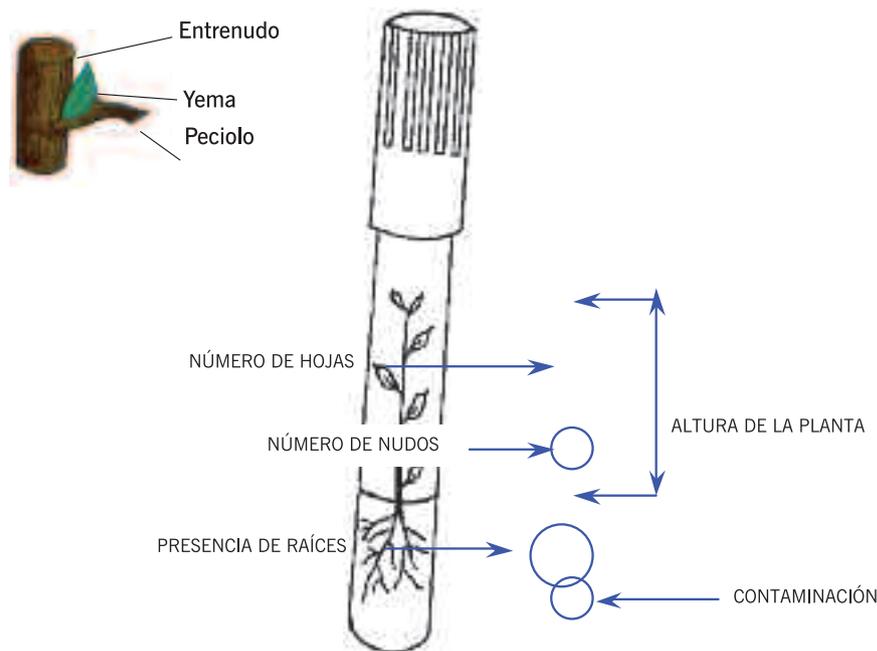


Figura 3. Parámetros de evaluación realizados en los tubos de ensayo

16.7. MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

Debido a que la micropropagación es un proceso que tiende hacia una progresión geométrica, dos factores inciden de manera determinante en el volumen de producción: el factor de multiplicación y la velocidad de crecimiento. La tasa de multiplicación promedio para *P. peruviana* en el medio de cultivo utilizado ha sido de 1:4 en un período de 30 días. Salgues, 1998 indica que esta información permite determinar el volumen de producción, debido a que el factor de multiplicación es el número base de una progresión; con un FM de 5 en 5 generaciones se tendrán 3.125 descendientes. Veramendi & Arregui (2001) afirman que en *P. peruviana*, los brotes se desarrollan *in vitro* con gran rapidez en condiciones adecuadas de temperatura e iluminación.

Sobrevivencia de las plántulas

La sobrevivencia de las plántulas es una de las características más importantes en conservación *in vitro* donde se busca una técnica que asegure un alto valor de supervivencia y otras características favorables en conservación (Cadima, 1996), utilizando el cultivo *in vitro* como un sistema de conservación de germoplasma se puede actuar sobre dos factores: las condiciones ambientales de la cámara de cultivo y la composición del medio de cultivo (Veramendi & Arregui, 2001). Para la conservación *in vitro* de tejidos vegetales se han empleado diferentes factores, de los cuales el más utilizado es la modificación del medio de cultivo con distintos agentes osmóticos, como el manitol, la adición de benzilaminopurina (cuya función está estrechamente relacionada con el mantenimiento de la viabilidad durante la conservación) y el carbón activado que elimina o reduce a niveles muy bajos la oxidación fenólica (Roca *et al.*, 1992), aspecto que incide negativamente en el proceso de conservación. La modificación del medio de cultivo y la reducción de la temperatura y/o la iluminación son los factores más importantes en el control del crecimiento.

En investigaciones realizadas por Rojas, (2005), en cuatro variedades de *P. peruviana* (V_1 = uvilla, Colombia; V_2 = Cereza, Colombia; V_3 = Capulí, Cbba.-Bolivia y V_4 = Capulí, La Paz-Bolivia), el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas fue mayor al 60% durante un periodo de 5 meses, al ser sometidas a diferentes concentraciones de: MS (2,3 y 4,6 g/l), Manitol (20, 40 y 60g/l) y Sorbitol (20, 40 y 60g/l). El tratamiento con 2,3 g/l MS+40 g/l Manitol presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia de las plántulas (> al 80%) para las cuatro variedades. Resultados similares se obtuvieron en el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología de la Universidad Mayor de San Marcos en Lima, Perú con un promedio del 67% de sobrevivencia a los 6 meses de conservadas *in vitro* de algunas solanáceas (variedades de papa), con un medio de cultivo que contenía 40g/l de Manitol, 30g/l de sucrosa; de la misma manera Villarroel *et al.*, (1999) determinaron para la conservación *in vitro* de raíces y tubérculos Andinos el uso de medios conteniendo la mitad de MS (2,3 g/l) con la adición de Manitol (40 g/l), en el caso de la papa y, sorbitol (40 g/l) en el caso de tubérculos menores y yacón, actualmente son los medios de conservación *in vitro* que se utilizan en el banco Nacional de Tubérculos y Raíces andinas que custodia PROINPA.

En relación a la presencia de raíces, las altas concentraciones de inhibidores de crecimiento (60 g/l de manitol o de sorbitol), independientemente de la concentración de sales MS, inhiben en cierto grado el desarrollo radicular. Se puede afirmar que a mayor concentración del inhibidor existe una menor presencia de raíces, resultados corroborados por Tapia (2001) y el IPGRI (2004), quienes mencionan que el Manitol y el Sorbitol son sustancias que tienen poder inhibitor en los brotes regulando su desarrollo y retrasan el crecimiento de las plantas a nivel apical y radicular, pudiendo ser utilizados con buenos resultados en protocolos de Conservación *in vitro* de Recursos Fitogenéticos.

El uso combinado de MS y de los inhibidores de crecimiento (Manitol o Sorbitol) proporcionan condiciones más adecuadas para la conservación que su aplicación en forma individual, influyendo en los porcentajes de supervivencia de las plántulas y en la presencia de raíces.

En relación a la altura de planta, número de hojas y número de nudos, Rojas (2005) observa que a mayor concentración de inhibidores de crecimiento hay menor altura de planta, número de nudos y número de hojas; al respecto Cadima (1996) indica que la adición de retardante de crecimiento al medio de cultivo reduce notablemente el desarrollo de la plántula y Espinoza *et al.* (1992) mencionan que los reguladores de crecimiento de tipo hormonal influyen en la tasa de crecimiento de los cultivos, actúan antagonicos al ácido giberélico y por ende, reducen la elongación y multiplicación celular. Siendo indiferente la concentración de MS, lo recomendable es utilizar la concentración mas baja (2,3 g/l MS), para reducir costos, Villarroel *et al.* (1999) han determinado el uso de medios adecuados para la Conservación *in vitro* de algunas especies, conteniendo de 2,3 g/l MS (tanto de macronutrientes como de micronutrientes) con la adición de Manitol (40 g/l), en el caso de solanáceas y Sorbitol (40 g/l) en el caso de tubérculos menores y yacón.

Otros agentes no metabolizables como el Manitol y el Sorbitol, son prácticamente no asimilables por las plantas; estas sustancias reducen el crecimiento más que el desarrollo (entrenudos cortos, pero en cuanto al número de nudos entre plantas bajo estrés osmótico y plantas sin estrés, no hay diferencia significativa) y posiblemente sean mas efectivos que la sucrosa en la limitación de crecimiento de los cultivos. Cadima (1996) indica que es importante considerar que en un proceso de conservación, lo que nos interesa es la presencia de entrenudos cortos, con abundantes nudos, debido a que en los nudos se hallan las yemas que darán lugar a nuevas plantas, lo cual es fundamental para el siguiente paso de la con-

servación que es la regeneración de nuevas plantas.

Según Barceló *et al.* (1992), la presencia foliar es un aspecto importante a ser considerado en la conservación *in vitro* debido a que su presencia incrementa los mecanismos biosintéticos tales como la velocidad de fotosíntesis y los contenidos de almidón, proteínas y ácido ribonucleico, también aumentan los niveles de diversos radicales libres y de las reacciones que estos originan.

Existe un efecto varietal debido a que cada variedad se comporta de manera diferente al ser sometidas al mismo tiempo a diferentes concentraciones de MS y Manitol, esto es corroborado por Tapia (2001) quien dice que las dificultades en este tipo de estudio se presentan bajo condiciones de conservación en la cual los genotipos reaccionan de diferente forma. Cuando una gran colección de germoplasma debe ser mantenida *in vitro*, el objetivo de los estudios debe desarrollarse en función a los medios de conservación que sean aplicables a un gran rango de genotipos. Otras características comunes son el uso de retardadores de crecimiento como ácido absí-cico, manitol o sorbitol (Veramendi & Arregui, 2001).

16.8. BIBLIOGRAFÍA

- Angulo, R. 1998. Memorias Curso de Frutales de Clima Frío. Uchuva (*Physalis peruviana L.*). Tibacuy, CO.s.e., pp. 1-3.
- Barceló J, Nicolas G, Sabater B, Sanchez R. 1992. Fisiología Vegetal. 1 ed. Madrid, ES. Ed. Pirámide S.A., pp. 607-617
- Bernal H.; Correa, J. 1998. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello (PREVECAB). 2ed. Tomo XII. Santa Fe de Bogotá DC, CO., pp. 441-477.
- Cadima, X. 1996. Conservación *in vitro* a mediano plazo de Papa y otros Tubérculos Andinos. Tesis Ing. Agr. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias Martín Cárdenas. Cochabamba, BO., pp. 86.
- Cárdenas, M. 1989. Manual de Plantas Económicas de Bolivia. 2 Ed. Cochabamba, BO. Ed. Los Amigos del Libro, pp. 133.

- Cooper, H.; Spinalle, C.; Kermali, I.; Anishetty, M., 2000. Utilización de los recursos fitogenéticos para la gricultura sostenible (En Línea). Roma. IT. IPGRI. Consultado 13 de mayo 2005. Disponible en IPGRI. Publicationscgiar.org
- De Luca, M. 2004. Plantas Medicinales del Trópico Boliviano. 1 ed. Programa de Apoyo a la Estrategia de Desarrollo Alternativo en el Chapare (PRAEDAC). Cochabamba, BO. Ed. Poligraf, pp. 64 y 65.
- Espinoza, N.; Lizarraga, R.; Sigueñas, C.; Biutron, F.; Bryan, J.; Dodd, J. 1992. Cultivo de tejidos: Micropropagación. Conservación y Exportación de Germoplasma de Papa. Guía de investigación. Lima, PE. Centro Internacional de la Papa (CIP), pp. 3-19.
- Fischer, G. *et al*, 2000. Producción, poscosecha y exportación de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.), Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá. Co., pp. 35.
- Flores, V.; Fischer, G.; Sona, A.; 2000. Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana*). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Co., pp. 26.
- Girault, L. 1987. Kallawayaya curanderos itinerantes de los Andes. *P. peruviana*. 1 ed. La Paz-Bo. Ed. Servicio Grafico Quipus, pp. 382.
- IPGRI (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos). 2004. IPGRI online. Consultado 17 de mayo 2004. Disponible en <http://www.ipgri-publications@cgiar.org>
- IPGRI, 2004. Por qué tienen importancia los recursos fitogenéticos (En Línea). Consultado 7 mayo 2005. Disponible en http://www.ipgri_web_admin@cgiar.org
- López, S. 1978. Un nuevo cultivo de alta rentabilidad. La Uvilla o Uchuva (*Physalis peruviana* L.), en revista Esso Agrícola (2), Bogotá, Co., pp. 25.
- Lundergan, C. Y Janick, J. 1979. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. Hort. Sci. s/l. s.n.t. 14: 514.
- Oka, S. Y Niino, T. 1997. Long term storage of pear (*Pyrus spp.*) shot culture *in vitro* by minimal growth methods. JARQ. 31s/l. s.n.t., pp. 1-7.
- Pérez, A.; Arbelaez, E. 1975. Plantas Medicinales y Venenosas de Colombia. 1 ed. Medellín, CO. Ed. Hernando Salazar, pp. 251.
- Popenoe, H.; King, S.; Leon, J.; Sumar, L.; Vietmeyer, N.; Daffor, M. 1989. Lost Crops of the Incas. National Academy Press, Washington D.C., USA, pp. 241-251
- Roca, W.; Arias, D.; Chavez, R. 1992. Métodos de Conservación *in vitro* del Germoplasma. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Ed. W. Roca, L. Mroginski. CIAT. Cali, CO. s.n.t., pp. 41-78
- Rojas, K. 2005. Conservación *in vitro* a mediano plazo de *Physalis peruviana*. Trabajo de Grado. Especialidad en Manejo y Conservación de los Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada. Dirección de Posgrado. Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuaria "Martín Cárdenas". Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.
- Romero, L.; Castañeda, R. 1991. Frutas Silvestres de Colombia. *Physalis peruviana*. 2 ed. Ed. ABC. Santa Fe de Bogotá. D.C., CO., pp. 458-460.
- Rudezco, T. 1991. A minimum facility medium for *in vitro* collection of *Digitaria eriantha spp pentzii* and *Cynodon dactylon*. Trop. Grassl. 25: 56-63.
- Salaues, R.; Rocabado C. y Blanc D. 1999. La Producción de Semilla Prebásica. Unidad de Producción de Semilla de Papa, SEPA. 1ed. Cochabamba, BO. Ed. Poligraf, pp. 57.
- Tapia, M. 2001. Factores que Influyen en la Micropropagación –Tipos de Explantos – Cultivo de Meristemas. Postgrado Conservación y manejo de los Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada. Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bo., pp. 16.
- Ugarte, M.L. 1992. Ordenación y Clasificación Morfológica de Especies y cultivares de Papa del Banco de Germoplasma de Bolivia. Tesis de Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias "Martín Cárdenas". Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bo.
- Valderrama K. 2002. Alternativas de manejo agronómico para el cultivo del tomate *Lycopersicon esculentum*. CER – COLCIENCIAS. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá, Co. s.n.t., pp. 35.
- Veramendi, J. Arregui, L. 2001. La Conservación *in vitro* de los Recursos Fitogenéticos de Patata. Rev. Vida Rural N° 139. Madrid, ES. Ed. Eumedía S.A., pp. 3.
- Villarroel, C. 2000. Conservación *in vitro* de Germoplasma. Postgrado Conservación y manejo de los Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada. Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bo., pp. 7.
- Villarroel, C.; Ugarte, M.; Cadima, X.; Aguirre, G. 1999. Conservación *In vitro* de Raíces y Tubérculos Andinos de PROINPA. Fundación PROINPA, Cochabamba, Bo., pp. 5.

Capítulo 17

La aplicación del cultivo de tejidos en especies forestales andinas Kewiña (*Polylepis besseri* Hieron)

Cecilia Ugarte Ballón¹

17.1. INTRODUCCIÓN

Los bosques sudamericanos de *Polylepis* se encuentran considerados como los ecosistemas boscosos más amenazados (Renison *et al.*, 2004). La kewiña se utiliza como combustible y en construcciones de la región puneña. En varias zonas sufre acelerados procesos de erosión, por deslizamiento de taludes anexos a carreteras y caminos rurales, especialmente relacionados con la actividad minera. Especie vulnerable, clasificada en esta categoría bajo el nombre de *Polylepis besseri* Hieron en la lista de especies amenazadas de la flora de Bolivia (Meneses *et al.*, 2005).



Fig. 1. Kewiña, Parque Nacional Tunari.

Así, ésta es una especie estratégica de Los Andes por sus usos. Presenta problemas de multiplicación vía semilla y erosión genética. Si bien se han hecho grandes avances en la estrategia de aprovechamiento sostenible y conservación de los recursos forestales, aún resta mucho que hacer, especialmente en lo que concierne a la aplicación de las biotecnologías. El objetivo del capítulo es mostrar el desarrollo de protocolos de micropropagación a partir de árboles seleccionados de Kewiña (*Polylepis besseri* Hieron).

