



58
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PROPUESTA DE MANUAL DE TECNICAS
SELECTAS DE MICROPROPAGACION PARA
ALGUNAS ESPECIES VEGETALES.



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
FERNANDO FLORES DIAZ

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TABLA DE CONTENIDO

Título	
Justificación	1
Objetivo	4
Estructuración del Trabajo	6

PRIMERA PARTE

CAPITULO PRIMERO

INTRODUCCION

1.1. Tipos de propagación en plantas	9
1.2. La propagación asexual	9
1.3. Clasificación de los métodos de propagación vegetativa en plantas	11
1.4. La micropropagación	12
1.5. Importancia de la micropropagación	12

SEGUNDA PARTE

CAPITULO II

EL LABORATORIO DE MICROPROPAGACION

II.1.	Características del laboratorio de micropropagación	16
II.2.	Áreas de trabajo del laboratorio de micropropagación	16
II.3.	Instalaciones requeridas en cada una de las áreas de trabajo ..	16

CAPITULO III

GENERALIDADES DE LA TÉCNICA DE MICROPROPAGACION

III.1.	Enumeración de los pasos en la técnica de micropropagación	19
III.2.	Equipo y materiales requeridos para cada uno de los pasos	20

CAPITULO IV

EL MEDIO DE CULTIVO

IV.1.	Clasificación práctica de los medios de cultivo	25
IV.2.	Componentes de los medios de cultivo	28
IV.3.	Preparación de los medios de cultivo	35

CAPITULO V

PREPARACION Y DISECCION DEL EXPLANTE

V.1.	Criterios de selección de las plantas donadoras	47
V.2.	Tratamientos de las plantas donadoras previos a la micropropagación	47
V.3.	Tipos de explantes que pueden ser micropropagados	50
V.4.	Selección del explante	52
V.5.	Lavado y desinfección del explante	54
V.6.	Disección del explante	57
V.7.	Obtención de cada uno de los diversos tejidos	58

CAPITULO VI

SIEMBRA ASEPTICA

VI.1.	Preparación del área de siembra	88
VI.2.	Precauciones en el momento de la siembra	91

CAPITULO VII

TRANSFERENCIAS "IN VITRO"

VII.1.	Tipos de transferencias "in vitro"	94
VII.2.	Medios de cultivo para transferencias	95
VII.3.	Manipulación de los tejidos en las transferencias	97

CAPITULO VIII

TRANSFERENCIA A TIERRA DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS

VIII.1.	Factores que intervienen en la adaptación a suelo de las plantas micropropagadas	100
VIII.2.	Instalaciones, equipo y materiales que se requieren para la adaptación al suelo de las plantas micropropagadas	102
VIII.3.	Pasos para la transferencia y adaptación de las plantas micropropagadas a suelo	103
VIII.4.	Forma de realizar cada uno de los pasos	104
VIII.5.	Manejo de las plantas micropropagadas ya adaptadas a suelo ..	112

TERCERA PARTE

CAPITULO IX

EMPLEO DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS POR MICROPROPAGACION

IX.1.	Alternativas de empleo para las plantas obtenidas "in vitro" .	116
IX.2.	Esquemas de manejo y producción de plantas certificadas	120

CAPITULO X

SUSTITUCION DE EQUIPO Y MATERIALES

X.1.	El autoclave	127
X.2.	El destilador	130
X.3.	El pasteurizador de tierra	133
X.4.	La campana de flujo laminar	139
X.5.	El microscopio de disección	141
X.6.	El potenciómetro	141
X.7.	Instrumental de disección	141
X.8.	Material de cristalería	142
X.9.	La cámara de incubación	145
X.10.	Algunas substituciones para la fase de adaptación a suelo ...	149

CUARTA PARTE

CAPITULO XI

MICROPROPAGACION DE ESPECIES SELECTAS

XI.1.	Micropropagación de Violeta Africana	159
XI.2.	Micropropagación de Tabaco	163
XI.3.	Micropropagación de Rosa	165
XI.4.	Micropropagación de Durazno y Chabacano	169
XI.5.	Micropropagación de Zanahoria	171
XI.6.	Micropropagación de Clavel	173
XI.7.	Micropropagación de Crisantemo	175
XI.8.	Micropropagación de Fresa	177

QUINTA PARTE

CAPITULO XII

BIBLIOGRAFIA

XII.1.	Bibliografía Citada	183
XII.2.	Bibliografía General	185
XII.3.	Bibliografía Especializada	186

Justificación

En la actualidad la biotecnología ha ido adquiriendo un prestigio que crece cada día debido a que permite la producción de bienes y/o servicios - empleando organismos vivos y como sustratos desperdicios o desechos de otras industrias y optimizando al máximo los rendimientos, al mismo tiempo - que minimiza o elimina por completo los efectos de deterioro sobre el medio ambiente.

Estas bondades han generado un creciente interés tanto en las instituciones de investigación y docencia así como en los diversos sectores productivos del país; lo cual ha generado a su vez una demanda creciente de información sobre estas técnicas que permita pasar de la etapa de plantas experimentales y piloto a programas masivos de producción.

La micropropagación, técnica comprendida dentro del área de Cultivo de Tejidos Vegetales, a su vez considerada como una biotecnología, no ha quedado exenta en ésta situación. Por el contrario, cada día son más las escuelas y los niveles en que se incorpora como materia obligatoria en semestres intermedios y como materia optativa en semestres terminales. Esto ha generado a su vez un número creciente de tesis y trabajos de investigación relacionados con la producción de plantas vía esta técnica.

Por otra parte en los sectores agrícolas relacionados con las actividades viverísticas y de planteros tanto en especies frutales, forestales, ornamentales y horticolas la creciente necesidad de elevar la calidad fitosanitaria de las plantas y de una producción masiva cada vez mayor ha ocasionado que exista una demanda también creciente tanto de mano de obra calificada en ésta técnica como literatura que auxilie en todos y cada uno de los pasos comprendidos desde el montaje de un laboratorio hasta la adaptación - de las plantas producidas "in vitro" a condiciones de suelo.

Debido a lo anterior el presente trabajo surge como respuesta a la necesidad de un manual en castellano que exponga clara, secuencial y a manera de recetas los pasos que se tienen que seguir en el proceso de Micropropagación y que haga incapié en aquellos detalles y precauciones que solo se podrían adquirir en varios meses y quizás años de trabajo dentro de un laboratorio. También surge debido a la necesidad de señalar alternativas prácticas inmediatas para la elaboración de equipo y materiales que subsanen, aun que de una manera modesta, la falta de recurso económico tanto en las escuelas como en aquellos sectores agrarios en los que esta tecnología ofrece -- la posibilidad de una competitividad y productividad mayor.

Por último este manual tiene como propósito retomar la filosofía de la investigación científica planteada por el Gral. Lázaro Cárdenas en la cual el objetivo no es "modernizar" la agricultura imitando los modelos norteamericanos sino mejorando, apoyando y optimizando los métodos agrícolas tradicionales y concentrándose siempre en lo que pueden utilizar los pequeños -- productores que poseen poco dinero y cuyas condiciones productivas se aparten un buen trecho de las ideales.

Rescatar esta filosofía sobre todo en los trabajos de tipo técnico es algo de suma importancia en un momento como lo es el presente, en el cual -- países con las características de desarrollo como el nuestro se están incorporando a programas mundiales de producción de alimentos que lo único que nos dejan son una mayor deuda externa, una creciente dependencia alimentaria y tecnológica, un deterioro ecológico en la tierra y el agua --con matices de irreversible-- y la pérdida de información genética de las variedades silvestres. Estas al ser sustituidas por las variedades "mejoradas" producto de la Revolución Verde con sus ya conocidas desventajas como son la baja resistencia a plagas y enfermedades lo cual obliga al empleo de grandes cantidades de pesticidas, su gran demanda de fertilizantes químicos, lo que repercute en la necesidad de mayores aportes de agua, lo que a su vez aumenta la necesidad de más pesticidas y así sucesivamente.

Por todo lo anterior hemos intentado elaborar esta guía con el único --

propósito de que aclare y auxilie tanto a estudiantes, tesistas y productores que estén interesados en solucionar alguno o algunos de los múltiples - problemas cuya solución descansa en esta técnica.

Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es el de exponer de manera sucinta y clara los aspectos generales prácticos que requiere la técnica de micropropagación vegetal, comprendiendo a ésta como uno de los varios aspectos del cultivo de tejidos vegetales y que como su nombre lo indica está dedicada a la producción de plantas.

Estructuración del trabajo

Este trabajo no pretende ser un análisis ni teórico ni bibliográfico; pero aunque en todos los casos las experiencias plasmadas en él están cotejadas y apoyadas por los resultados y experiencias de otros investigadores; el autor del presente se ha limitado a exponer lo más ordenadamente posible, la secuencia de pasos que conducen a la propagación de plantas vía esta técnica.

Este manual está estructurado de la siguiente manera:

- 1) Primera parte. Intenta definir y ubicar a la micropropagación de plantas contestando a las siguientes preguntas:
¿Qué es la reproducción vegetal y como se lleva a cabo?
¿Qué es la propagación asexual ó vegetativa y cuáles son los mecanismos que hacen posible este tipo de multiplicación en las plantas?
¿Qué es la micropropagación y donde se ubica dentro de las técnicas de producción de plantas?
¿Qué ventajas y desventajas presenta la micropropagación y qué principios básicos le dan fundamento?
- 2) Segunda parte. Pretende exponer de manera secuencial los pasos, las instalaciones, los equipos, los materiales y las precauciones que a criterio del autor deben ser observados para alcanzar la meta de producir plantas por esta técnica.
- 3) Tercera parte. Señala algunas alternativas de empleo de las plantas obtenidas "in vitro" y la incorporación de éstas a programas de producción masiva y certificación. También se incluyen algunas sugerencias para la adaptación y sustitución de equipos y materiales empleados en el proceso de micropropagación.
- 4) Cuarta parte. Contiene una presentación resumida de trabajos de investigación realizados por el autor. Los trabajos se presentan en un orden

que permite abordar a la micropropagación partiendo del criterio de división de la planta en "órganos" y/o tejidos, lo cual a su vez permite enfrentar la técnica de lo más sencillo, al cultivo "in vitro" de "órganos" y tejidos que requieren de un cierto grado de desarrollo en la destreza manual.

5) Quinta parte. Comprende la bibliografía, la cual se le ha dividido en tres partes que son: bibliografía citada, bibliografía general y bibliografía especializada, en las cuales se incluyen tanto libros como artículos.

PRIMERA PARTE

CAPITULO I

INTRODUCCION

- I.1. TIPOS DE PROPAGACION EN PLANTAS.
- I.2. LA PROPAGACION ASEXUAL.
- I.3. CLASIFICACION DE LOS METODOS DE PROPAGACION VEGETATIVA EN PLANTAS.
- I.4. LA MICROPROPAGACION.
- I.5. IMPORTANCIA DE LA MICROPROPAGACION.

I.1. TIPOS DE PROPAGACION EN PLANTAS

En la naturaleza los vegetales presentan dos alternativas para multiplicarse. La primera de ellas consiste en la producción de gametos; los cuales al fusionarse restituyen la condición diploide del esporofito. Los resultados de esta fusión son la formación del embrión y el endospermo, que posteriormente se convertirá en el cotiledón o cotiledones en las angiospermas.