17.2. INFORMACIÓN GENERAL Y DESCRIPCIÓN DE KEWIÑA

17.2.1 Descripción taxonómica

IOPI (2007) realiza la siguiente descripción taxonómica de la kewiña:

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Rosales.

Familia: Rosaceae.

Nombre científico: *Polylepis besseri* Hieron.

Nombre vernacular: Kewiña (Bolivia), Queñual (Perú), Queñua (Bolivia, Perú),

¹ Laboratorio de Biotecnología Forestal "Aliso" BASFOR/ESFOR.

Qiwuña (Bolivia, Perú), Lampaya (Bolivia), Yagual (Colombia, Ecuador), Tabaquillo (Argentina).

Sinónimos: *Polylepis besseri* var. *abbreviata* Bitter, *Polylepis besseri* subsp. *longipedicellata* Bitter, *Polylepis cristagalli* Bitter, *Polylepis cristagalli* var. *longiracemosa* Bitter, *Polylepis incana* subsp. *brachypoda* Bitter, *Polylepis incana* subsp. *incarum* Bitter, *Polylepis incana* subsp. *subtusalbida* Bitter, *Polylepis pallidistigma* Bitter, *Polylepis racemosa* var. *lanata* Kuntze, *Polylepis racemosa* var. *tomentosa* Kuntze, *Polylepis rugulosa* Bitter, *Polylepis subquinquefolia* Bitter, *Polylepis tenuiruga* Bitter, *Polylepis triacontandra* Bitter.

17.2.2. Descripción morfológica

a) Forma de crecimiento

Borter (1994) indica que *Polylepis besseri* Hieron es de lento crecimiento. Los árboles son tolerantes al viento, a bajas temperaturas, radiación solar elevada y a la sequía moderada. Prospera en algunos de los más duros ambientes tropicales. En función de los factores ambientales, la especie puede variar de arbustos y árboles de pequeño rango de altura de 3 a 10 m, con un promedio de 7 m comúnmente bajo, con una corona de 4 m de diámetro, *P. besseri* también crece de una forma más erecta, la forma ahuecada con un sólo tronco alcanzando un máximo diámetro altura pecho, DAP de 45 cm. Esta especie posee una corteza castaña con abundante ritidoma que se exfolia continuamente (Hensen, 1995). Como una importante fuente primaria de la materia orgánica, *P. besseri* es importante en la formación y protección de los suelos en zonas climáticas de escasa vegetación (Borter, 1994).

La kewiña normalmente crece en altitudes entre los 3.000 a 4.000 msnm en las zonas con precipitaciones que van de 300 a 1.200 mm (Borter 1994). Estos árboles

crecen en las elevaciones más altas que cualquier otro árbol en el mundo; sobreviven en alturas como 5.200 msnm en las laderas del Nevado Sajama, en Potosí, Bolivia. Como un árbol siempre verde tiene baja tolerancia al fuego, *P. besseri* es altamente susceptible a las presiones de la expansión de la agricultura y el consumo de leña (Killeen *et al.*, 1993).

b) Distribución geográfica de la especie

La distribución del género está restringida a los corredores andinos de América del Sur desde el norte de Venezuela, al sur con el norte de Argentina y Chile. (Fjeldsa & Krabbe 1990). En Bolivia esta especie está distribuida en los departamentos de La Paz, Cochabamba, Oruro, Chuquisaca y Tarija (Simpson, 1993).

c) Importancia y usos de la Kewiña

Alternativamente, la paleobotánica y la evidencia histórica sugiere que los bosques de *Polylepis besseri* eran mucho más amplios, y que la quema, el pastoreo y otras presiones antrópicas han reducido en gran medida su área durante los últimos 3.000 años, en particular durante los últimos varios cientos de años (Fjeldsa & Kessler 1996, Fjeldsa & Krabbe 1990). Debido a su posición única como árboles de crecimiento en la zona más alta de los Andes, *P. besseri* es un género sumamente importante, tanto ecológicamente como en la calidad (Ledesma, 1994, Ridgley & Tudor 1989). *P. besseri* proporciona una rara fuente de gran altura, como hábitat forestal, donde varias especies de avifauna se basan en exclusiva (Fjeldsa & Krabbe, 1990, Ridgley & Tudor, 1989). Los usos tradicionales son: carbón, madera de construcción, herramientas, arados, leña, utensilios de cocina, conservación, mejora de suelo y protección contra heladas y viento, ruedas de los molinos hidráulicos, silvicultura urbana, medicinal (resfríos), instrumentos musicales y tintes para las prendas de vestir (Patterson, 1998).

d) Formas de propagación de la especie

Las semillas tienen una baja tasa de germinación (2 a 15%), no satisfactoria con tratamientos pregerminativos conocidos. Debido a que la tasa de germinación disminuye rápidamente en el almacenamiento, la producción a partir de semilla está limitada a que sólo se pueda lograr a través del almácigo en sustratos de arena y con alto contenido de materia orgánica, inmediatamente después de su recolección. (Patterson, 1998). Naturalmente plántulas germinadas pueden ser extraídas y transportadas en pequeñas bolsas de plástico rociadas con agua a una almaciguera cercana, en la que puedan ser trasplantadas a las bolsas para su futuro desarrollo (Fossati, 1996).

17.3. MICROPROPAGACIÓN

17.3.1 Recolección de material vegetal

El material vegetal es recolectado de árboles seleccionados, de lugares con sombra (menos oxidación), brotes tiernos, brotes apicales o rebrotes.



Fig. 2. Árbol seleccionado.



Fig. 3. Rama recolectada.

17.3.2. Desinfección y establecimiento

Para la fase de desinfección se aplica formol al 37% durante 20 minutos.

a) Establecimiento -Fase I

Se utiliza el medio de base enriquecido con sales minerales de Q&L (Quoirin y Lepoivre, 1977), 0,4 mg/l de AG3, 0,5 mg/l de TDZ, vitaminas de Walkey (1972), sacarosa 2,5% + 1% de carbón activo, agar 0,7% y ajustado a un pH de 5,5. Bajo este procedimiento, se han obtenido hasta un 80% de explantes libres de contaminación.



Fig. 4. Establecimiento de segmentos nodales.

17.3.3. Multiplicación y enraizamiento

a) Multiplicación -Fase II

El medio base debe ser enriquecido con 0,4 mg/l de AG3 en ausencia de carbón activo, lográndose un coeficiente de multiplicación de 1/7.



Fig. 5. Multiplicación de explantes.

b) Enraizamiento -Fase III

Se utiliza el medio 664 (Druart, 1987), presentando un 80% de los explantes enraizados.



Fig. 6. Enraizamiento de explantes.

c) *Aclimatación - Fase IV*

Los plantines producidos requieren necesariamente una etapa de pre aclimatación en vermiculita, por un lapso de 15 días.



Fig. 7. Pre aclimatación de plantines.

Esta etapa se realiza primeramente en vivero, para luego ser transferidos a bolsas en pleno aire luego de 45 días, presentando una sobrevivencia del 70%, a los tres meses.



Fig. 8. Aclimatación de plantines.

17.4. BIBLIOGRAFÍA

- Borter P. 1994. Silvicultura, usos y problemas de 17 especies Forestales de importancia ecológica y socioeconómica en los valles interandinos de Cochabamba. Programa de repoblamiento forestal. Cochabamba, Bolivia: CORDECO- IC - COTESU.
- Fjeldsa J. & Kessler M. 1996. Conserving the biological diversity of *Polylepis* woodlands of the highlands of Peru and Bolivia: A contribution to sustainable natural resource management in the Andes. Copenhagen, Denmark: Nordic Agency for Development and Ecology.
- Fjeldsa J. & Krabbe N. 1990. Birds of the high Andes. Svendborg, Denmark: Zoological Museum, University of Copenhagen and Apollo Books.
- Fossati, J. 1996. Resumen silvicultural de 10 especies nativas. Cartilla 8. Cochabamba. Bolivia: Programa de Repoblamiento Forestal.
- Hensen, I. 1995. Estudios Ecológicos y Fenológicos del Género *Polylepis besserii* Hieron en la Cordillera Oriental de Bolivia. Ecología en Bolivia. Nº 23.
- IOPI. 2005. Catalogue of Life: 2007 Annual Checklist. International Organization for Plant Information (IOPI), Fecha de consulta (2009, febrero) Disponible (En línea). http://www.catalogueoflife.org/show_species_details.php?record_id=4317755.
- Killeen T.J., Emilia G.E., Beck S.G. 1993. Guía de árboles de Bolivia. La Paz, Bolivia: Herbario Nacional de Bolivia y Missouri Botanical Garden, Quipus S.R.L.
- Ledezma J.F. 1994. Las especies nativas y sus usos en: Candelaria, Millu-Mayu Zapata Rancho. Cochabamba, Bolivia: Programa de Repoblamiento Forestal, Unidad de Investigación.
- Patterson IV W.A. 1998. *Polylepis besserii* Hieron. Part II—Species Descriptions. Returned Peace Corps Volunteer, Bolivia.
- Ridgley R.S. & Tudor G. 1989. The birds of South America. Austin, TX: University of Texas Press.
- Simpson B.B. 1977. A revision of the genus *Polylepis*. Smithsonian Contr. Botany. 43: 1-62.

Capítulo 18

Multiplicación *in vitro* de orquídeas nativas bolivianas

Claudio Vázquez, Gino Aguirre, Cecilia Ugarte, Juan Villarroel & Jazmín Yamashiro

18.1. INTRODUCCIÓN

Casi todas las especies endémicas en Bolivia, adyacentes a los caminos comprendidos entre los Yungas de Cochabamba y La Paz, presentan la destrucción de su hábitat (Vásquez & Ibish, 2000); haciendo que especies nativas se encuentren en riesgo de extinción en zonas geográficas con mucha presión antrópica debido a procesos de colonización. En esta situación se encuentran muchas especies de orquídeas nativas y endémicas de la zona del Chapare de Cochabamba.

Algunos investigadores sostienen que la composición genética es esencial para la conservación (Loeschcke *et al.*, 1994); debido a que puede faltar diversidad genética para reproducirse o sobrevivir, existiendo de esta manera pérdida potencial de poblaciones o especies (Demauro, 1993).

Knudson (1922; citado por Menacho, 2004), demostró que las semillas de orquídeas eran capaces de germinar asimbióticamente *in vitro*. Por lo tanto la multiplicación de orquídeas por protocormos (*in vitro*) permite incrementar el número de individuos y mantener la variabilidad genética en cada especie mediante el repoblamiento de las regiones donde son nativas. De esta manera se disminuye la presión indiscriminada a dichas especies, promoviendo la conservación y uso sostenible de las mismas.

En este sentido, el presente capítulo muestra el rol del cultivo de tejidos en la multiplicación *in vitro* de orquídeas, como una alternativa para evitar una mayor pérdida de estas especies en sus zonas de origen. Además, las orquídeas tienen un alto valor ornamental; su multiplicación *in vitro* y posterior comercialización podría significar una actividad económica sostenible para los pobladores de estas zonas altamente influenciadas por el ecoturismo, siendo a la vez una actividad comprometida con la conservación del medio ambiente.

18.2. ORQUÍDEAS ENDÉMICAS DE BOLIVIA

Actualmente se registran alrededor de 1.350 especies de orquídeas en Bolivia de las cuales 400 son especies endémicas, siendo la mayoría epifitas. Se encuentran en mayor proporción especies endémicas de *Lepanthes*, *Pleurothallis* y *Masdevallia* (Menacho, 2004).

El porcentaje más alto de especies endémicas de orquídeas se registra entre 2.500 y 3.000 msnm (Vásquez & Ibisch, 2000). Parece lógico que el endemismo aumente con la altura porque los valles disectados promueven la fragmentación y separación geográfica de poblaciones (Ibisch *et al.*, 1996).

Los Yungas de Bolivia es una región biogeográficamente distinta que tiene su propia

historia evolutiva mostrando patrones de diversidad y endemismo únicos a nivel mundial (Vasquez & Ibisch, 2000), entre las especies de orquídeas endémicas de esta zona encontramos a *Góngora ileniana*.

El género *Góngora* se encuentra actualmente constituido por más de 60 especies. Es uno de los géneros de orquídeas cuyos miembros no son fáciles de distinguir. Se trata de plantas epífitas con inflorescencias colgantes, con flores de tamaño medio; espectacular o por lo menos extraño es el tamaño del labelo, y su estructura es muy compleja (Gerlach & Heider, 2001).

Los mismos autores mencionan que en los países donde existen plantas del género *Góngora*, la taxonomía carece de investigación profunda. En Bolivia existen por lo menos

cuatro especies, tres de éstas pertenecen a la sección *Góngora*, con pétalos arqueados, las flores tienen cuernos y representan la especie más grande de Bolivia. La cuarta sección *Truncata*, se distingue por los pétalos rectos, la base del labelo en forma de bolsa y la ausencia de cuernos en la misma.

La *Góngora ileniana* es una planta epífita, con pseudobulbos agregados ovoideos, longitudinalmente surcados, de 8,5 cm de largo y 6 cm de ancho, el ápice bifoliado, cuando jóvenes revestidos con dos vainas escariosas, evanescentes. Sus hojas son elíptico lanceoladas, agudas hasta cortamente acuminadas, hacia la base atenuadas y pecioladas, lámina con 7 nervios pronunciados, unos 45 cm de largo y 16 cm de ancho (Gerlach & Heider, 2001). Ver Figura 1.

Especie endémica de Bolivia. Recientemente descubierta, encontrándose una sola planta de esta especie el año 1999 por H. Heider, cerca de Cristal Mayu, a 26,5 km de Villa Tunari (Chapare, Cochabamba), quedando su hábitat destruido por la mano humana en tan sólo un año (Gerlach & Heider, 2001). La ecología de la especie es en el subdosel de selva primaria húmeda. Sus polinizadores de *G. ileniana* pertenecen al Género *Eufrisea sp.* (Heider & Reichl, 2001).



Fuente: G. Gerlach & H. Heider (2000)



Fuente: Vázquez (2006).

Figura 1. *Góngora ileniana*, flor y planta adulta

18.3. ORQUÍDEAS NATIVAS DE BOLIVIA

En Bolivia, de acuerdo a Vázquez (1995), la distribución de la mayoría de las orquídeas se encuentra en la zona de los bosques montañosos húmedos y parte de la Ceja de Monte con neblina.

Vázquez & Ibisch (2000), mencionan que la mayoría de las especies conocidas se han registrado en el Departamento de La Paz, seguido por Cochabamba y Santa Cruz. Siendo las laderas Nor-orientales de los Andes las que albergan la mayoría de las especies,

creciendo en los Yungas superiores e inferiores, y en los bosques de neblina de la Ceja de Monte.

18.3.1. *Epidendrum* ssp.

Del griego *epi*, sobre y *dendrom*, árbol; en alusión al hábito de la mayoría de las especies de vivir sobre los árboles (Cavero *et al.*, 1991).

Epidendrum (Figura 2), es uno de los mayores géneros dentro de las Orchidaceae, con 800 especies distribuidas por todo el continente americano (Dressler, 1993). Encontrándose en Centro y Sud América (Cavero *et al.*, 1991). En el Perú se reportan 263 especies (Cavero *et al.*, 1991), existiendo poca información en Bolivia.

La mayoría son epífitas, sin embargo, algunas son litófitas o terrestres. Generalmente presentan un tallo en forma de caña que puede llegar a medir hasta 2 m. de longitud. La inflorescencia es un racimo terminal, con un número variable de flores según la especie. Muy escasos individuos originan su inflorescencia lateralmente. Las flores son de color, tamaño y aroma muy variados (Cavero *et al.*, 1991).



Fuente: PlantSystematics.org



Fuente: Vázquez (2006).

Figura 2. *Epidendrum* ssp., flor y planta adulta.

18.3.2. *Huntleya meleagris*

El género *Huntleya* incluye 10 especies (Dressler, 1993). Puede ser fácilmente diferenciada de las demás especies de Orchidaceae por la presencia de inflorescencia uníflora y hojas flabeladas dísticas.