La segunda alternativa reproductora está basada en la propiedad de ciertos tejidos diploides completamente diferenciados, los cuales son conservados a lo largo de toda la vida de la planta con características embrionarias o como reminiscencias epigenéticas, con capacidad de producir progenies asexuales.

Ambos sistemas reproductores han sido aprovechados y optimizados por el hombre, con el fin de domesticar y mejorar cultivos tanto industriales, como alimenticios y decorativos.

En la actualidad se producen plantas aprovechando ambas alternativas reproductoras; dando como resultado la división de las técnicas de propagación vegetal en dos grupos a saber:

- a) **Propagación Sexual** basada en la producción de semillas como mecanismo multiplicador de plantas.
- b) **Propagación Asexual** que aprovecha la capacidad de ciertas células, tejidos u órganos del soma de las plantas para regenerar individuos completos.

I.2. LA PROPAGACION ASEXUAL

La propagación asexual ó vegetativa es un sistema de multiplicación de algunos organismos (entre ellos las plantas superiores); que consiste en la

generación de nuevos individuos a partir de células o tejidos diploides y -diferenciados.

Esta propiedad está fundamentada en dos principios básicos que son:

- a) La totipotencialidad celular.
- b) La mitosis.

La totipotencialidad celular demostrada con el experimento de trans---plantes de núcleos realizados por (Gurdon, 1968) donde demuestra que la diferenciación celular no implica la pérdida de información genética en el núcleo de las células sino que implica la "transcripción diferencial" del genoma; dicho de otra manera, en una célula diferenciada existe toda la información genética del individuo completo, pero en dicha célula sólo se transcriben aquellos genes que están implicados en las funciones correspondientes a la diferenciación de la célula, mientras que los genes que no participan en dichas funciones permanecen reprimidos.

En este experimento Gurdon también demuestra como el citoplasma juega un papel fundamental en la regulación de la transcripción del genoma de una célula diferenciada, ya que es el generador del microambiente que determina las condiciones de diferenciación celular.

El principio de la Mitosis, que consiste en la producción de dos células idénticas (en contenido de ADN) a partir de una célula preexistente; es un fenómeno sumamente común en las plantas y está presente a lo largo de toda la vida del individuo dando como resultado el crecimiento primario y secundario, los cuales son localizados, en puntos o tejidos muy específicos - como los ápices caulinares y radicales, el cambium y en meristemas intercalares de monocotiledoneas, (Hartman y Kester, 1975).

La mitosis también es frecuente en zonas donde ocurre una lesión en la planta, y se destaca por la formación de un "callo" o grupo de células pa--

quimatosas y "desorganizadas" que aparecen como respuesta a la lesión, - - (Hartman y Kester, 1975).

La propagación vegetativa al estar sustentada por los dos principios antes mencionados se torna en un sistema de multiplicación ampliamente utilizado para la producción de plantas, en las cuales es muy importante conservar la identidad genética, evitando la dispersión típica de la reproducción sexual y característica de especies altamente heterocigóticas.

Otro caso en el cual la reproducción vegetativa es una herramienta insustituible, se da en aquellas especies o cultivares que producen semillas no viables o bien inmaduras anatómicamente.

1.3. CLASIFICACION DE LOS METODOS DE PROPAGACION VEGETATIVA EN PLANTAS

Hasta el momento el hombre ha aprovechado la capacidad de las plantas de reproducirse asexualmente, estableciendo y perfeccionando diversos métodos de propagación vegetativa de plantas; los cuales se enumeran a continuación.

Propagación por embriones apomícticos,

propagación por estolones,

propagación por hijuelos,

propagación por acodado,

propagación por separación de bulbos,

propagación por estacas,

propagación por injerto y

micropropagación, (Hartman y Kester, 1975).

1.4. LA MICROPROPAGACION

La micropropagación es un método de multiplicación asexual de plantas que se realiza a partir de tejidos o células vegetales que son inducidos a crecer y/o multiplicarse en condiciones totalmente asépticas, en medios de cultivo artificiales y controlando las condiciones ambientales como luz, temperatura, humedad relativa y pH. (Hartman y Kester, 1975).

1.5. IMPORTANCIA DE LA MICROPROPAGACION

La importancia de la micropropagación está basada en las siguientes ventajas:

- a) Permite la obtención de plantas de alto registro fitosanitario, ya que al someter al tejido vegetal a este sistema de cultivo se eliminan totalmente las enfermedades de tipo bacteriano y fungoso y en algunas ocasiones las de tipo viral.
- b) Las plantas obtenidas por este sistema son réplicas exactas entre sí y fieles copias de la planta progenitora.
- c) El número de individuos obtenidos por este método es muy superior al obtenido por cualquier otro método de propagación por unidad de propágulo.
- d) En algunas ocasiones es posible acortar los tiempos de producción de plantas.
- e) Permite tener en espacios relativamente pequeños un gran número de plantas.
- f) Facilita el almacenaje y transporte de plantas reales o potencia--

les. Estos dos últimos aspectos son de suma importancia tanto en el establecimiento de bancos de germoplasma, como en la reducción de costos por concepto de manejo, almacenaje y transporte de plantas.

- g) Elimina los problemas ocasionados por las largas cuarentenas a que son sometidas las plantas en las fronteras cuando se intenta introducir las de una nación a otra.
- h) Es un método de propagación que hace posible a corto plazo establecer la uniformidad genética dentro de una población.