Huntleya meleagris (Lindl), es una planta epífita de 50 cm de altura. Tallo entumecido en pseudobulbo. Hojas flabeladas, dísticas, vaina foliar 3-9,5 x 2,5 cm; la hoja destiñe ligeramente, 25-37 x 1,5-4,2 cm, oblanceolada, con nervaduras longitudinales salientes, sécil sobre la vaina, ápice agudo (Menini *et al.*, 2004). Ver Figura 3.



Fuente: Peixoto (2000).

Figura 3. *Huntleya meleagris*, flor.

18.4. LAS ORQUÍDEAS EN BOLIVIA. IMPORTANCIA Y CONSERVACIÓN

18.4.1. Importancia biológica

Bolivia está entre los diez países con mayor diversidad biológica en el mundo debido a la existencia de una variedad de ecosistemas (Decreto Supremo 25458, 1999 y Collantes, 1995).

Se considera que por lo menos 18.000 a 20.000 especies de plantas son nativas de Bolivia. La familia con mayor riqueza de especies es la Orquidaceae. Actualmente más de 1.300 especies pertenecientes a 186 géneros han sido clasificadas, sin embargo, considerados los porcentajes actuales de descubrimiento de los bosques Andinos y próximos a los Andes se espera, que el número de orquídeas en Bolivia pueda exceder a las 2.000 (Boletín de la FAN & la SBB, 1998).

18.4.2. Importancia de la conservación de germoplasma

Los procesos de colonización que se desarrollan desde hace varios años en la zona del Chapare, han provocado la transformación de los ecosistemas, para usos agrícolas, pecuarios, industriales y asentamientos urbanos y rurales. Los usos actuales, causan perturbaciones en ecosistemas, por ser una zona de altos índices de endemismos y diversidad.

La gran diversidad y endemismo se da en orquídeas, pteridófitos, aráceas y bromelias y se consideran como las más diversas a nivel mundial (Kessler; *et al.* 2001). Las semillas de las orquídeas son pequeñísimas, encontrándose millones de semillas en sus cápsulas, siendo extremadamente especializadas porque han evolucionado para ser fecundadas por insectos específicos, y necesitan de un hongo llamado micorriza para su germinación simbiótica (Vásquez & Ibisch, 2000). La

investigación desarrollada por Knudson (1922; citado por Menacho, 2004), demostró que dichas semillas eran capaces de germinar asimbióticamente *in vitro*, incrementando enormemente las posibilidades de aumentar su población.

El cultivo de tejidos vegetales permite la conservación de material en condiciones *in vitro* como una alternativa útil de conservación *ex situ*. Se la puede utilizar como un sustituto y/o como complemento de la conservación en campo, ya que ofrece mayor seguridad, fácil acceso y movimiento del germoplasma (Van Der Hurk, 1999).

Aceves (2000) realizó trabajos de conservación *in vitro* en Tuxtla-México cuyo resultado fundamental fue la disminución de la presión social sobre el medio y los recursos naturales, a través de la generación alternativa de empleos e ingresos. Se establecieron empresas sociales de mujeres, orientadas a la producción y comercialización de plantas ornamentales de importancia económica y ecológica.

En la Fundación Ceiba para la Conservación Tropical en la Reserva Orquideológica “El Pahuma”, al noroccidente de Quito-Ecuador se reproducen especies raras y únicas de orquídeas para incrementar su número tanto en el medio natural de la reserva como en sitios fuera de ella (como jardines botánicos y otros programas de conservación), cultivan semillas de especies únicas u ornamentales para la exportación en frascos. Todas las ganancias provenientes de la venta de especies de orquídeas, son reinvertidas en la reserva y en otros proyectos de conservación (McKendrik, 2000).

En Latinoamérica, los estudios muestran avances en trabajos de investigación biotecnológica con especies de orquídeas endémicas y/o en peligro de extinción y plantas nativas con valor comercial, realizando programas de conservación y manejo sostenible de dichas especies.

Entre las experiencias nacionales sobre la conservación de especies nativas de orquídeas, la Fundación Amigos de la Naturaleza (FAN) realiza la conservación en colecciones vivas, bancos de semillas y cultivo de tejidos enfocados a contar con los protocolos establecidos para la propagación de especies nativas o amenazadas además de especies con alto potencial ornamental para su comercialización. De la misma manera el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas Pecuarias y Forestales, perteneciente a la Universidad Mayor de San Simón, realiza investigaciones para establecer protocolos *in vitro* de especies nativas y endémicas.

18.5. PROCEDIMIENTO PARA EL ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS (*Góngora ileniana*, *Epidendrum ssp.* y *Huntleya meleagris*) MEDIANTE PROTOCORMOS

El material vegetal utilizado en esta experiencia fueron semillas provenientes de cápsulas maduras y verdes de las especies de orquídeas arriba mencionadas bajo el siguiente procedimiento:



18.5.1. Zona de recolección del material vegetal

La zona de colecta estuvo ubicada entre los 17°00' de latitud sur y 64°20' de longitud oeste y 17°50' de latitud sur y 64°80' de longitud oeste, corresponde a la Provincia Biogeográfica del Acre-Madre de Dios (Navarro & Ferreira, 2000), Sector Amazónico del Pie de Monte Andino, Distrito Biogeográfico Amazónico del Chapare (Navarro, 2002).

Presenta un bioclima pluvial, termotropical inferior húmedo, hasta hiperhúmedo (Navarro & Ferreira, 2000), con temperaturas medias anuales de 24,2° C y temperaturas mínimas y máximas del mes más frío de 15 y 25° C respectivamente, cuya amplitud térmica anual no es mayor a los 5° C, con una precipitación media de 3.180 mm (Bruckner *et al.*, 2000). La estación lluviosa comprende de diciembre a marzo, y la época seca de junio a septiembre.

18.5.2. Método de secado y almacenamiento

En el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, se procedió al almacenamiento del material colectado. Las

cápsulas verdes fueron guardadas en papel filtro (dos semanas), teniendo el cuidado de no almacenarlas en fundas plásticas debido a los procesos de transpiración y pudrición, ubicándolas en un lugar fresco con bastante aireación (refrigerador). Ver Figura 4.



Fuente: Aguirre (2006)

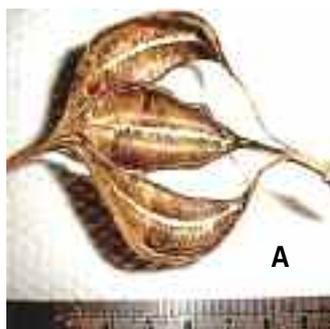


Fuente: Vázquez (2006)

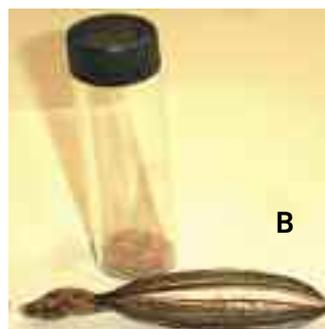
Figura 4. (A) Cápsula verde. (B) Cápsula verde deshidratada de *H. meleagris*.

Las semillas de cápsulas maduras se dejaron secar a temperatura ambiente en una habitación. Una vez que las semillas estuvieron secas, se las almacenó en frascos

cerrados dentro del refrigerador (4-5 °C), evitando la transpiración y por ende la pudrición de las semillas (Figura 5).



Fuente: Vázquez (2006)



Fuente: Aguirre (2006)

Figura 5. (A) Cápsula madura vista interna *Epidendrum ssp.* (B) Semillas en frasco de vidrio

18.5.3. Fases para la multiplicación *in vitro* de orquídeas

a) Fase I: Desinfección y establecimiento

- **Preparación de medios de cultivo.** La preparación de medios de cultivo fue en base a las sales de Murashige & Skoog (MS 1962), adicionando compuestos orgánicos (Tiamina 0,4 mg/l y Acido nicotínico 0,5 mg/l) y utilizando como solidificante el agar

a 6 g/l. Concluida la preparación de los medios de cultivo, se los esterilizó en autoclave a 121° C de temperatura y 15 p.s.i. (1,1 kg/cm²) de presión durante 20 minutos.

- **Desinfección de semillas provenientes de cápsulas maduras.** Se elaboraron pequeños sobres de papel filtro, colocándose al interior de ellos pequeñas cantidades de semillas, para luego doblar y sellar los

sobres con grapas. Se sumergieron en agua destilada por 5 minutos, luego, fueron trasladados a un recipiente con solución desinfectante (Hipoclorito de sodio al 1 y al 5%, más una gota de detergente). Los

sobres se mantuvieron durante 5 y 10 minutos en ambas concentraciones, agitando continuamente. Ver Figuras 6, 7 y 8.



Fuente: Aguirre (2006)

A



Fuente: Aguirre (2006)

B

Figura 6. (A) Semillas colocadas a sobres de papel filtro. (B) Semillas engrapadas dentro del papel filtro



Fuente: Aguirre (2006)

A



Fuente: Aguirre (2006)

B

Figura 7. (A) Sobres de semillas en proceso de desinfección con Hipoclorito de Sodio. (B) Semillas desinfectadas listas para su siembra.



Fuente: Aguirre (2006)

A



Fuente: Aguirre (2006)

B

Figura 8. (A) Apertura de los sobres antes de la siembra. (B) Siembra en frascos con medios de cultivo.

- **Desinfección de semillas provenientes de cápsulas verdes.** Con la ayuda del bisturí, se removió cuidadosamente la flor muerta de la cápsula; se la cepilló y jabonó, para

introducirla por 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (enjuagándose con agua destilada por lo menos tres veces). Ver Figura 9.



Fuente: Aguirre (2006)

A



Fuente: Aguirre (2006)

B



Fuente: Aguirre (2006)

C

Figura 9. (A) Limpieza de la cápsula con cepillo e inmersión en hipoclorito de sodio al 1%. (B) Enjuague de la cápsula en agua destilada. (C) Inmersión en alcohol al 95%, y flameado al mechero.

En la cámara de flujo laminar, la cápsula fue sumergida en alcohol al 96% y se pasó rápidamente por el fuego. La cápsula fue transferida a una caja petri, cortándose longitudinalmente. Las semillas se

esparcieron sobre el medio de cultivo preparado para esta fase y contenido en frascos de vidrio. Por último los frascos fueron sellados. Ver Figura 10.



Fuente: Aguirre (2006)

A



Fuente: Aguirre (2006)

B

Figura 10. (A) Corte longitudinal de la cápsula. (B) Semillas esparcidas en el medio nutritivo.

b) Fase II. Germinación de semillas. Durante el desarrollo de la germinación *in vitro*, se evaluó: la contaminación, número de semanas a la presencia de protocormos, y número de semanas a la presencia de plántulas.

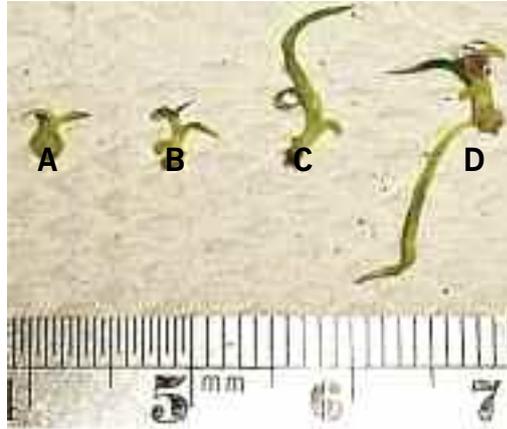
- **Contaminación en la germinación de semillas.** El porcentaje de semillas contaminadas de cápsulas maduras de la especie *H. meleagris*. fue mayor 84,87%, en comparación a *G. ileniana*. 36,47% y *Epidendrum ssp.* 32,11%

($Pr < 0,0001$) y ($Pr < 0,0001$) respectivamente. Esto puede deberse al tamaño de semilla, donde *H. meleagris* posee un tamaño de semilla extremadamente pequeño haciéndolo quizás bastante susceptible a la contaminación.

- **Número de semanas en formar protocormos.** Durante las primeras semanas no se observaron cambios en las semillas, hasta que empezaron a hincharse, y adquirieron un color amarillo intenso, que cambió de verde claro a verde oscuro, formándose los protocormos. Al respecto Arditti (1967) y Pierik (1982) describen que el embrión absorbe agua a través de la testa aumentando de volumen, iniciando la división celular y rompiendo la cubierta seminal para formar el protocormo.

El número de semanas que tardaron en llegar las tres especies a un estado de protocormo, fue una media de ocho semanas en Medios Completos MS (Espinosa y Aguirre, 2002), obtuvieron protocormos de *Rhynchostele* a las 12 semanas en KC, mientras que Serna (1999) tuvo en un promedio de 13 semanas protocormos de la especies *Cattleya* ssp. (Híbrido) y *Cymbidium* ssp. (Híbridas) en medio MS, observándose que estas especies requieren concentraciones de sales completas para su mejor desarrollo.

- **Número de semanas en formar plántulas.** Luego de formarse el protocormo se diferencian los órganos (el meristemo del vástago y en lado opuesto los rizoides), comenzando un período de crecimiento intenso (Arditti, 1967 y Pierik, 1982) por varias semanas o meses, dependiendo de la especie, hasta producir raíces y hojas (McKendrich, 2000).



Fuente: Vázquez (2006)

Figura 11. (A) Protocormo con hojas iniciales. (B) Primeras hojas y rizoides. (C) Hojas verdaderas y primeras raíces. (D) Plántula con hojas y raíces.

Experiencias similares de Serna (1999), en *Cattleya* ssp. y *Cymbidium* ssp. indican que desarrollan hojas y raíces iniciales desde la siembra, a la sexta semana en MS completo (con 0,5 mg de glicina, piridoxina, tiamina, A. nicotínico; 100 mg de m-inositol; 2 mg de BAP y ANA). Mauro *et al.* (1994) indica que las plántulas *in vitro* de híbridos son vigorosas y precoces (Figura 11).

c) Fase III. Trasplante de plántulas. Las semillas luego de germinar y formar los protocormos, empiezan a formar plántulas, las cuales al estar en una densidad muy alta dentro los frascos, requieren ser cambiadas a nuevos frascos para disminuir la densidad y proveerles de los nutrientes requeridos para un mejor desarrollo (Figura 12).

- **Tamaño de plántulas.** Tanto la especie *G. ileniana* como *Epidendrum* ssp., generaron gran cantidad de plántulas por frasco, en cambio *H. meleagris* presentó muy poca cantidad, siendo trasplantadas las tres especies a nuevos medios nutritivos. Rivera (1998), hace referencia que la permanencia de las plantas por más tiempo del indicado en



Fuente: Vázquez (2006)

A



Fuente: Vázquez (2006)

B

**Figura 12. (A) Plántulas listas para ser trasplantadas.
(B) Plántulas trasplantadas en menor densidad.**

el medio de cultivo, puede generar plántulas débiles y elongadas.

d) Fase IV. Aclimatación de plántulas.

- **Preparación de sustratos.** En esta fase se emplearon dos sustratos de prueba (Cuadro 1). Los pedazos de turba

mineralizada fueron aproximadamente de 4 mm de diámetro, y los pedazos de carbón vegetal de 1-1,5 cm, que se mezclaron con tierra vegetal en las proporciones indicadas en el cuadro 1. Del mismo modo se mezcló el helecho arbóreo (*Dicksonia sellowiana*) con carbón y tierra vegetal.

Cuadro 1. Mezcla de sustratos y proporciones

| Sustrato 1 | Sustrato 2 | Proporciones |
|--------------------|-----------------|--------------|
| Turba mineralizada | Helecho arbóreo | 2,5 |
| Carbón | Carbón | 5 |
| Tierra vegetal | Tierra vegetal | 5 |

- **Preaclimatación.** Una vez que las plántulas alcanzan 3 a 5 cm, y las raíces muestran un buen desarrollo y son trasladadas a invernadero para colocarlas dentro de un microtúnel. Sin abrir las tapas de los frascos que contienen las microplántulas se les quita el parafilm, dejándolas por una semana en el microtúnel.

Concluido este periodo, los frascos se destapan y se extraen las plantas. Posteriormente se quita el agar de las raíces

con agua y finalmente, se procede al trasplante en los sustratos correspondientes.

Las plantas son evaluadas en el mismo ambiente durante tres a cuatro meses. Se adiciona fertilizante foliar, insecticidas y fungicidas para prevenir problemas nutricionales, fitosanitarios y de plagas.

- **Aclimatación.** Luego del tiempo transcurrido las plántulas están aptas para ser trasladadas a envases más grandes, para su mayor desarrollo radicular y foliar en invernadero.



Fuente: Vázquez (2006)

A

Fuente: Vázquez (2006)

B

Figura 12. (A) Vitro plántulas preaclimatadas. (B) Vitro plántula aclimatada.

Es importante mencionar que el sustrato con turba mineralizada es una opción a la extracción indiscriminada del helecho arbóreo. Siendo *Dicksonia sellowiana* (helecho arbóreo) el componente del sustrato más recomendado por Silva (1986), y Mckendrik (2000), mencionando que es lo suficientemente poroso, ideal para que sus raíces estén en contacto con el aire y los extremos terminales que presentan una coloración verde (velamen) puedan realizar fotosíntesis.

Por otro lado, el no esterilizar el sustrato proporciona el mayor porcentaje de plántulas aclimatadas en comparación al sustrato esterilizado ($Pr < 0.0001$). Al respecto Caneva (1984) menciona que las especies son epifitas, y en su ambiente natural éstas se desarrollan sobre otras plantas sin ser parásitas, produciendo su propio alimento de la microflora y fauna existente (viviendo en simbiosis con hongos del género *micorriza*).



Fuente: Vázquez (2006)

A

Fuente: Vázquez (2006)

B

Figura 24. (A) Epidendrum spp. a las 4 semanas de preaclimatación. (B) Epidendrum spp. a los 21 meses de establecimiento en invernadero.



Fuente: Vázquez (2006)

A



Fuente: Vázquez (2006)

B



Fuente: Vázquez (2006)

C

Figura 25. (A) *Góngora ileniana* a las 4 semanas de preaclimatación. (B) *G. ileniana* a los 4 meses de aclimatación. (C) *G. ileniana* a los 21 meses de establecimiento en invernadero.

- **Devolución a sus zonas de origen.** La experiencia realizada contempló tanto el uso de técnicas de laboratorio para garantizar la multiplicación de plantas como la devolución de las plantas obtenidas en laboratorio a sus zonas de origen, con la finalidad de poder generar una estrategia sostenible de producción de plantas, la misma que se pretendió realizarla de manera conjunta con los comunarios.

La experiencia inicial mostró alternativas para poder lograr esta producción sostenible, sin embargo, a la hora actual, requiere aún un decidido compromiso de parte de los comunarios para poder ser parte de un programa conjunto de protección de esta riqueza ornamental dentro de características que garanticen sus sostenibilidad.

18.6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El trabajo realizado en laboratorio permitió obtener plántulas *in vitro* por protocormos de orquídeas, siendo el mejor medio de cultivo para *Epidendrum spp.* y *Góngora ileniana* el MS completo con Tiamina (0,4 mg/l) y Ácido nicotínico (0,5 mg/l). En *Huntleya meleagris*,

el mejor medio de cultivo fue el mismo medio diluido al 50%. El mejor sustrato de aclimatación de *Epidendrum spp.* y *G. ileniana* fue la mezcla de carbón vegetal, tierra negra y *Dicksonia sellowiana* sin esterilizar.

La estrategia de trabajo pretendió concebir otras opciones de aprovechamiento de la biodiversidad, promoviendo el desarrollo de las comunidades con un uso sostenible de sus recursos naturales; en ese sentido, las plántulas *in vitro* obtenidas, una vez aclimatadas, fueron entregadas a los comunarios de “El Palmar”. Esta experiencia requiere aún un acompañamiento al proceso con la finalidad de incidir en la propia comunidad sobre la importancia de una conservación a largo plazo de esta riqueza genética a través de estrategias que garanticen el uso sostenible de las orquídeas.

18.7. BIBLIOGRAFÍA

- Aceves, J. 2000. Uso Sustentable de Diversas Orquídeas en Peligro de Extinción, con base Biotecnológica, en la región de los Tuxtles. México, pp. 4. <http://www.uv.mx/iiesca/revista2000/orquideas.htm>.
- Arditti, J. & R. Ernest. 1990. Micropropagation of Orchid. V. Department of Developmental and Cell Biology. University of California, Irvin. California.

- Arditti, J. 1967. Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. *Bot. Rev.* 33, pp. 1-97.
- Bruckner, A.; G. Navarro & W. Ferreira. 2000. Evolución del Paisaje y Alternativas de Ordenamiento Sostenible en la Región del Chapare, Bolivia. *Rev. Bol. Ecol.* 7: 47-65.
- Caneva, S. 1984. Orquídeas. Principales géneros y especies. Su cultivo. Ed. Albastros. Buenos Aires, Argentina.
- Cavero, M.; B. Collantes & C. Patroni. 1991. Orquídeas del Perú. 1ª Parte. Centro de Datos para la Conservación. Lima, Perú, pp. 76.
- Collantes, B. 1995. Conservación. Panorama de las Orquídeas en el Perú. Asociación Peruana de Orquideología. Boletín Vol. 1, Núm. 1. Perú.
- Demauro, M. 1993. Relationship of breeding system torarity in the Lakeside Daisy (*Hymenoxys acaulis* var. *glabra*). *Conserv. Biol.* 7:542-550.
- Dressler, R. & T. Dudley. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid. Editorial Diosiorides. Press. Porlant, Oregon.
- Espinosa G. & L. Aguirre. 2002. Proliferación de *Rhychostele bictoniense* (Orchidaceae) a partir de semillas y explantes de material cultivado *in vitro*. Recuperado de <http://www.iztacala.unam.mx/temas/foropaea/02TB13la.htm>
- Fundación Amigos de la Naturaleza - Bolivia y la Sociedad Boliviana de Botánica. 1998. Orchid Conservation, Research and Development in Bolivia. (Boletín). Santa Cruz, Bolivia.
- Gerlach G. & H. Heider. 2001. Revista de la Sociedad Boliviana de Botánica. Vol. 3(1). Santa Cruz, Bolivia.
- Gelach G. & H. Heider. 2000. Photographer Gongora ileniana. Cristal Mayu, 520 m de Villa Tunari. Cochabamba, Bolivia. Recuperado de: http://atgard.botanik.biologie.uni-muenchen.de/botgart/gerlach/img_db
- Heider, H. & W. Reichl. 2001. Inventarliste der Orchideen im Orchidarium "Villa Tunari". Recuperado de: <http://www.orchidrium.org/proj21.html>.
- Ibisch, P.; A. Boegner; J. Nieder & W. Barthlott. 1996. How diverse are neotropical epiphytes? An analysis based on the "Catalogue of flowering plants and gymnosperms of Peru. *Ecotropica* 2(2): 13-28.
- Ibisch, P.; K. Columba & S. Reichle. 2002. Plan de Conservación y Desarrollo Sostenible para el Bosque Seco Chiquitano, Cerrado y Pantanal Boliviano. Editorial F.A.N. Santa Cruz, Bolivia.
- Kessler M.; A. Smith; A. Acebey & J. Gonzales. 2001. Registros adicionales de pteridófitos del Parque Nacional Carrasco, en el departamento de Cochabamba, Bolivia. *Sociedad Boliviana de Botánica* 3(1/2): 146-150.
- Loeschcke, V.; J. Tomiuk; & K. Jain. 1994. Introductory remarks: Genetics and conservation biology. In *Conservation Genetics*, Eds. V. Loeschcke, J. Tomiuk, & K. Jain, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. Pp. 3-8.
- Mauro, M.; D. Sabapathi & R. Smith. 1994. Influence of benzylaminopurine and alpha-naphthaleneacetic acid on multiplication and biomasa production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants.
- Mckendrik, S. 2000. Manual para la Germinación in vitro de Orquídeas. Recuperado de [http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).doc](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).doc)
- Menacho, J. 2004. Evaluación de medios de Cultivo para la Propagación "in vitro" de dos especies endémicas de orquídeas *Mormodes morenoi* (Vasquez y Dodson) y *Oncidium stacyi* (Garay) de Bolivia. Tesis de grado. Universidad Autónoma "Gabriel René Moreno". Facultad de Ciencias Agrícolas. Carrera de Biología. Santa Cruz, Bolivia. 63 p.
- Menini L.; V. Almeida & R. Forzza. 2004. A família Orchidaceae na Reserva Biológica da Represa do Grama - Descoberto, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 55(84): 137-156.
- Navarro, G. & M., Maldonado. 2002. Geografía Ecológica de Bolivia: Vegetación y Ambientes Acuáticos. Ed. Centro de Ecología Simón I. Patiño - Departamento de Difusión. Cochabamba, Bolivia. Pp.81: 590-598.
- Navarro, G.; & W. Ferreira. 2000. Caracterización Ecológica y Biodiversidad de la Cuenca Oeste del Río Ichilo. Cochabamba, Bolivia. *Rev. Bol. Ecol.* 7: 3-23.
- República de Bolivia. 1990. Decreto Supremo Nº 22641. Presidencia de Jaime Paz Zamora. Noviembre 8 de 1990.
- República de Bolivia. 1999. Decreto Supremo Nº 25458. Presidencia de Hugo Banzer Suarez. Julio 21 de 1999.
- Rivera, G. 1998. Cultivo de Orquídeas por Semilla. Tomado del Libro: Orquídeas, Generalidades y Cultivo. 6 p. Recuperado de: <http://www.ticorquideas.com/cartas/.doc>.
- Serna, L. 1999. Propagación *in vitro* de orquídeas a partir de semilla sexual. 3 p. Recuperado de <http://acad.ucaldas.edu.co/jcg/fitotecnia/boletin/34/PROPAGACION%20IN%20VITRO%20DE%20ORQUIDEAS%20A%20PARTIR%20DE%20SEMILLA%20SEXUAL.htm>.
- Silva, W. 1986. Cultivo de Orquídeas no Brasil. 6ª Ed. Nobel. São Paulo, Brasil. 94 p.
- Tapia, M. 2003. Micropropagación de Orquídeas. IBT. Lima, Perú. 6 p.
- Van Den Hurk, A. 1999. Complementariedad entre la conservación *ex situ* y la *in situ*. Memorias de la

segunda reunión Boliviana sobre Recursos Fitogenéticos de Cultivos Nativos. Editado en la Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia.

Vasquez, R. 1995. Las Orquídeas en Bolivia. Recuperado de: www.bolivianet.com/cultura/encuentro/orquideas.

Vasquez, R. & P. Ibisch. 2000. Orquídeas de Bolivia, Diversidad y Estado de Conservación, Subtribu Pleurothallidinae. FAN. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

Capítulo 19

Elementos prácticos de estadística y diseño experimental para investigación en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Sergio Daniel Moreira Ascarrunz Ph.D.

19.1 INTRODUCCIÓN

La investigación es importante para el descubrimiento, el aprendizaje y el desarrollo de prácticas nuevas y eficientes. Aunque es verdad que algunos avances científicos han resultado de una manera casual y afortunada, la mayoría de los descubrimientos se hacen utilizando un enfoque experimental sistemático, en el cual se definen tratamientos que son evaluados en condiciones controladas. Durante estos experimentos, se toman datos, y estos se evalúan utilizando algún tipo de análisis estadístico para evaluar la efectividad de cada tratamiento y resolver o corregir el problema de estudio.

Este capítulo pretende ser una introducción a los elementos básicos de la investigación en cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Más específicamente, pretende demostrar el uso de varios diseños experimentales y métodos estadísticos utilizados para analizar e interpretar datos, así como hacer algunas consideraciones para presentar resultados mediante tablas y gráficos. El objetivo principal de este capítulo es mostrar los métodos estadísticos más apropiados para analizar resultados de investigaciones en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales e incrementar su confiabilidad.

En general, el capítulo asume que el lector posee conocimientos básicos de Estadística y Diseños Experimentales, por lo que no se definen explícitamente muchos conceptos básicos.

19.2. PRÁCTICAS ASOCIADAS A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

19.2.1. Establecimiento de la hipótesis y de los objetivos experimentales

La investigación comienza revisando lo que se sabe acerca del problema. Se deben leer libros y artículos de investigación publicados y esta información se debe combinar con el conocimiento que se tiene de experiencias previas. Se utiliza esta base para formular una hipótesis y objetivos experimentales que puedan ser evaluados objetivamente.

La hipótesis más utilizada en investigación *in vitro* es la “hipótesis nula”. Esta hipótesis indica que todos los tratamientos provocarán una respuesta similar en todos los tejidos vegetales sometidos a dichos tratamientos. El rechazo de la hipótesis nula a través de análisis estadístico implica que los tejidos experimentales reaccionaron de forma diferente a los tratamientos utilizados. Los procedimientos estadísticos para probar

hipótesis de investigación se discutirán más adelante en el capítulo.

19.2.2 Selección del diseño experimental

Una vez que la hipótesis y los objetivos experimentales se hayan definido, se pueden seleccionar los principales componentes del experimento. Éstos incluyen la selección de tratamientos y materiales de apoyo requeridos para el experimento. Los materiales de apoyo son elementos necesarios para el experimento pero que no son tratamientos experimentales. En estudios de cultivo de tejidos vegetales estos materiales pueden ser recipientes de cultivo, componentes del medio, tipo y concentración de reguladores de crecimiento, estado de solidificación del medio, ambiente de crecimiento (fotoperiodo e intensidad de luz), o cualquier otro elemento importante para el crecimiento del explante. Los materiales de apoyo no deben interferir con los efectos de los tratamientos sobre los tejidos vegetales. El conocimiento de experimentos previos, exitosos o no, provee información útil para seleccionar tratamientos y materiales de apoyo.

19.2.2.1 Tratamientos, factores y niveles

Los tratamientos son condiciones claramente definidas, cuyos efectos pueden ser medidos y comparados experimentalmente en condiciones controladas (Cox & Reid, 2000; Montgomery, 2001). Ejemplos de tratamientos utilizados en investigación *in vitro* incluyen recipientes de cultivo (tubos, magentas, frascos, etc.) y sus contenidos (formulaciones de sales del medio de cultivo, tipo o concentración de reguladores de crecimiento vegetal, etc.), condiciones ambientales fuera del recipiente de cultivo (temperatura, fuente de luz, calidad, intensidad, fotoperiodo, etc.), o factores inherentes al explante (genotipo, tamaño o edad del explante, edad o etapa de maduración de la planta madre, pre-acondicionamiento, etc.). Se puede elegir

probar un factor de tratamiento a la vez o probar varios factores simultáneamente (por ejemplo, genotipo y concentración de reguladores de crecimiento). Este último caso es bastante popular en estudios *in vitro* pues muchos factores suelen interactuar unos con otros. Adicionalmente, se puede ahorrar tiempo y materiales al conducir un experimento en lugar de dos (Compton, 1994). Sin embargo es importante darse cuenta de que los experimentos en los que se prueban dos o más factores a la vez suelen tornarse muy voluminosos y difíciles de manejar, requiriendo mucho más esfuerzo por parte del investigador. Adicionalmente, es importante que los tratamientos y los niveles de los tratamientos sean escogidos de acuerdo a los objetivos experimentales e incluyan un amplio rango de respuestas. Esto es importante para que el nivel óptimo pueda ser fácilmente identificado.

Una vez que los tratamientos y los materiales de apoyo hayan sido seleccionados se pueden elegir unidades experimentales, unidades observacionales y el diseño experimental.

19.2.2.2 Unidades Experimentales y unidades observacionales

Por definición, una unidad experimental (UE) es la unidad más pequeña que recibe un mismo y único tratamiento (Cox & Reid, 2000). En la mayoría de los experimentos de cultivo de tejidos la UE es el recipiente de cultivo. La unidad observacional (UO) es el objeto que está siendo observado o medido (Compton, 2011). Los explantes son la UO más común en estudios de cultivo de tejidos porque la mayor parte de los investigadores están interesados en descubrir tratamientos que optimicen su desarrollo y desempeño. Sin embargo, un explante puede ser considerado a la vez una UE y una UO en casos en los que exista un solo explante por recipiente de cultivo (Compton & Mize, 1999). El número de UEs requeridas por tratamiento se determina una vez que la UE y las UO son elegidas.