Existen algunas desventajas intrínsecas a la micropropagación que son:

- a) Requiere de una capacitación previa a su ejecución que debe abarcar tanto aspectos teóricos como prácticos.
- b) Requiere un mínimo indispensable de instalaciones, equipo, reactivos y materiales cuyo costo de adquisición es relativamente elevado.
- c) Como resultado de los dos puntos anteriores, en algunos casos el costo de producción por planta obtenida directamente de la micropropagación es muy elevado en comparación con el costo de producción de la misma planta producida por otro sistema, lo cual obliga a tomar rutas alternativas de empleo para las plantas obtenidas en el laboratorio.

SEGUNDA PARTE

CAPITULO II

EL LABORATORIO DE MICROPROPAGACION

II.1. CARACTERISTICAS DEL LABORATORIO DE MICROPROPAGACION.

II.2. AREAS DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE MICROPROPAGACION.

II.3. INSTALACIONES REQUERIDAS EN CADA UNA DE LAS AREAS DE TRABAJO.

- II.1. CARACTERISTICAS DEL LABORATORIO DE MICROPROPAGACION
- II.2. AREAS DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE MICROPROPAGACION Y
- II.3. INSTALACIONES REQUERIDAS EN CADA UNA DE LAS AREAS DE TRABAJO

Para llevar a cabo la micropropagación son indispensables una serie de espacios e instalaciones adaptadas para fines muy específicos como:

- a) Area para la preparación de medios de cultivo y lavado de materiales.
- b) Cuarto de siembras asépticas.
- c) Cuarto de incubación o cámara de crecimiento.
- d) Area para almacenamiento de materiales y reactivos.

Estas áreas deben presentar un arreglo y distribución dentro del laboratorio de acuerdo al flujo continuo de actividades y materiales que la técnica de micropropagación impone.

Las instalaciones requeridas en cada una de estas áreas son:

- a) Area de lavado de materiales y preparación de medios.
 - a.1. Instalación de agua potable.
 - a.2. Instalación de drenaje.
 - a.3. Instalación de gas.
 - a.4. Instalación de corriente eléctrica monofásica 117 V.
- b) Cuarto de siembra aséptica.

Esta área debe estar ubicada de tal forma que se encuentre libre tanto de corrientes de aire como del tránsito de personas para disminuir al máximo el riesgo de contaminación.

Las instalaciones más usuales dentro de esta área son:

- b.1. Corriente eléctrica monofásica 117 V.
- b.2. Corriente eléctrica trifásica 220 V.
- b.3. Instalación de gas.

c) Cuarto de incubación o cámara de crecimiento.

En esta área es importante el controlar las condiciones ambientales como luz, temperatura y humedad relativa; así como también debe ser una área solo accesible al personal estrictamente necesario.

Las instalaciones necesarias dentro de esta área son:

- c.1. Instalación de corriente eléctrica 117 V.
- c.2. Sistema de climatización.

d) Área para almacenamiento de materiales y reactivos.

Esta área debe estar bien ventilada, fresca y seca; poseer buena iluminación pero sin que la luz solar incida directamente sobre la estantería.

La instalación requerida es esta área es:

- d.1. Instalación de corriente eléctrica 117 V.

CAPITULO III

GENERALIDADES DE LA TECNICA DE MICROPROPAGACION

III.1. ENUMERACION DE LOS PASOS EN LA TECNICA DE MICROPROPAGACION.

III.2. EQUIPO Y MATERIALES REQUERIDOS PARA CADA UNO DE LOS PASOS.

III.1. ENUMERACION DE LOS PASOS EN LA TECNICA DE MICROPROPAGACION

El proceso de micropropagación para varios tipos de plantas y explantes, comprende 4 etapas generales a saber:

- 1.- Etapa de adaptación aséptica.
- 2.- Etapa de multiplicación "in vitro".
- 3.- Etapa de enraizamiento "in vitro".
- 4.- Etapa de adaptación a suelo.

Para cubrir estas etapas es necesario observar una serie de pasos que enumerados en secuencia ordenada son:

- A.- Selección de las plantas donadoras.
- B.- Tratamientos previos a la micropropagación de las plantas donadoras.
- C.- Preparación de los medios de cultivo.
- D.- Lavado y esterilizado de las plantas o porciones donadoras de tejido.
- E.- Disección del tejido.
- F.- Siembra del explante.
- G.- Desarrollo de los explantes en la cámara.
- H.- Preparación de los medios de cultivo para transferencia.

I.- Transferencias "in vitro".

J.- Transferencias a tierra o suelo de las plantas obtenidas "in vitro".

III.2. EQUIPO Y MATERIALES REQUERIDOS PARA CADA UNO DE LOS PASOS

Para realizar adecuadamente cada uno de los pasos mencionados en el punto III.1., son requeridos equipos y materiales de los cuales se dan a continuación una relación:

Pasos A. y B.- Selección de las plantas donadoras y Tratamientos previos a la micropropagación.

- 1.- Invernadero, túneles plásticos o locales donde aislar plantas.
- 2.- Equipo para control de temperatura.
- 3.- Equipo de fumigación.
- 4.- Sistema de riego.
- 5.- Herramientas manuales para agricultura.
- 6.- Fungicidas, bactericidas e insecticidas.

Paso C.- Preparación y esterilización de medios de cultivo.

- 1.- Reactivos: Sales inorgánicas y sales orgánicas, de las cuales se da una relación completa en la Tabla I.
- 2.- Balanza Analítica y Granataria.
- 3.- Potenciómetro.
- 4.- Destilador.
- 5.- Parrilla.

Paso D.- Lavado y esterilizado de plantas y/o porciones donadoras.

- 1.- Agua destilada.

- 2.- Agua destilada estéril.
- 3.- Hipoclorito de calcio.
- 4.- Tween 20.
- 5.- Alcohol etílico industrial.
- 6.- Embudos de filtración rápida.
- 7.- Papel filtro de poro grueso.
- 8.- Vasos de precipitados 250 y 500 ml.
- 9.- Reloj cronómetro con alarma.
- 10.- Gasa estéril.
- 11.- Papel secante estéril.
- 12.- Cajas petri o vasos de precipitados.
- 13.- Campana de flujo laminar o área estéril.

Paso E.- Disección del tejido.

- 1.- Campana de flujo laminar o área de trabajo bajo condiciones estériles.
- 2.- Pinzas para disección.
- 3.- Agujas de disección.
- 4.- Bisturios y agujas de disección.
- 5.- 2 Mecheros de gas.
- 6.- 2 Mecheros de alcohol.
- 7.- Gasa y algodón.
- 8.- Alcohol etílico industrial.
- 9.- Cubrebocas y gorros quirúrgicos.
- 10.- Microscopio estereoscópico.
- 11.- Cajas petri estériles.

Paso F.- Siembra del explante.

- 1.- Campana de flujo laminar o área estéril.
- 2.- Pinzas de disección.
- 3.- Agujas de disección.
- 4.- Frascos con medio de cultivo (estériles).

- 5.- Gorros y cubrebocas quirúrgicos.
- 6.- Mecheros de gas o alcohol.
- 7.- Materiales biológicos esterilizados.

Paso G.- Colocación de los frascos con el inóculo en la cámara de crecimiento.

- 1.- Estantería metálica, madera o cristal.
- 2.- Lámparas de luz blanca fría de 40 watts (Slim Line o - Gro Lux).
- 3.- Bastidores o bases para la colocación de las lámparas.
- 4.- Reloj de periodos.
- 5.- Balastras y arrancadores para las lámparas.
- 6.- Termómetro de máximas y mínimas.
- 7.- Higrómetro.
- 8.- Sistema de climatización.

Paso H.- Preparación de medios de cultivo para transferencia "in vitro".

Para realizar este paso se requieren los elementos enlistados en el paso "G".

Paso I.- Transferencias "in vitro".

Para las transferencias "in vitro" se requiere de los elementos mencionados en los pasos "E y F".

Paso J.- Transferencia a tierra de las plantas micropropagadas.

Para este paso se requiere de una serie de elementos que garanticen la más alta cantidad de prendimiento de las plantas - producidas "in vitro" a condiciones de suelo.
Los elementos requeridos son:

- 1.- Invernadero.
- 2.- Bolsa de plástico negro agrícola calibre 600-800 (varios tamaños).
- 3.- Bolsas de plástico transparente (varios tamaños).
- 4.- Agrolita, vermiculita grado hortícola, arena de tezontle y de río, tierra orgánica, estiércol procesado de vaca o borrego.
- 5.- Generador de vapor.
- 6.- Tina o bancal con tubería conductora de vapor.
- 7.- Lona.
- 8.- Fertilizantes.
- 9.- Nebulizador.
- 10.- Sistema de riego.
- 11.- Plaguicidas.
- 12.- Herramientas agrícolas manuales.

El equipo y materiales enumerados hasta este momento comprende los elementos idóneos que deben integrar un laboratorio e invernadero dedicado a la producción de plantas micropropagadas, pero debido a que el costo de adquisición de varios de estos elementos resulta muy elevado, en un capítulo posterior se sugerirán algunas sustituciones que con un poco de práctica pueden dar tan buen resultado como los equipos de patente.

CAPITULO IV

EL MEDIO DE CULTIVO

- IV.1. CLASIFICACION PRACTICA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.**
- IV.2. COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.**
- IV.3. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.**

IV.1. CLASIFICACION PRACTICA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es una solución en la que son proporcionados aquellos elementos y sustancias que requiere un organismo o tejido para mantener alguna o todas sus funciones biológicas.

Un aspecto importante de la nutrición en condiciones de cultivo "in vitro" es que en la mayor parte del proceso y mientras que no se genere un sistema "radicular" funcional, los tejidos se van a nutrir por difusión, lo cual establece dos características de suma importancia que deben poseer los nutrimentos:

- 1) Estar disponibles en forma altamente solubles, lo más puros químicamente y en las cantidades adecuadas.
- 2) Las formas iónicas que se establezcan en el medio diluido sean de fácil asimilación y traslocación dentro de los tejidos.

Los tejidos vegetales -al menos en su fase de adaptación al cultivo "in vitro", y dependiendo de su tamaño y grado de diferenciación- van a comportarse de manera heterótrofa; razón por la cual es necesario tomar en cuenta en la planeación y elaboración de los medios la participación de sustancias inorgánicas, vitaminas, azúcares, aminoácidos, sustancias reguladoras del crecimiento vegetal y en algunos casos extractos de frutas y levaduras.

Los medios de cultivo para micropropagación pueden ser clasificados de acuerdo a los siguientes criterios prácticos:

- 1) Composición química.
- 2) Consistencia o matriz de difusión.
- 3) Patrón morfogénico.

4) Finalidad.

1) Clasificación de medios de cultivo de acuerdo a su composición química.

Dependiendo principalmente del tipo de sales y las cantidades en que se encuentren constituyendo el medio de cultivo existen los medios básicos y los medios ricos en sales.

Los medios básicos son menos concentrados y/o con menor tipo de sales que los medios ricos.

2) Clasificación de los medios de cultivo por su consistencia o matriz de difusión.

Según esta clasificación los medios pueden ser líquidos o sólidos.

Los medios líquidos se presentan como soluciones acuosas; por lo regular necesitan permanecer en constante agitación para que el explante reciba una buena aireación. Este tipo de medio es empleado tanto en fases de adaptación como en fases de multiplicación por ruta embriogénica, (Davis y Baker, 1977).