La replicación o repetición ocurre cuando más de una UE es evaluada para cada tratamiento y es necesaria para estimar los efectos de los tratamientos y el error experimental (Compton, 2011; Montgomery, 2001). El número de repeticiones o réplicas por tratamiento se basa en el grado de variabilidad esperado y en la medida en la que el investigador desea detectar los efectos de los tratamientos (Compton, 2011). La mayoría de los investigadores se basan en la experiencia previa y en revisión de literatura para determinar el número de réplicas a utilizarse ya que réplicas insuficientes pueden reducir la capacidad de los procedimientos estadísticos para detectar diferencias entre tratamientos. También se puede utilizar la siguiente ecuación (Lyman Ott & Longnecker, 2001) para determinar el número de repeticiones del experimento que se está planificando:

Donde r es el número de repeticiones a ser calculado; $Z_{\alpha/2}$ es el valor de la distribución estándar para el nivel de confianza deseado (si el nivel de confianza deseado es de 95%, el valor de z será 1.96); s es un estimador de la variabilidad, usualmente obtenido de experiencias anteriores o experimentos piloto (valor mayor-valor menor/4); y E es el nivel de precisión deseado y decidido por el investigador (se expresa en unidades de la variable de respuesta). En general, se puede afirmar que por lo menos se requieren tres réplicas por tratamiento para poder calcular medias y medir el error.

19.2.2.3. Diseños experimentales

Las unidades observacionales se asignan aleatoriamente para replicar las UEs y son luego transferidas a las condiciones experimentales utilizando un diseño experimental específico. Un diseño experimental es un

método utilizado para asignar aleatoriamente UEs replicadas de manera tal que se limite el sesgo del experimentador y los efectos de factores que no son tratamientos sobre las UOs. Los diseños experimentales más comúnmente usados en investigación *in vitro* son el diseño completamente aleatorizado, el diseño de bloques completos aleatorizados, el diseño de bloques incompletos aleatorizados y el diseño de parcelas divididas (Compton, 2011). Al elegir un diseño experimental es importante examinar los materiales de apoyo y la población de interés para identificar posibles variaciones y escoger así un diseño que sea simple de emplear, eficiente para medir los efectos de los tratamientos y los residuales y que se ajuste a los objetivos experimentales (Compton & Mize, 1999).

Diseño Completamente Aleatorizado (DCA)

El diseño completamente aleatorizado (DCA) es el más comúnmente utilizado en investigación *in vitro* porque es fácil de usar y tiene un esquema de aleatorización sin un patrón determinado. Esto permite a los investigadores maximizar el número de réplicas y utilizar ya sea el mismo o diferente número de réplicas (Compton, 2011). Esto es importante porque números diferentes de réplicas ocurren usualmente en estudios de cultivo de tejidos vegetales debido a contaminación o muerte de los explantes. Estadísticamente, este diseño es el más eficiente porque permite a los investigadores maximizar los grados de libertad (gl) del error, lo que es importante para detectar diferencias entre tratamientos durante el análisis estadístico (Compton, 2011; Compton & Mize, 1999). Sin embargo, este diseño tiene algunos problemas. Una desventaja del DCA es que las UEs deben ser homogéneas para que el análisis de datos sea efectivo. Las situaciones en las que las UEs o las UOs sean altamente heterogéneas incrementan la variabilidad en el experimento y disminuyen las posibilidades de que las diferencias entre tratamientos sean detectadas durante el análisis estadístico (Compton & Mize, 1999; Compton, 2011).

Diseño de Bloques Completos Aleatorizados (DBCA)

Las desigualdades o inconsistencias en los factores ambientales en la sala de crecimiento, diferencias entre plantas madres u hojas a partir de las cuales se obtuvieron explantes o variabilidad entre el personal técnico son factores que no son tratamientos pero que introducen variabilidad al experimento. Los diseños experimentales que ubican a las UEs replicadas en unidades similares (bloques) se utilizan cuando hay un gran grado de variabilidad entre UEs. Cuando se utilizan bloques, solamente los factores que son medibles pueden ser objeto de “bloqueo” (Compton, 2011). Por otro lado, es imposible tener la absoluta seguridad de si se va a requerir o no “bloqueo” cuando se está diseñando un experimento. Se puede determinar la necesidad de “bloqueo” conduciendo un pequeño experimento preliminar y hacer pruebas para el “bloqueo” en el análisis estadístico. Lo más realista es medir la eficiencia del “bloqueo” en relación al DCA (ER) después de haber realizado el experimento. Esta medición se hace con la siguiente ecuación Lyman Ott & Longnecker, 2001):

Donde ER es la eficiencia relativa del bloqueo, b es el número de bloques utilizados en el experimento, t es el número de tratamientos utilizados, CMB es el valor del cuadrado medio del factor bloque en el ANVA y CME es el valor del cuadrado medio del error en el ANVA. Si el valor de ER resulta mucho mayor a 1, indica que el bloqueo fue eficiente y que muchas más repeticiones hubieran sido necesarias si se utilizaba simplemente el DCA. Por el contrario, si el valor de ER es muy cercano a 1, indica que el bloqueo no fue eficiente y que se redujeron gl del error sin ningún beneficio, lo que restaría sensibilidad al ANVA.

El diseño de bloques completos aleatorizados (DBCA) agrupa las réplicas de cada tratamiento en bloques. Esto crea un alto grado de uniformidad entre tratamientos dentro de un bloque y reduce la variación no debida a tratamientos. Es importante que todos los explantes en un bloque sean tan uniformes como sea posible para que el diseño sea efectivo. Explantes de la misma hoja o de la misma planta madre usualmente tienen similar habilidad de regeneración, y cada hoja puede constituirse en un bloque (Compton, 2011). Usar el DBCA en este caso maximizaría la uniformidad dentro de los bloques al utilizar la uniformidad presente en cada hoja.

Diseño de Bloques Incompletos Aleatorizados (DBIA)

Existen situaciones en las que existe muy poco material inicial para producir el número de explantes necesarios para establecer bloques completos y que cada bloque contenga una réplica de cada tratamiento. En estos casos, el diseño de bloques incompletos aleatorizados (DBIA) puede ser la mejor opción (Compton & Mize, 1999). Como en el caso del DBCA este diseño utiliza el “bloqueo” para mantener la homogeneidad pero en este caso no todos los tratamientos están presentes en cada bloque. El número de bloques, de réplicas, y el número de veces que cada par de tratamientos aparecen juntos en un mismo bloque se determina con las siguientes ecuaciones (Compton, 1994; Cox & Reid, 2000):

Donde k es el número de tratamientos en cada bloque, b es el número de bloques, t es el número total de tratamientos, r es el número de veces que se repite cada tratamiento y es el número de veces que cualquier par de tratamientos aparecen en el mismo bloque.

Aunque el DBIA es un excelente diseño para estudios *in vitro*, usualmente se prefiere el DBCA si es que existe una cantidad adecuada de material vegetal para formar bloques completos (Mize, *et al.*, 1999).

Diseño de Parcelas Divididas (DPD)

Otro diseño que utiliza el “bloqueo” es el diseño de parcelas divididas (DPD). Este diseño es más utilizado cuando se examinan simultáneamente dos factores de tratamiento con diferentes grados de variación (Lyman Ott & Longnecker, 2001; Montgomery, 2001). El DPD utiliza dos niveles separados de aleatorización para cada factor. El factor de tratamiento con el grado de variabilidad más grande se asigna a las parcelas grandes, llamadas parcelas principales, y el factor de tratamiento con menos variación es asignado a las sub parcelas. Las parcelas principales pueden ser completamente aleatorizadas o dispuestas en bloques. Comúnmente, las hojas más jóvenes completamente expandidas son las más competentes para la organogénesis de brotes. Esta circunstancia hace que muchas veces los investigadores tengan que utilizar hojas de varias plantas madres diferentes para obtener suficiente material de explantes para los experimentos. Esto usualmente introduce variabilidad adicional en el experimento (Compton, 2011). Pese a que el DPD es el diseño experimental más eficiente cuando se examinan dos factores de tratamiento con diferentes grados de influencia sobre la respuesta de los explantes, su establecimiento, la toma de datos, así como el análisis de datos y la interpretación son más complicados que para los otros diseños.

19.3. SUBMUESTREO

Muchos investigadores encuentran que es beneficioso cultivar múltiples explantes en un mismo recipiente de cultivo. Esto economiza recursos y tiempo pero conduce a una situación en la que múltiples mediciones se hacen para cada réplica (recipiente de

cultivo). Estadísticamente, esto se conoce como sub muestreo o “medidas repetidas” (Compton & Mize, 1999). El sub muestreo no es un diseño experimental sino una modificación que puede ser utilizada con cualquiera de los diseños discutidos previamente. El sub muestreo se puede utilizar con cualquiera de los diseños descritos previamente. Cultivar múltiples explantes en un mismo recipiente de cultivo no solo economiza recursos y espacio sino que también maximiza el número de UOs y minimiza la variación asociada con los explantes al hacer múltiples medidas por recipiente (Compton, 2011). Una desventaja del sub muestreo es que el análisis estadístico es ligeramente más complicado en comparación a cuando no se utiliza (Compton & Mize, 1999).

19.4. REPETIBILIDAD

Cualquier experimento debe ser realizado más de una vez para confirmar la validez de los resultados. Sin embargo, los investigadores usualmente se preguntan cuántas veces se debe repetir un experimento. La mayoría de los estadísticos y de los investigadores piensan que un experimento se debe conducir por lo menos dos veces para validar los resultados (Compton, 2011). El número de veces que un experimento será conducido debe decidirse durante la planificación y antes de la primera vez que se conduzca el experimento. Repetir un experimento no garantiza un resultado similar ni aun si se utilizaran las mismas plantas madre. Adicionalmente, el tiempo puede ser introducido como un factor que no es tratamiento si han ocurrido cambios en la fisiología de la planta madre al incrementar su edad o al entrar a otra fase de crecimiento. Ambos casos pueden ocasionar diferencias en los resultados experimentales entre diferentes repeticiones o “corridas” del experimento. Los investigadores tienen generalmente dos opciones cuando se obtienen diferencias entre dos corridas: Se puede repetir todo el

experimento desde un inicio (todas las corridas), lo que puede ser costoso; o se puede examinar cada corrida como un bloque o una parcela principal. La mejor opción sería observar primero los datos de las dos corridas y determinar si existen tendencias similares. Si las tendencias son similares no debería repetirse el experimento, pero las circunstancias que causaron las diferencias deberían ser examinadas y explicadas. Si los resultados obtenidos de las dos corridas son contrastantes, el experimento debería repetirse. Si persistieran las diferencias entre corridas debería examinarse la posibilidad de efectos estacionales sobre los resultados. La decisión de qué hacer si se observan diferencias entre corridas del experimento debe hacerse durante la fase de planificación del mismo.

19.4.1. Selección de datos y planificación del análisis estadístico

Los datos obtenidos deberían ayudar a evaluar los efectos de los tratamientos de acuerdo a los objetivos experimentales. Si se toman datos inapropiados es poco probable que el investigador pueda evaluar la respuesta del explante y cumplir los objetivos experimentales. Por lo tanto, es importante discutir durante la fase de planificación con colegas y estadísticos qué observaciones deberían tomarse.

La mayoría de los investigadores examinan detenidamente la literatura relevante y combinan la información obtenida con experiencias previas para determinar qué observaciones tomar durante los experimentos. El número y porcentaje de explantes que producen brotes, el número de brotes por explante (o explantes en una misma caja Petri) y longitud de los brotes son observaciones que la mayoría de los investigadores tomarían para evaluar la competencia de los explantes. Sin embargo, para obtener la mayor cantidad de información del proyecto el investigador puede decidir tomar observaciones

adicionales tales como el número y porcentaje de explantes que han producido callos, la cantidad de callo producida por explante (medida por peso o por volumen) y el nivel de ploidía de los regenerantes así como observaciones histológicas periódicas de los explantes durante el experimento para establecer el modo de regeneración de brotes (directa o indirecta).

Las observaciones hechas durante el experimento se anotan en hojas de datos para facilitar el procesamiento de los datos. Esta actividad puede conducir a errores si estas hojas no están bien organizadas. Diseñar las hojas de datos de la forma en la que las observaciones se introducirán a una computadora ayuda a evitar errores durante la transcripción de los datos. Muchos softwares estadísticos organizan e imprimen hojas de datos para ser usadas por los investigadores (Compton, 2006) (Ver Anexo). Las hojas de datos deberían diseñarse durante la planificación para asegurarse de que el investigador está considerando observaciones que efectivamente midan el efecto de los tratamientos.

La naturaleza de los datos influye en el tipo de procedimiento estadístico que se deberá utilizar. La mayoría de las observaciones hechas en experimentos de cultivo de tejidos vegetales resultan en datos que pueden clasificarse como continuos (longitud de brotes, longitud de raíz o tamaño de embrión), datos de conteo (número de brotes, embriones o protocormos por explante o callo); datos binomiales (porcentaje de respuesta o de no respuesta), o datos multinomiales (categorías tales como brote, raíz, callo o sin respuesta) (Mize, *et al.*, 1999). Por consiguiente, los métodos estadísticos utilizados para evaluar los efectos de los tratamientos varían para cada tipo de dato (Compton, 2006). Esquematizar las fuentes de variación y los grados de libertad durante la planificación puede ayudar a identificar los procedimientos más apropiados para el tipo de dato obtenido

y los objetivos experimentales. La mayoría de los investigadores usan el Análisis de Varianza (ANVA) para evaluar los datos. El ANVA es adecuado para analizar datos continuos pero no para analizar datos de conteo, binomiales o multinomiales sin una manipulación previa.

19.4.2. Conducción del experimento

La experimentación puede comenzar una vez que se ha terminado y revisado cuidadosamente la planificación. El sesgo personal se debe evitar en todas las fases del experimento. Al establecer un experimento el sesgo se puede evitar utilizando la estructura del diseño experimental (Mize, *et al.*, 1999). No se deben cortar todos los explantes de un mismo tratamiento a la vez. Se deben disponer los recipientes de cultivo de acuerdo al esquema de aleatorización seleccionado y colocar los explantes en el recipiente de acuerdo al diseño.

También es importante evitar cualquier circunstancia que introduzca error en el experimento. Muchos errores ocurren cuando el investigador se cansa. El tiempo requerido para cada fase del experimento se debe estimar durante la planificación. Los trabajos exigentes se deben escalonar para evitar cansancio. Los errores también ocurren cuando se transfieren los explantes a medio fresco. Se deben ordenar cuidadosamente los recipientes de cultivo (tanto los nuevos como los que se están usando) en la cámara de flujo laminar de tal manera que se reduzcan las oportunidades para cometer errores. Se debe ser cuidadoso al etiquetar cada recipiente con la información correcta. Si se utilizan códigos, el detalle de los códigos se debe anotar en el cuaderno de laboratorio. Siempre se debe ser consciente de que hay muchas maneras de introducir errores debido al operador durante el experimento. Se deben tomar las precauciones necesarias para asegurar una experimentación segura, con precisión y exactitud.

19.4.3. Toma de datos

Al igual que al establecer un experimento, se debe utilizar la estructura del experimento al realizar observaciones y tomar datos. Por ejemplo, se deben tomar los datos de las réplicas en un bloque antes de pasar al siguiente bloque. Esto ayuda a evitar el sesgo. Se debe ser meticuloso al tomar datos y tomarse el tiempo necesario para esta actividad. Un procedimiento de toma de datos poco cuidadoso introduce inconsistencias y errores a los datos. Es recomendable tener descansos durante la toma de datos para evitar el cansancio y los errores que se introducen a causa de este. Muchas observaciones son agotadoras para la vista por lo que es muy importante descansar periódicamente durante la toma de datos.