Los medios líquidos han sido ampliamente utilizados para la producción de células en suspensión y para la obtención de metabolitos secundarios.

Los medios sólidos varían en su grado de dureza dependiendo de la concentración a la que se agregue el agar. El rango de empleo de este constituyente varía del 0.6% al 1.0% peso/volumen.

Los medios sólidos son empleados en casos en los que la inducción a la organogénesis y/o la orientación o polaridad del explante es primordial para obtener una determinada respuesta biológica.

El medio sólido es quizás el más ampliamente utilizado debido a su fa-

ilidad de manejo y a que no requiere de equipo adicional -como agitac----- res-, también permite detectar contaminaciones fungosas o bacterianas rápidamente.

3) Clasificación según el patrón morfológico.

Esta clasificación esta basada principalmente en las rutas de producción celular o tisular que son la ruta embriogénica y la ruta organogénica.

La ruta embriogénica es aquella en la cual se induce al explante a la producción de una masa celular conocida como "callo", en la cual no existe una organización estructural del tejido. Este callo es posteriormente llevado a condiciones de cultivo que permitan la formación de estructuras proembrionarias y embrionarias que a su vez darán origen a plántulas de origen somático. De aquí que los medios empleados con estos fines pueden ser clasificados como medios para embriogénesis o desdiferenciación.

En la ruta organogénica el explante es inducido a producir estructuras perfectamente organizadas como brotes y raíces o bien plántulas completas - sin pasar por estadios desdiferenciados, de aquí que los medios empleados - en este proceso puedan ser clasificados como medios para organogénesis o diferenciación.

4) Clasificación de los medios según su finalidad.

Según la finalidad para la que es destinado un medio de cultivo, se puede establecer la siguiente clasificación:

Medio de adaptación, medio de multiplicación, medio de enraizamiento y medio de conservación.

Los medios de adaptación están destinados a cubrir las necesidades del tejido o explante en el momento en que es transferido de su contexto planta a las condiciones "in vitro". Son medios en los que las sales están en ba--

jas concentraciones y algunas de las veces se recomienda no emplear reguladores del crecimiento vegetal. Estos medios son empleados por periodos relativamente cortos (2-6 semanas). Como su nombre lo indica sirven para permitir al tejido adaptarse a las condiciones de cultivo "in vitro" y a reponerse del choque que le ocasionan los procesos de lavado, desinfectado y disecación.

Los medios de multiplicación se caracterizan por ser ricos en sales y por estar presentes sustancias reguladoras del crecimiento vegetal que promueven la división celular como citocininas y auxinas combinadas. Este tipo de medios pueden ser tanto líquidos como sólidos y pueden estar basados tanto en una ruta embriogénica como organogénica, pero su característica fundamental estriba en su capacidad de multiplicación de biomasa.

Los medios de enraizamiento tienen como objetivo la generación de raíces en las plántulas obtenidas "in vitro". En este tipo de medios la concentración de sacarosa por lo regular es más baja que en los medios de multiplicación y en frecuentes ocasiones se encuentra la adición del ácido indolbutírico. Algunas veces también se reporta el empleo de altas intensidades de luz (10,000 lux) que en combinación con bajas concentraciones de sales - inducen la proliferación de raíces, (Hynelman, Hasegawa y Bressan, 1982). -

Los medios de conservación están destinados a detener dentro de lo posible, el desarrollo de los tejidos o de las plántulas, pero sin menoscabo de sus cualidades fisiológicas. En este tipo de medios las plántulas pueden permanecer "suspendidas" por periodos de varias semanas.

IV.2. COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo empleado en micropropagación contiene los siguientes tipos de componentes:

Compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos, complejos orgánicos, matriz del medio y otros factores.

Compuestos Inorgánicos.

Este grupo de nutrimentos está constituido por los macronutrimentos y los micronutrimentos.

En el conjunto de los macronutrimentos se encuentran aquellos elementos que la planta requiere en grandes cantidades como el nitrógeno, el fósforo, el potasio, el calcio, el magnesio y el azufre.

El nitrógeno es proporcionado en forma de NH_4NO_3 , KNO_3 o en forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

El potasio es proporcionado por el KCl , el KNO_3 y el KH_2PO_4 .

El fósforo es proporcionado por el KH_2PO_4 o el NaH_2PO_4 .

El azufre es suministrado en forma del radical sulfato en los siguientes compuestos: MgSO_4 , que también satisface la demanda de magnesio, el MnSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 y FeSO_4 los cuales cubren también las necesidades de microelementos. El CaCl_2 y el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ proporcionan calcio, (Murashigue y Skoog, 1962).

Los micronutrimentos son aquellos elementos que las plantas superiores requieren en pequeñas cantidades para su nutrición, y entre éstos se encuentran el Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co, Mo y Cl.

El hierro lo proporciona el FeSO_4 , el manganeso el MnSO_4 , el cinc el ZnSO_4 , el cobalto el CoCl_2 , el molibdeno el NaMoO_4 y el boro el H_3Bo_3 , (Murashigue y Skoog, 1962).

Compuestos Orgánicos.

En este grupo están comprendidos aquellos compuestos de origen orgánico indispensables para la nutrición vegetal. Entre estos se encuentran:

- 1.- Azúcares o fuentes de carbono.
- 2.- Vitaminas.
- 3.- Aminoácidos.

4.- Substancias reguladoras del crecimiento vegetal.

1.- Azúcares o Fuentes de Carbono.

Entre los azúcares más comunmente empleados en micropropagación se encuentra la sacarosa, la cual es adicionada en un rango que oscila entre 20 y 30 grs. por cada litro de medio. Otra azúcar empleada, aunque con menor frecuencia que la anterior, es la glucosa la cual es añadida en una concentración que oscila entre los 20 y 40 grs. por cada litro de medio. El mio-inositol es agregado a los medios de cultivo como factor de crecimiento a una concentración de 100 mg/lt. Existen pocos casos reportados en los que es empleada la dextrosa como fuente de carbono, (Dodds y Roberts, 1985).

2.- Vitaminas.

Las vitaminas más ampliamente utilizadas en micropropagación comprenden a las hidrosolubles del complejo B cuya función general es la de servir como coenzimas de procesos catalíticos, (Lehninger, 1970). Estos compuestos son adicionados al medio en concentraciones muy pequeñas que oscilan en el rango de 0.1 mg/lt a 0.4 mg/lt.

Las vitaminas más comunmente utilizadas son: tiamina (B₁), ácido nicotínico (niacina) y piridoxina (B₆), (Murashigue y Skoog, 1962). En algunos reportes se menciona el empleo del ácido para aminobenzoico, del ácido ascórbico el cual es agregado también por su capacidad antioxidante, así como la biotina o vitamina H, el clorhidrato de colina, el ácido fólico, el pantotenato de calcio, la rivotriavina y la cianocobalamina, (Skirvin y Chu, - 1979).

3.- Aminoácidos.

En la mayoría de los reportes se menciona a la Glicina como el único aminoácido empleado, aunque existen algunos otros trabajos en los cuales se indica el empleo de varios aminoácidos, como es el caso del medio Norstog - para embriones de cebada cultivados "in vitro".

En otros casos cuando es necesaria una fuente suplementaria de Nitrógeno se recomienda el empleo de hidrolizado de caseína, el cuál está constituido por un total de 18 aminoácidos. Otros aminoácidos que han demostrado tener un efecto positivo en el desarrollo de los tejidos cultivados "in vitro" son el ácido L-aspartico, la L-aspargina, el ácido L-glutámico, la L-glutamina y la L-arginina, (Dodds y Roberts, 1985). La L-metionina tiene un efecto favorable en el desarrollo de los tejidos cultivados "in vitro" induciendo la síntesis de etileno, el cual propicia la maduración de los órganos vegetales, (Dodds y Roberts, 1985).

4.- Substancias reguladoras del crecimiento vegetal.

En este grupo de compuestos se tiene la siguiente clasificación:

Substancias promotoras y Substancias inhibidoras del crecimiento vegetal.

Substancias promotoras del crecimiento vegetal.

En este tipo de substancias se encuentran 3 géneros a saber: Auxinas, citocininas y giberelinas, (Salisbury, 1957).

La mayoría de los cultivos "in vitro" tienen un requerimiento primordial de las auxinas y citocininas. Las giberelinas son empleadas solo en casos muy específicos.

Auxinas.- Son substancias reguladoras del crecimiento vegetal relacionadas con la estructura indol del ácido indolacético y cuyo efecto biológico está directamente implicado en la síntesis de enzimas hidrolíticas de pared celular. Estas substancias participan en el proceso de elongación celular en el brote y la vacuolización en general, (Devlin, 1976).

Las substancias con efecto auxínico más comunmente usadas en micropropagación son el ácido indolacético, el ácido naftalenacético, el ácido in-

dolbutírico y el ácido 2,4-dicloro fenoxiacético. Esta última es una auxina que al ser aplicada en una concentración de 0.2 - 2.0 mg/l es muy efectiva para la inducción a la proliferación de "callo". El ácido indolbutírico está reportado como una auxina con una fuerte inducción a la formación de rajes. El ácido naftalenacético es adicionado en concentraciones que van de 0.1 a 2.0 mg/l y es una auxina sintética que no está sujeta a oxidación enzimática como su análogo el ácido indol 3-acético, siendo ampliamente utilizada en micropropagación.

Citocininas.- Este grupo de sustancias está relacionado estructuralmente con las purinas. El efecto de las citocininas es el de promover la división celular, (Devlin, 1976).

Dentro de las citocininas las más usuales son la cinetina, la bencil adenina, la zeatina y la isopentenil adenina.

La cinetina y la bencil adenina son sintéticas, mientras que la zeatina y la isopentenil adenina son de ocurrencia natural. Existe en la leche de coco la difenil urea que es un factor que tiene efecto citocinínico, (Dodds y Roberts, 1985).

Giberelinas.- Las giberelinas comprenden un grupo aproximado de 50 - sustancias que están relacionadas con la estructura de gibano. El efecto en que están implicados estos promotores es en la diferenciación celular y el crecimiento secundario, (Devlin, 1976).

En cultivo de tejidos vegetales no es frecuente encontrar reportada la utilización de las giberelinas aunque cuando se mencionan solo se emplean el AG₃, AG₄ y el AG₇. El AG₃ ha sido empleado en el cultivo de meristemos (Morel y Muller, 1964) y en la diferenciación de plántulas obtenidas de brotes en el cultivo "in vitro" de fresa, (Adams, 1972).

Substancias inhibidoras del desarrollo vegetal.

Este tipo de substancias es raramente aplicada a los medios de cultivo destinados a micropropagación ya que su efecto es inhibidor del desarrollo. Dentro de las substancias inhibidoras se encuentra el etileno y el ácido abscísico.

El etileno está íntimamente relacionado con el catabolismo de L-metionina y está implicado en procesos de maduración.

El ácido abscísico está íntimamente relacionado con la ruta de síntesis del ácido giberélico; probablemente la ramificación que desvía la síntesis hacia uno u otro lado este regulada por medio del fitocromo. El ácido abscísico está implicado en procesos de senectud y caída de órganos. La actividad abscísica se ve suspendida por la aplicación de citocininas. En cultivo de tejidos vegetales ha sido aplicado este ácido con fines de investigación para dilucidar su mecanismo de acción, (Devlin, 1976).