Las hojas de datos completadas deben ser revisadas para encontrar errores. Entradas erróneas de datos conducen a una incorrecta evaluación de los tratamientos y a una interpretación incorrecta (Mize, *et al.*, 1999). Es necesario asegurarse de que los datos de cada tratamiento caigan dentro de límites esperados. Los datos fuera de estos límites se denominan “valores atípicos” y pueden deberse a errores en la lectura, toma o transcripción de los datos, o pueden ser valores obtenidos de tejidos vegetales con problemas inherentes o mutaciones genéticas. Estos valores atípicos pueden descartarse. Sin embargo, se debe actuar con mucho cuidado al eliminar datos ya que esto puede introducir inintencionalmente un sesgo, lo que puede afectar el resultado del experimento, además de comprometer éticamente el estudio. Se pueden utilizar varios procedimientos estadísticos para detectar valores atípicos y son de utilidad para reducir el sesgo al editarlos (Lyman Ott & Longnecker, 2001). Los códigos de los tratamientos se deben examinar mientras se revisan los datos y no se debe asumir que estos códigos fueron introducidos correctamente. Los errores asociados con la entrada de códigos se

pueden examinar calculando la media de las variables codificadas. La edición de los datos se puede facilitar imprimiendo las hojas de datos y revisándolas cuidadosamente. Este es un trabajo laborioso y que demanda mucho tiempo pero vale la pena el esfuerzo.

El almacenamiento de datos previo al análisis estadístico merece una mención aparte. Lo más recomendable para almacenar los datos obtenidos es construir una base de datos. Para esto se debe utilizar programas de software específicamente diseñados para este fin (conocidos como sistemas de manejo de bases de datos o SMD). El más conocido es Microsoft Access, que no es de acceso libre, pero cuenta con opciones de acceso libre tales como Open Office Base (www.openoffice.org) y Libre Office Base (www.libreoffice.org). Estos sistemas son básicamente sistemas relacionales, que relacionan tablas entre sí. Estos sistemas permiten recolectar, almacenar, ordenar y exportar datos, además de muchas otras funciones. Es recomendable utilizar estas herramientas, y no las más comúnmente usadas (como Microsoft Excel) debido a que permiten manejar fácilmente grandes cantidades de datos; permiten filtrar, ordenar y actualizar datos con facilidad; ayudan a reducir los errores e inconsistencias al ingresar los datos y hacen más eficiente el uso del tiempo. La base de datos también debe ser planificada en base al tipo de datos y a los objetivos experimentales, tratando siempre de incluir en la base de datos la mayor cantidad de datos posible.

19.5. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Los datos se deben analizar estadísticamente e interpretar tal como se planificó. Como se mencionó antes, la naturaleza de los datos influye en los resultados y en la interpretación del análisis estadístico. Los investigadores deben elegir el procedimiento de análisis más adecuado para las observaciones tomadas y para los objetivos experimentales. Al analizar

los datos, se conduce primero un análisis general para determinar si existen diferencias entre los niveles de los tratamientos. Posteriormente se realiza un análisis de las medias de los tratamientos si se detectan diferencias en el análisis general (Compton, 1994; Mize, *et al.*, 1999; Compton, 2011).

19.5.1. Análisis de datos continuos

Los datos continuos se distribuyen normalmente y los tratamientos tienen varianzas similares (Mize, *et al.*, 1999). Por esto, el ANVA es adecuado para analizar este tipo de datos. Durante el ANVA, el valor de cada observación se sustrae de la media general. Las diferencias entre estos valores son consideradas errores aleatorios (residuales) y se utilizan para el análisis (Mize, *et al.*, 1999). Se crea un modelo que identifica las variables dependientes (observaciones registradas) y las variables independientes (tratamientos, interacciones entre tratamientos) basado en el diseño experimental utilizado. La influencia de las variables independientes sobre las variables dependientes se prueba de acuerdo al modelo. En el ANVA se genera una tabla resumen que muestra los resultados del modelo probado (Lyman Ott & Longnecker, 2001; Mason, *et al.*, 2003). Esta tabla incluye las fuentes de variación, los grados de libertad (gl), las sumas de cuadrados (SC) el cuadrado medio del error (CME), el estadístico F (F) y las estimaciones de la probabilidad (p) de que un resultado similar se obtenga la siguiente vez que se conduzca el experimento bajo condiciones similares (Compton, 2011).

Los valores de p iguales o menores a 0.05 se consideran significativos. Este nivel ha sido escogido por la mayoría de los investigadores porque el 0.05 indica que se obtendría un valor similar el 95% de las veces que el experimento sea repetido, lo que se traduce en un alto nivel de confianza para el resultado. Otra razón para seleccionar el 0.05 es que la mayoría de las revistas científicas exigen que

los investigadores hagan sus pruebas a este nivel de significancia.

El ANVA para experimentos en los que se utilizan bloques se realiza de manera distinta a cuando se utiliza el DCA. Cuando se utiliza el DBCA, se debe especificar el bloque en el modelo (Compton, 1994). Al especificar los bloques en el modelo se instruye al ANVA separar la variación asociada con los bloques del error experimental, lo que resulta en menor valor del CME y un mayor valor de F para el tratamiento. Esto incrementa la sensibilidad del ANVA incrementando la probabilidad de detectar diferencias entre tratamientos al segregar variación no asociada a los tratamientos.

El ANVA es un poco más complicado cuando se utiliza un DBIA. Esto se debe a que se tienen que generar dos modelos. Uno similar al del DCA y otro para generar un valor a utilizarse en los bloques incompletos. Los valores calculados para tratamientos y bloques incompletos se utilizan para construir la tabla de ANVA, calcular el valor de F y obtener el valor asociado de p para los tratamientos.

El ANVA es el método preferido por la mayoría de los investigadores porque es fácil de realizar, se puede utilizar para evaluar datos obtenidos de virtualmente todos los diseños experimentales y genera un valor del CME que es considerado el mejor estimador del error experimental (Mize, *et al.*, 1999). El ANVA provee un buen análisis general ya que mide con precisión como se relacionan los tratamientos unos con otros, siempre que se utilice bajo las circunstancias apropiadas.

19.5.2. Análisis de datos de conteo

Los datos de conteo no se distribuyen normalmente porque las varianzas de los tratamientos son iguales a la respuesta promedio de los tratamientos (Quinn & Keough, 2002). Debido a su distribución, los

datos de conteo deben analizarse utilizando la regresión de Poisson (Mize, *et al.*, 1999). Este método estadístico es el más adecuado para analizar datos de conteo porque utiliza un valor logarítmico de la media de las cuentas, lo que normaliza los datos durante el análisis. La regresión de Poisson calcula un coeficiente que se divide por el error estándar para determinar, a través del estadístico z , si el modelo es significativo.

Muchos investigadores utilizan el ANVA para analizar datos de conteo. Desafortunadamente esto no es confiable cuando los valores de conteo observados son menos de 10 ($n < 10$) (Mize, *et al.*, 1999). Debido a que el número de órganos regenerados por explantes en estudios de organogénesis adventicia y de embriogénesis es típicamente bajo (menor a 10), usualmente está más que justificado el uso de la regresión de Poisson. En experimentos en los cuales se regeneran más de 10 órganos por explante (por ejemplo, micropropagación utilizando brotes apicales), tanto el ANVA como la regresión de Poisson pueden dar resultados similares (Mize, *et al.*, 1999). Sin embargo, en general se considera que el ANVA no debería utilizarse para analizar datos de conteo independientemente de cuan grandes sean estos valores (Compton, 2011). Por consiguiente, puede considerarse en el mejor interés del investigador transformar los datos de conteo en todas las situaciones.

19.5.3. Análisis de datos binomiales

Los datos de respuesta (también conocidos como datos binomiales) describen observaciones relacionadas a la habilidad de los explantes de responder a un tratamiento dado. Estos datos se generan para evaluar la influencia de los tratamientos en la capacidad de regeneración y tienen una distribución binomial que ocasiona que las varianzas de los tratamientos sean dependientes del "éxito" de los explantes (Mize, *et al.*, 1999). Los porcentajes calculados en estas observaciones

usualmente se consideran importantes porque los investigadores están interesados en identificar tratamientos que optimicen la respuesta de los explantes. La capacidad de optimizar la respuesta de los explantes se traduce directamente en incrementos de ganancias para negocios de cultivo de tejidos vegetales, plantas de micropropagación, o investigadores en biotecnología interesados en usar la tecnología de ADN recombinante para insertar transgenes en tejidos vegetales.

Muchos investigadores utilizan el ANVA para analizar datos de respuesta. Esto es desafortunado porque, como se explicó anteriormente, el ANVA asume que los datos están normalmente distribuidos y que las varianzas de los tratamientos son iguales. Debido a que las varianzas de los tratamientos en datos de respuesta son dependientes del “éxito” de la respuesta, los resultados del ANVA no son confiables. La regresión logística es el procedimiento estadístico más adecuado para analizar datos de respuesta ya que el procedimiento no produce estimaciones separadas del error experimental, sino que calcula un coeficiente especial y un valor de error estándar para llegar a un estadístico de prueba (estadístico z) que determina la significancia estadística (Mize, *et al.*, 1999).

Antes de analizar datos de respuesta es importante determinar si existen tratamientos en los cuales la respuesta no ha variado. Esto usualmente ocurre cuando todos o ninguno de los explantes responden al tratamiento. Estos valores deben ser cambiados o eliminados antes del análisis (Mize, *et al.*, 1999). Si se toma la decisión de cambiar los valores, los valores de 0 (cero) se deben cambiar a valores ligeramente superiores (0.000001) y los valores de 100% se deben reducir ligeramente (0.999999). Es importante decidir durante la planificación si estos valores serán alterados o eliminados. También se debe indicar si se eliminaron tratamientos o se alteraron valores cuando se estén escribiendo los reportes o los manuscritos del estudio.

19.5.4. Análisis de experimentos con sub muestreo

La mayoría de los investigadores cultivan varios explantes en un recipiente de cultivo (sub muestras) para ahorrar tiempo y recursos, pero analizan los datos como si no se hubiera utilizado el sub muestreo. Esta acción es incorrecta porque el sub muestreo reduce la variación introducida en el experimento al cultivar múltiples explantes por recipiente (Compton & Mize, 1999). Se pueden utilizar dos métodos para analizar observaciones hechas cuando se utiliza el sub muestreo. Las observaciones de cada explante en un recipiente se pueden combinar, obteniendo un solo valor por recipiente. En esta situación, el modelo usado en el análisis general (ANVA) se escribiría como si no se hubiera utilizado el sub muestreo (Compton, 2011). Un método alternativo sería hacer las observaciones de cada explante en un recipiente de cultivo y anotarlas individualmente. Sin embargo, el modelo debe ser escrito de manera tal que los gl y la SC asociados al sub muestreo estén separados del error experimental. Este método es el preferido por investigadores que desean documentar la variación asociada con los explantes. Si el error de sub muestreo no es separado en esta situación, los gl , la SC y el CM del error terminarán “inflados”, resultando en un valor más pequeño de F para los tratamientos de interés, lo que reduce la probabilidad de que se detecten diferencias entre tratamientos. El sub muestreo se puede utilizar con un solo factor, con experimentos factoriales y con cualquiera de los diseños experimentales discutidos previamente.

19.6. MÉTODOS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS

Una vez que se ha obtenido un valor significativo en la prueba estadística preliminar (ANVA, regresión de Poisson o regresión logística), el investigador debe dilucidar diferencias específicas entre

tratamientos. Esto no es un problema cuando existen solamente dos tratamientos pues la prueba general por sí sola es suficiente para determinar diferencias estadísticas. Sin embargo, la mayoría de los investigadores prueban más de dos tratamientos, lo que requiere un análisis posterior. La forma más fácil de comparar medias de tratamientos es ordenarlas en orden ascendente o descendente y escoger el mejor tratamiento ignorando cualquier procedimiento estadístico o cualquier variación entre UEs o UOs (Compton, 2011). Es importante considerar variaciones en los tratamientos al comparar medias porque las medias por sí solas pueden no representar con precisión como las UOs respondieron a los tratamientos. Existen muchos procedimientos de separación de medias que toman en cuenta la variación dentro del tratamiento, que incluyen al Error Estándar de la Media (EEM), las pruebas de comparación múltiple y las pruebas de rango múltiple, los contrastes ortogonales y el análisis de tendencias.

19.6.1. Error estándar de la media (EEM)

El Error Estándar de la Media (EEM) se obtiene al dividir el desvío estándar muestral por la raíz cuadrada del número de observaciones para ese tratamiento (Lyman Ott & Longnecker, 2001). Cuando la mayoría de los investigadores utilizan los valores del EEM para propósitos de separación de medias, usan las medias de los tratamientos junto con sus respectivos EEM y las diferencias calculadas entre valores pareados. Los tratamientos se declaran diferentes si los valores colectivos de los tratamientos pareados no se sobreponen. Muchos investigadores usan los valores del EEM para comparar medias de los tratamientos. Al hacer esto se presentan problemas porque la mayoría de los investigadores utilizan los valores del EEM para comparar las medias de tratamientos muy separadas al ser ordenadas. Este uso del EEM sobreestima las diferencias

entre tratamientos y viola el supuesto del ANVA de que las varianzas de los tratamientos son iguales (Mize, *et al.*, 1999). Esto no produce resultados útiles porque los valores del EEM se incrementan con el valor numérico de los datos y no reflejan con precisión la varianza poblacional (tratamientos con valores grandes tienen mayores EEM que aquellos con valores pequeños). Al usar valores del EEM para comparar medias de tratamientos, se debe calcular un valor de EEM a partir del CME del ANVA o de los valores del EEM obtenidos a partir de la regresión de Poisson o de la regresión logística (Mize, *et al.*, 1999). Este uso del EEM tiene mayor probabilidad de tener resultados realistas. Sin embargo, los procedimientos de comparación de medias que utilizan la varianza muestral usualmente proveen información más útil.

19.6.2. Pruebas comparación múltiple y pruebas de rango múltiple

Las pruebas de comparación múltiple y las pruebas de rango múltiple son procedimientos estadísticos que utilizan la varianza muestral en una fórmula para calcular un valor numérico para comparar medias de tratamientos de un solo factor fijo. Las medias son ordenadas de forma ascendente o descendente y se calcula la diferencia entre las medias comparadas. El valor calculado se compara con el valor crítico computado por el estadístico de comparación de medias. Si las diferencias entre las medias comparadas excede el valor estadístico computado, los tratamientos se consideran estadísticamente diferentes. Alternativamente, si la diferencia entre medias de los tratamientos comparados es igual o menor al valor estadístico computado, los tratamientos se consideran similares (Mize, *et al.*, 1999). Al presentar las medias en una tabla o gráfico, a las medias designadas como diferentes se les asignan letras diferentes, mientras que a los tratamientos declarados similares se les asigna la misma letra.

La mayoría de los investigadores usan los términos *pruebas de comparación múltiple* y *pruebas de rango múltiple* de manera intercambiable. Sin embargo, estas difieren en el método para hacer comparaciones. Las pruebas de comparación múltiple utilizan el mismo valor crítico para comparar medias adyacentes y no adyacentes, mientras que las pruebas de rango múltiple emplean diferentes valores críticos para comparar medias adyacentes y no adyacentes (Compton, 1994). Las pruebas de rango múltiple se consideran más precisas que las pruebas de comparación múltiples porque se utilizan valores diferentes para comparar medias que están más alejadas al estar ordenadas, haciendo menos probable cometer errores al comparar medias más distantes. Ejemplos de pruebas de comparación múltiple son la prueba de Bonferroni, la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher (DMS), la prueba de Scheffé, la prueba de la diferencia honestamente significativa de Tukey (DHS) y la prueba de la K-razón de Waller-Duncan (Waller-Duncan). Ejemplos de pruebas de rango múltiple son la nueva prueba de rango múltiple de Duncan (NPRMD), la prueba múltiple F de Ryan-Einot-Gabriel-Welsh (FREGW), la prueba de rango múltiple de Ryan-Einot-Gabriel-Welsh (QREGW) y la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK). La NPRMD es considerada una de las mejores pruebas de comparación de medias que pueda usarse. Sin embargo, su procedimiento no se encuentra disponible en todos los softwares estadísticos (Compton, 2011).

Normalmente, solamente se utiliza una prueba de comparación para comparar medias de los tratamientos. La DMS es considerada por muchos estadísticos como el procedimiento de comparación de medias más liberal, es decir, el más tendiente a declarar a las medias como diferentes. Esto muchas veces conduce a los investigadores a declarar medias que son similares como diferentes. Esto usualmente ocurre con

medias que están apartadas una de la otra al ser ordenadas (la más alta contra la más baja). Por esta razón, no se debe utilizar la DMS a menos que los tratamientos sean considerados diferentes mediante una prueba general (ANVA, etc.). La DHS de Tukey se considera más conservadora que la DMS y produce resultados más confiables.

Los resultados de las pruebas de comparación de medias se deben presentar ya sea en tablas o en gráficos de barras ya que los tratamientos no están relacionados. Si se usan gráficos de barras las letras asignadas a tratamientos específicos se deben posicionar sobre cada barra.

Las pruebas de comparación múltiple y las pruebas de rango múltiple se deben utilizar solamente cuando los tratamientos no están relacionados (Quinn & Keough, 2002; Compton, 2011). En estudios de cultivo de tejidos vegetales, estos son tratamientos en los que se prueban diferentes reguladores de crecimiento, diferentes genotipos, diferentes recipientes de cultivo, diferentes agentes solidificantes, etc. Estos procedimientos no deben utilizarse para comparar medias de tratamientos que están relacionados, por ejemplo, diferentes concentraciones del mismo regulador de crecimiento, del mismo agente de solidificación del medio, de carbón activado, etc. (Compton, 1994; Mize, *et al.*, 1999).

Las pruebas de comparación múltiple y las pruebas de rango múltiple se pueden utilizar para datos de conteo y datos binomiales. Sin embargo, estos datos deben normalizarse primero. Los datos de conteo e pueden normalizar utilizando la transformación de la raíz cuadrada (Compton, 1994). Para datos binomiales típicamente se utiliza la transformación del arco seno. Una vez que se han calculado los resultados de los datos transformados, los datos se convierten nuevamente a la escala original para su presentación (Compton, 2011).

19.6.3. contrastes ortogonales

Los procedimientos de comparación múltiple son los más comúnmente utilizados por los investigadores para detectar diferencias entre medias de tratamientos. Sin embargo, existen procedimientos de comparación de medias que dan resultados más válidos. El contraste ortogonal es un procedimiento en el cual se hacen comparaciones entre tratamientos con características similares (Compton, 1994; Mize, et al., 1999). En estudios de cultivo de tejidos vegetales, estos tratamientos pueden ser reguladores de crecimiento con similar actividad, reguladores naturales versus sintéticos, etc. Los contrastes ortogonales difieren de las pruebas de comparación de medias en que se pueden comparar más de dos tratamientos en una prueba. Sin embargo, el número de comparaciones que se pueden hacer está restringido por el número de grados de libertad de los tratamientos. Los contrastes se realizan usualmente como parte del procedimiento de ANVA (Compton, 1994). Los contrastes se escriben especificando los tratamientos o grupos de tratamientos que se desea comparar y el ANVA calcula los gl , las SC y los CM de la comparación. Se calcula un estadístico F dividiendo el CM de cada contraste por el CME y se determina el nivel de significancia (valor de p). Se utiliza un gl para cada comparación.

Los resultados de los contrastes ortogonales usualmente se presentan en una tabla que contiene los cálculos del ANVA. Las medias de cada contraste se pueden incluir en una tabla o presentarse en el texto con las medias y los valores de p para cada contraste.

Los contrastes ortogonales se pueden utilizar para analizar datos de conteo o binomiales siempre que los datos sean transformados previamente al análisis (Compton, 2011). La información que se obtiene de los contrastes ortogonales es muchas veces mucho más útil que la que resulta de las pruebas de comparación múltiple o de las pruebas de

rango múltiple. Los contrastes ortogonales son subutilizados en estudios de cultivo de tejidos vegetales posiblemente porque los investigadores no han sido expuestos al concepto o porque su utilidad no ha sido completamente comprendida (Compton, 2011).

19.6.4. Análisis de tendencias

El análisis de tendencias es el método más efectivo para analizar datos de tratamientos que consisten en varios niveles de un mismo factor (diferentes concentraciones del mismo regulador de crecimiento) o incrementos en el tiempo (Compton, 2011). Con estos tratamientos, el objetivo primario es identificar una dosis o un período de tiempo que estimule una respuesta óptima del explante. Se prueban modelos que identifican tendencias específicas (lineal, cuadrática, cúbica) de forma escalonada desde el más simple (lineal) hasta el más complejo (cúbico en la mayoría de los casos). El proceso se detiene cuando se encuentre un valor de tendencia no significativo, y la última tendencia significativa se considera la que mejor se ajusta a los datos. El análisis de tendencia utiliza los valores de SC , t y R^2 para indicar tendencias significativas. Las tendencias se pueden probar a través de análisis de regresión o contrastes polinómicos en el ANVA (Compton, 1994).

El análisis de tendencias y los contrastes polinomiales pueden utilizarse para evaluar los niveles óptimos de los tratamientos incluso si esos niveles no fueron directamente probados pero se encuentran dentro los límites de los tratamientos probados experimentalmente (Compton, 1994). Los valores predichos pueden obtenerse utilizando información generada a partir de los análisis, permitiendo a los investigadores estimar los efectos de los tratamientos que no fueron evaluados.

El análisis de tendencias se puede utilizar para evaluar datos de conteo y binomiales siempre que los datos sean transformados previamente al análisis. Tal como en los procedimientos de comparación de medias, los datos se convierten nuevamente a la escala original para su presentación.

19.7. CONCLUSIONES

Es importante recordar que cualquier proyecto de investigación bien concebido debe ser planificado cuidadosamente antes de que comience su implementación. Esto ayuda a asegurar que el experimento responda a las preguntas de investigación deseadas y esto a su vez incrementa la calidad de la investigación. Es necesario asegurarse de minimizar el sesgo, la fatiga y los errores durante el curso de la experimentación. Estos factores conducen a resultados mentirosos que llevan a conclusiones erróneas. Se debe utilizar el diseño experimental mientras se conduce el experimento y al tomar y analizar los datos. Esto ayuda a evaluar objetivamente, sin sesgo y con precisión las diferencias entre los tratamientos. Utilizada apropiadamente, la Estadística es una herramienta valiosa para el investigador científico, permitiéndole publicar resultados experimentales con confianza.

19.8. REFERENCIAS

- Barnett, V. & Lewis, T., 1984. *Outliers in statistical data*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Compton, M., 2006. Statistics in plant biotechnology. En: *Plant cell protocols*. 2nd ed. Totowa(New Jersey): Humana Press, pp. 145-163.
- Compton, M. E., 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Volumen 37, pp. 217-242.
- Compton, M. E., 2011. Elements of in vitro research. En: *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. Boca Raton (Florida): CRC Press, pp. 57-73.
- Compton, M. & Mize, C., 1999. Statistical considerations for in vitro research: I - Birth of an idea to collecting data. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, Volumen 35, pp. 115-121.
- Cox, D. & Reid, N., 2000. *The theory of the design of experiments*. Boca Raton (Florida): CRC Press.
- Kemphorne, O., 1973. *The design and analysis of experiments*. Malabar (Florida): Robert E. Krieger Publishing Co.
- Kleinbaum, D., Kupper, L. & Muller, K., 1988. *Applied regression analysis and other multivariable methods*. 2nd ed. Boston(Massachusetts): PWS-Kent Publishing.
- Kuklin, A., Trigiano, R., Sanders, W. & Conger, B., 1993. Incomplete block design in plant tissue culture research. *J. Plant Tiss.Cult. Meth.*, Volumen 15, pp. 204-209.
- Lentner, M. & Bishop, T., 1986. *Experimental design and analysis*. Blacksburg(Virginia): Valley Book Company.
- Little, T. & Hills, F., 1978. *Agricultural experimentation: Design and analysis*. New York(New York): John Wiley & Sons.
- Lyman Ott, R. & Longnecker, M., 2001. *An introduction to statistical methods and data analysis*. 5th ed. Pacific Grove(California): Duxbury Thomson Learning.
- Mason, R., Gunst, R. & Hess, J., 2003. *Statistical design and analysis of experiments*. 2nd ed. Hoboken(New Jersey): John Wiley & sons.
- Mize, C. & Chun, Y., 1988. Analyzing treatment means in plant tissue culture research. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, Volumen 13, pp. 201-217.
- Mize, C., Koehler, K. & Compton, M., 1999. Statistical considerations for in vitro research: II-Data to presentation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, Volumen 35, pp. 122-126.
- Mize, C. & Winistorfer, P., 1982. Application of subsampling to improve precision. *Wood Sci.*, Volumen 15, pp. 14-18.
- Montgomery, D., 2001. *Design and analysis of experiments*. 5th ed. New York(New York): John Wiley & Sons.
- Quinn, G. & Keough, M., 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. New York(New York): Cambridge University Press.
- Zar, J., 1984. *Biostatistical analysis*. 2nd ed. Englewood Cliffs(New Jersey): Prentice-Hall.



A NEXOS

Anexo I

A1. 1. CONCEPTOS BÁSICOS PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A continuación se dan algunos conceptos básicos para realizar cálculos y preparación de soluciones concentradas:

Solución. Es una mezcla homogénea de dos o más componentes, o mezcla de soluto y solvente.

Soluto. Es aquel componente que se encuentra en menor cantidad.

Solvente. Es aquel componente que se encuentra en mayor cantidad y que generalmente determina el estado de agregación de la solución. Si el solvente es H₂O, las soluciones se llaman acuosas.

Algunos solutos, generalmente compuestos orgánicos, no se disuelven en agua y requieren disolventes orgánicos como alcohol, éter y otros.

Formas de expresar la concentración

La concentración representa la cantidad de soluto que se encuentra en una determinada cantidad de solvente o solución. Se conocen diferentes formas de expresar la concentración; las más utilizadas en laboratorio son:

| | |
|-------|---------------------------------------|
| (%) | Porcentaje en peso, en volumen y peso |
| (x) | Fracción molar |
| (ppm) | Partes por millón |
| (M) | Molaridad |
| (N) | Normalidad |
| (m) | Molalidad |

A continuación se hace una breve descripción de cada una de las concentraciones enunciadas.

Porcentaje (%)

Los porcentajes más utilizados son expresados en masa y generalmente no se especifica el nombre, se sobreentiende.

a) Porcentaje masa

Representa la cantidad de soluto (g) en 100 g de solución

$$\% = \text{Masa de soluto} \cdot 100 / \text{Masa solución}$$

Ejemplo:

2% de azúcar representa 20 g de azúcar por cada litro de medio nutritivo

b) Porcentaje volumen

Representa el volumen de soluto en 100 volúmenes de solución (ml)

$$\% = \text{Volúmenes de soluto} \cdot 100 / \text{volúmenes de solución}$$

Ejemplo:

Leche de coco al 5% representa 50 ml de leche de coco adicionada a 950 ml de agua

c) Porcentaje peso-volumen

Representa la masa de soluto (g) en 100 volúmenes de solución (ml)

$$\% = \text{Masa de soluto} \cdot 100 / \text{volumen de solución}$$

Ejemplo:

Solución de agar 0,8% (peso-volumen)

Se pesan 8 g de agar, se disuelve y se enrasa en un matraz aforado de 1 litro

A1.2. DILUCIÓN DE SOLUCIONES PORCENTUALES

Si se quiere diluir una solución porcentual en otra solución porcentual, se utilizan las fórmulas:

$$m_1 c_1 = m_2 c_2 \text{ (\% masa)}$$

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \text{ (\% volumen)}$$

m_1, m_2 = masa de la solución 1 y 2

$V_1 V_2$ = volumen de la solución 1 y 2

$c_1 c_2$ = concentración porcentual

Ejemplos:

Preparar 100 ml de alcohol al 70% a partir de alcohol al 96%

$$V_1 (\%)_1 = V_2 (\%)_2$$

$$100 \text{ ml} \cdot 70 = V_2 \cdot 96$$

$$V_2 = 72,9 \text{ ml alcohol al 96\%}$$

Se miden 72,9 ml de alcohol al 96% y se añade agua hasta la marca en un matraz aforado de 100 ml o en una probeta graduada de 100 ml, de esa manera se obtiene 100 ml de alcohol al 70%.

Preparar 100 ml de hipoclorito de sodio (Na ClO) al 2%, a partir de hipoclorito de sodio al 5,5%.

$$V_1 (\%)_1 = V_2 (\%)_2$$

$$100 \text{ ml} \cdot 2\% = V_2 \cdot 5,5\%$$

$$V_2 = 36,4 \text{ ml de NaClO al 5,5\%}$$

Se miden 36,4 ml de hipoclorito de sodio al 5,5% y se completa con agua hasta la marca en un matraz aforado de 100 ml.

A1.3. PARTES POR MILLÓN (ppm)

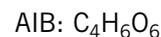
Generalmente se utiliza en unidad de masa, pero puede ser también en volumen o peso a volumen.

Representa partes (masa o volumen) en un millón de partes (masa o volumen).

Se puede expresar en: g/Tm, mg/kg o mg/l

Ejemplo:

Preparar 100 ml de una solución alcohólica de AIB (ácido indol butírico) de concentración 100 ppm.



100 ppm equivale a 100 mg/kg ó 100mg/l

A1.4. CONCENTRACIÓN MOLAR O MOLARIDAD (M)

Representa el número de moles de soluto que se encuentran en 1 litro de solución.

Número de moles (n) = masa/ peso molecular

La molaridad (M) se expresa en mol/l. Para soluciones diluidas, donde la cantidad de solutos es muy pequeña, se utiliza también la concentración en milimoles/litro (mM) ó micromoles/litro (μM).

$$1 \text{ mol} = 1.000 \text{ milimoles} = 1.000.000 \text{ micromoles}$$

$$1 \text{ M} = 1.000 \text{ mM} = 1.000.000 \mu\text{M}$$

Para preparar una solución de una determinada molaridad, se utiliza la siguiente fórmula:

$$M = \frac{\text{masa soluto (g)}/\text{PM soluto (g/mol)} \cdot V}{\text{solución (litros)}}$$

Ejemplo:

a) **Preparar soluciones de BAP (Benzilaminopurina) ($C_{12} H_{11} O_5$) de concentración $1 \mu\text{M}$ y $2,5 \mu\text{M}$ y luego convertirlas a mg/l.**

$$\text{Peso molecular (BAP)} = 225 \text{ g/mol}$$

Solución 1 M de BAP contiene 225 g BAP en un litro de solución

Solución $1 \mu\text{M}$ de BAP contiene 0,225 mg BAP en 1 litro de solución

Solución $2,5 \mu\text{M}$ contiene 0,5625mg BAP en 1 litro de solución

Como se observa, la conversión a mg/l ya no es necesaria, ya que la concentración en micromoles (μM) es equivalente a mg/l.

b) Se ha preparado una solución de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ con 440 mg/l. ¿Cuál es su concentración expresada en milimoles/litro (mM)?

$$\text{PM CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 147 \text{ g/mol}$$

$$\text{Número milimol (mM)} = \frac{440 \text{ (mg/l)}}{147 \text{ (mg/milimol)}}$$

Equivale a 2,99 milimolar (mM).

A1.5. DILUCIONES

Para diluir una concentración molar, se reemplaza en la siguiente ecuación:

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

V_1 y V_2 = volúmenes de solución 1 y 2 (litro)

M_1 y M_2 = molaridades de las soluciones (mol/l)

Ejemplo:

Preparar 100 ml solución de formol (aldehído fórmico) CH_2O de concentración 0,1M a partir de una solución 1M.

$$0,1 \text{ (litros)} \cdot 0,1\text{M} = V \cdot 1\text{M}$$

$$V = 0,01 \text{ litros.}$$

Se miden 10 ml de formol 1M y se añade agua hasta la marca en un matraz aforado de 100 ml.

A1.6. CONCENTRACIÓN NORMAL (NORMALIDAD) (N)

Representa el número de equivalentes gramo de soluto que se disuelve en 1 litro de solución.

Número de equivalentes (Neq.) se calcula:

$$\text{Neq} = \frac{\text{masa soluto}}{\text{peso equivalente (PEq)}}$$

PEq, peso equivalente, para los solutos se calcula: $\text{PEq} = \frac{\text{PM}}{\text{Valencia}}$

Al dividir entre valencia se toma en cuenta lo siguiente:

Para ácidos: valencia es el número de átomos de hidrógeno.

Para bases: valencia es el número de grupos oxhidrilo (OH^-).

Para sales: valencia es el producto entre la valencia del metal y su subíndice.

Si se quiere preparar soluciones normales, se cumple la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{masa soluto (g)} \cdot \text{Valencia (eq/mol)}}{\text{PM soluto (g/mol)} \cdot \text{Volumen (litro)}}$$

Así mismo, si la concentración de soluto es pequeña, se utiliza mili equivalentes (MEq) y mili normalidad (mN).

$$N = 10^3 \text{ mN}$$

Para diluir una dilución normal se utiliza la siguiente ecuación:

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

N_1 y N_2 = normalidades de las soluciones 1 y 2.

V_1 y V_2 = volúmenes de las soluciones 1 y 2.

a) Calcular una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 1N y luego diluir a 0,5 N. El PM NaOH = 40g/mol.

Para preparar 1 litro solución NaOH 1N, se pesan 40g NaOH y se añade agua hasta la marca en un matraz aforado de 1.000 ml.

Dilución. A partir de la solución concentrada (1N) se pueden obtener otras más diluidas, por ejemplo 0,5 N, 0,1N, en base a la siguiente fórmula:

$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

Para preparar 100 ml de solución 0,5 N:

$$V_1 \cdot 1\text{N} = 100\text{ml} \cdot 0,5 \text{ N}$$

$$V_1 = 50\text{ml de solución 1N}$$

Se miden 50 ml solución 1N y se completa con 50 ml H_2O enrasando hasta la marca en un matraz aforado de 100 ml.

b) Calcular una solución de ácido clorhídrico (HCl) de concentración 1N y luego diluir a 0,5N.

En la etiqueta de la botella del reactivo (HCl) se leen las características: $d = 1,19 \text{ g/ml}$,

porcentaje 37%(m/m). Para preparar 1 litro de solución de HCl se necesitarán 36,45 g HCl. Como es líquido, es más cómodo medir su volumen y no masa.

$$36,45g \cdot 100/37 = 98,51 \text{ g ácido } 37\%.$$

$$D = m/V \Rightarrow V = m/d$$

$$V = 98,51 \text{ g} / 1,19 \text{ g/ml}$$

$$V \text{ HCl} = 82,78 \text{ ml.}$$

Se miden 82,78 ml HCl y se añade H₂O hasta la marca en un matraz aforado de 1.000 ml.

Para diluir el HCl 1N a 0,5N y 0,1N se emplea la misma fórmula:

$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

Para preparar 100 ml de solución 0,5 N de HCl a partir de sol 1N:

$$V_1 \cdot 1N = 100 \text{ ml} \cdot 0,5N$$

$$V_1 = 50 \text{ ml sol. HCl } 1N$$

Se miden 50 ml solución HCl 1N y se añade agua hasta la marca en un matraz aforado de 100 ml.

Importante:

Si se tiene una solución molar y se requiere una solución normal o a la inversa, es muy útil en la práctica la siguiente ecuación:

$$M \cdot \text{valencia} = N$$

M-concentración molar

N-concentración normal

Cuando la valencia es 1(NaOH, HCl, etc.), las dos concentraciones son idénticas.

A1.7. CONCENTRACIÓN MOLAL O MOLALIDAD (m)

Representa el número de moles de soluto en 1kg de solvente. Para calcular el número de moles, se utiliza la siguiente relación:

$$n = m/PM$$

Y para calcular la masa de solvente se utiliza la siguiente fórmula:

$$m_{\text{Solvente}} = m_{\text{Solución}} - m_{\text{soluta}}$$

Fórmula:

$$M_1 C_1 = M_2 C_2 \quad M_1 M_2 = \text{masa de disolvente}$$

$$C_1 C_2 = \text{conc. molales}$$

Ejemplo:

Preparar una solución acuosa de glucosa C₆H₁₂O₆, 2 molar (2m) a partir de 36 g de la misma.

$$PM \text{ glucosa} = 180 \text{ g/mol}$$

$$\text{Número moles (n)} = 36 \text{ g} / 180 \text{ (g/mol)}$$

$$n = 0,2 \text{ moles}$$

La solución 2 molar (2m), contiene 2 moles por kg disolvente (agua)

Por lo tanto con la cantidad dada se pueden preparar 136 g solución (100 g disolvente y 36 g de soluto).

A1.8. SALES HIDRATADAS

Para la preparación de los diferentes medios de cultivo, suele ocurrir que el laboratorio posea la sal pero con una diferente hidratación; tal es el caso del sulfato de manganeso monohidratado o del sulfato de manganeso tetrahidratado, se trata de la misma sal pero con presencia de agua diferente.

El proceso es el siguiente:

1. MnSO₄·4H₂O

$$PM \text{ MnSO}_4 = 55 + 32 + 4 \cdot 16 = 151 \text{ g/mol}$$

$$4 \text{ H}_2\text{O} = 4 \cdot 18 \text{ g/mol} = 72 \text{ g/mol}$$

$$PM \text{ MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 151 + 72 = 223 \text{ g/mol}$$

$$223 \text{ g} \longrightarrow 151 \text{ g MnSO}_4 \text{ (sal anhidra)}$$

$$2.230 \longrightarrow X$$

$$X = 1510 \text{ g MnSO}_4$$

2. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

PM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ = $151 + 18 = 169 \text{ g/mol}$

169 g \longrightarrow 151 g MnSO_4

1,690 g \longrightarrow X

X = 1,510 g MnSO_4

Conclusión: 2.230 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ es equivalente a 1.690 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

BIBLIOGRAFÍA

BLANCO PRIETO, 1983. Manual de Laboratorio Química, Ediciones Librería Cervantes, Salamanca.

WHITTEN K, GAILEY K y R DAVIAS, 1998. Química General, Editorial Mc Graw Hill, 5ta Edición, México.

LOPEZ SOLANAS, V. 1991. Técnicas de Laboratorio, Editorial EDUNSA, Barcelona.

SIENKO Y, PLANE R. 1990. Química Teórica y Descriptiva, Edición Aguilar S.A. – Madrid.

Anexo II

A2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CONCENTRADAS, MEDIO (Murashige & Skoog, 1962)

(En base al protocolo del laboratorio de Fitopatología de la FSAGX – Bélgica, 1990).

• **M1: Macro elementos**

| Nombre Insumo | Cantidad (mg/l) | Cantidad (mg/10 l) | Observaciones |
|------------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------------|
| Ioduro de potasio | KI | 166,02 | |
| Nitrato de amonio | 1.650 | 16.500 | |
| Nitrato de potasio | 1.900 | 19.000 | |
| Sulfato de Magnesio heptahidratado | 370 | 3.700 | |
| Fosfato ácido de potasio | 170 | 1.700 | |
| Cloruro de Calcio dihidratado | 440 | 4.400 | A disolver separadamente. |

Enrasar a 1litro y tomar 100 ml /l de medio MS. Conservar en refrigerador.

• **M2: Micro elementos**

| Nombre Insumo | Cantidad (mg/l) | Cantidad (Mg/100 l) | Observaciones |
|---|-----------------|---------------------|--|
| Yoduro de Potasio | 0,83 | 83,00 | |
| Ácido bórico | 6,20 | 620,00 | |
| Sulfato de manganeso tetrahidratado (+) | 22,30 | 2.230,00 | A disolver separadamente |
| Sulfato de manganeso monohidratado (+) | 16,90 | 1.690,00 | |
| Sulfato de zinc heptahidratado | 8,60 | 860,00 | |
| Molibdato de sodio dihidratado | 0,25 | 25,00 | |
| Cloruro de Cobalto hexahidratado (**) | 0,025 | 2,50 | (**) Disolver 25 mg en 100 ml y tomar 10 ml. |
| Sulfato de Cobre pentahidratado (**) | 0,025 | 2,50 | (**) Disolver 25 mg en 100 ml y tomar 10 ml. |

(+) Utilizar una de las dos fuentes de Manganeso.

Enrasar a 1litro y tomar 10 ml /l de medio MS. Conservar en refrigerador.

A2.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CONCENTRADAS, MEDIO (Murashige & Skoog, 1962)

• M3: Quelatos de hierro

| Nombre Insumo | Cantidad (mg/l) | Cantidad (mg/100 l) | Observaciones |
|----------------------------------|-----------------|---------------------|---|
| Sulfato de hierro heptahidratado | 27,8 | 2.780,00 | A disolver en agua. |
| EDTA de sodio | 37,3 | 3.730,00 | A disolver en agua. |
| | | | Esta última solución debe ser calentada, luego mezclada con el sulfato de hierro, agitar y dejar enfriar en medio ambiente. |

Luego de preparada la solución, dejar en reposo dos o tres días a temperatura ambiente. Conservar en refrigerador. Enrasar a 1 litro y tomar 10 ml /l de medio MS.

• M4: Vitaminas

| Nombre Insumo | Cantidad (mg/l) | Cantidad (mg/100 l) | Observaciones |
|------------------|-----------------|---------------------|---------------|
| Ácido nicotínico | 0,5 | 50,00 | |
| Piridoxina HCl | 0,5 | 50,00 | |
| Tiamina HCl | 0,1 | 10,00 | |
| Glicina | 2 | 200,00 | |

Enrasar a 1litro y tomar 10 ml /l de medio MS. Conservar en refrigerador una cuarta parte, el resto, congelar hasta su utilización, descongelando sólo una parte.

Anexo III

A3.1. FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Formulación de medios de MS, B5, WH.

| COMPONENTES | MEDIOS DE CULTIVO | | |
|--|-------------------|---------------|---------------|
| | MS | B5 | WH |
| Macronutrientes | (mg/l) | (mg/l) | (mg/l) |
| NH ₄ NO ₃ | 1.650 | ----- | ----- |
| KNO ₃ | 1.900 | 2.500 | 80 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 440 | 150 | ----- |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 | 250 | 737 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | ----- | ----- |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | ----- | 134 | ----- |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O ₄ | ----- | 150 | 19 |
| Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | ----- | ----- | 288 |
| HCl | ----- | ----- | 65 |
| Na ₂ SO ₄ | ----- | ----- | 200 |
| Macronutrientes | (mg/l) | (mg/l) | (mg/l) |
| KI | 0,83 | 0,75 | 0,75 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 | 3,0 | 1,50 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 22,3 | ----- | 6,65 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | ----- | 10 | 2,67 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8,6 | 2,0 | 0,001 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,25 | 0,25 | 0,01 |
| CuSO ₄ ·7H ₂ O | 0,025 | 0,025 | ----- |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ | ----- | ----- | 2,50 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,025 | 0,025 | 0,25 |
| Na ₂ ·EDTA | 37,3 | 37,3 | 37,3 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27,8 | 27,8 | 27,8 |
| Vitaminas y hormonas | (mg/l) | (mg/l) | (mg/l) |
| Mioinositol | 100 | 100 | ----- |
| Tiamina | 0,1 | 10,0 | 0,1 |
| Ácido nicotínico | 0,5 | 1,0 | 0,5 |
| Piridoxina | 0,5 | 1,0 | 0,1 |
| Glicina | 2,00 | ----- | 3,0 |
| Pantotenato de Calcio | ----- | ----- | 1,0 |
| AIA | 1-30 | ----- | 3,0 |
| Kinetina | 0,04-10 | 0,1 | ----- |
| 2,4-D | ----- | 0,1-2,0 | 6,0 |
| sacarosa | 30.000 | 20.000 | 20.000 |
| pH | 5.7 | 5.5 | |

MS= Murashige & Skoog, 1962; B5 = Gamborg et al.; (1968) ; Wh = White, (1943). Con modificaciones de Yeoman *et al.*, 1977 y Singhy *et al.*, 1981.

Fuente: Mroginski y Roca (1991); Thorpe (1981)

A3.2. PESO MOLECULAR DE LOS COMPONENTES DE MEDIOS DE CULTIVO

• Macro elementos

| Componentes | Fórmula | Peso molecular |
|-------------------------------------|--|----------------|
| Nitrato de amonio | NH_4NO_3 | 80,05 |
| Nitrato de potasio | KNO_3 | 101,10 |
| Cloruro de calcio dihidratado | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 146,99 |
| Sulfato de magnesio hepta hidratado | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 246,50 |
| Ortofosfato diácido de potasio | KH_2PO_4 | 136,09 |
| Sulfato de amonio | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 132,15 |
| Ortofosfato monohidratado de sodio | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 138,01 |
| Ortofosfato ácido de amonio | $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ | 132,07 |
| Ortofosfato diácido de amonio | $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ | 115,04 |
| Nitrato de calcio tetrahidratado | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 236,16 |
| Cloruro de hidrógeno | HCl | 36,00 |
| Cloruro de potasio | KCl | 74,55 |

• Micro elementos

| Componentes | Fórmula | Peso molecular |
|---|---|----------------|
| Ioduro de potasio | KI | 166,02 |
| Ácido bórico | H_3BO_3 | 61,84 |
| Sulfato de manganeso tetrahidratado | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 223,01 |
| Sulfato de manganeso hidratado | $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 169,01 |
| Sulfato de zinc heptahidratado | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 287,56 |
| Óxido de molibdato | MoO_3 | 143,95 |
| Molibdato de sodio dihidratado | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 241,98 |
| Sulfato de cobre pentahidratado | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 249,69 |
| Cloruro de cobalto hexahidratado | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 237,95 |
| Quelatos de Hierro | | |
| EDTA de sodio ($\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 372,25 |
| Sulfato de hierro | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 278,03 |

• Carbohidratos

| Componentes | Fórmula | Peso molecular |
|-------------|---|----------------|
| Fructosa | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | 180,15 |
| Glucosa | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | 180,15 |
| Galactosa | $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ | 342,31 |

• Factores de crecimiento

| Componentes | Fórmula | Peso molecular |
|-------------------------------------|---|----------------|
| Adenina o vitamina B4 | $C_5H_5N_5 \cdot 3H_2O$ | 189,13 |
| Sulfato de adenina | $(C_5H_5N_5)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ | 404,37 |
| Ácido ascórbico o vitamina C | $C_6H_8O_6$ | 176,12 |
| Pantotenato de calcio o vitamina B5 | $(C_9H_{16}O_5)_2Ca$ | 476,53 |
| Inositol | $C_6H_{12}O_6$ | 180,16 |
| Ácido nicotínico | $C_6H_5NO_2$ | 123,11 |
| Piridoxina HCl | $C_8H_{11}NO_3HCl$ | 205,64 |
| Tiamina HCl o vitamina B1 | $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ | 337,28 |
| Glicina | $C_2H_5NO_2$ | 75,07 |

• Reguladores de crecimiento

| Componentes | Fórmula | Peso molecular | Soluble en: |
|---|--------------------|----------------|------------------|
| Auxinas | | | |
| Ácido indol acético AIA | $C_{10}H_9O_2N$ | 175,18 | Etanol y NaOH 1N |
| Ácido indol butírico AIB | $C_{12}H_{13}O_2N$ | 203,23 | Etanol o NaOH 1N |
| Ácido &-Naphthalen acético ANA | $C_{12}H_{10}O_2$ | 186,20 | NaOH 1N |
| Ácido 2,4-Dichlorophenoxy acético 2,4-D | $C_8H_6O_3Cl$ | 221,04 | Etanol o NaOH 1N |
| Citoquininas | | | |
| N6-Benzil amino purina BAP | $C_{12}H_{11}N_5$ | 225,20 | NaOH 1N |
| 6-Furfuryl amino purina KINETINA | $C_{10}H_9N_5O$ | 215,21 | NaOH 1N |
| N6-(2-Isopentenil) adenina 2iP | $C_{10}H_{13}N_5$ | 203,20 | NaOH 1N |
| 6-(4-hydroxy-3 Methyl-but-2-enylaminopurina ZEATINA | $C_{10}H_{13}N_5O$ | 219,20 | NaOH 1N |
| Giberelinas | | | |
| Ácido giberelico GA3 | $C_{19}H_{22}O_6$ | 346,37 | Etanol |

Fuente: Jona y Menine (1987), Complementación: M. Calle y G. Aguirre, Laboratorio de Biotecnología FCAPFyV – UMSS, 2009.