Matriz del Medio.

Como ya se indicó con anterioridad los medios pueden ser líquidos o sólidos.

En los medios líquidos el tejido puede mantenerse flotando en el medio o bien el canal de difusión puede establecerse a través de un puente de papel filtro sobre el cual se hace descansar el explante.

En los medios sólidos o semisólidos la matriz de difusión la constituye el agar-agar, el cual puede estar a una concentración de 0.6 - 1.0 % peso/vol. Los agares comerciales contienen una serie de impurezas orgánicas e inorgánicas que no son especificadas en la etiqueta; razón por la cual se recomienda emplear agares especiales para cultivo de tejidos.

Existen algunos reportes que informan de la sustitución del agar por un copolímero de almidón, (Cook, 1977).

Complejos Orgánicos.

En este grupo de sustancias quedan comprendidas extractos naturales - crudos de frutas, plantas y microorganismos.

Entre los complejos más ampliamente utilizados se tienen: el jugo de jitomate, el puré de plátano, el agua de coco, el extracto de levadura, el hidrolizado de caseína, el jugo de naranja y el de piña. De la lista anterior es el agua de coco uno de los complejos orgánicos más empleado ya que una vez esterilizada en autoclave presenta una gran actividad citocinética debido a la liberación de difenil urea, (Jacobs, 1979). La concentración a la que se emplea este suplemento es de 10 a 15 % volumen/volumen.

El hidrolizado de caseína es otro suplemento reportado en la composición de medios de cultivo. Este compuesto aporta 18 aminoácidos en el medio y se ha comprobado su efectividad al promover el desarrollo, (Klein y - - Klein, 1970).

Para el cultivo de protocornos de orquídea se emplea el puré de plátano verde a una concentración de 150 grs/l de medio, lográndose una alta proliferación de estas estructuras.

Otros Factores que Constituyen a los Medios de Cultivo.

Otros factores que intervienen en la composición de los medios de cultivo son:

El factor osmótico.

El agua.

Carbón activado.

Antioxidantes.

El factor osmótico y el agua.

La capacidad de las células vegetales de disponer del agua del medio la determina la diferencia en la concentración de sales en la solución interna de la célula y la concentración de las sales en el medio. Esta diferencia determinará un gradiente de difusión de agua que será directamente proporcional al grado de diferencia de concentración y tendrá un sentido de flujo de menor concentración a mayor concentración de sales.

Los componentes del medio que afectan la presión osmótica son el agar y/o los azúcares y algunos compuestos no metabólicos adicionados como reguladores de la presión osmótica como el manitol y el sorbitol. Un factor determinante en la disponibilidad de agua es la concentración del agar ya que una de las características del estado coloidal es la imbibición del agua dentro de las micelas del gel.

El agua empleada en la elaboración de un medio de cultivo deberá ser bidestilada y desionizada.

El carbón activado y los antioxidantes.

Otro elemento que con cierta frecuencia es adicionado al medio de cultivo es el carbón activado, el cual sirve como una trampa para recoger sustancias contaminantes soltadas por los tejidos del medio. Un efecto adicional del carbón es el oscurecimiento del medio, lo cual es probable que estimule el enraizamiento.

Debido a las lesiones ocasionadas en los explantes a la hora de realizar su disección se generan reacciones de oxidación desencadenadas por peroxidasas y deshidrogenasas motivo por el cual se hace necesario con cierta frecuencia añadir sustancias que eviten este fenómeno. Entre estas sustancias se encuentra el ácido cítrico el cual es adicionado a una concentración de 1 a 10 mg/l, (Hurtado y Merino, 1987).

IV.3. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La preparación de los medios de cultivo comprende los siguientes pasos:

- 1) Pesado de reactivos.
- 2) Preparación de soluciones Stock.
- 3) Preparación del medio de cultivo
- 4) Calibración del pH.
- 5) Agregación del agar.
- 6) Envasado.
- 7) Esterilizado de los frascos con medio de cultivo.

1) Pesado de reactivos.

Para la realización del pesado de reactivos se recomienda observar las siguientes precauciones:

- a) Emplear balanzas perfectamente calibradas y niveladas, con el menor rango de error posible y con el grado de sensibilidad adecuado al peso por determinar.
- b) Emplear sales con el grado de hidratación adecuado.
- c) Verificar que las sales no hayan sufrido alteración alguna debida a malas condiciones de almacenaje.
- d) Una vez realizada la determinación de pesos se debe limpiar, cerrar, guardar y proteger el equipo de medición para evitar al máximo su deterioro.

Para el pesado de reactivos se requiere el siguiente equipo y materiales:

- 1.- Sales inorgánicas.
- 2.- Compuestos orgánicos.
- 3.- Balanza analítica.
- 4.- Balanza granataria.
- 5.- Espátula grande y pequeña.
- 6.- Papel aluminio.
- 7.- Brocha de pelo suave.
- 8.- Franela limpia.

2) Preparación de soluciones Stock.

Una solución Stock es aquella en la que se encuentra concentrada una sustancia varias veces y que puede ser utilizada gradualmente tomando las alícuotas correspondientes.

Las precauciones que deben observarse en este paso son:

- a) Hacer los cálculos adecuados que permitan tener la cantidad necesaria de reactivo por volumen de solución.
- b) En caso de que una solución contenga más de un reactivo, disolver perfectamente un reactivo antes de agregar el siguiente.
- c) Preparar cantidades de soluciones Stock calculando que serán consumidas en un lapso no mayor a 30 días después de su elaboración.
- d) Almacenar las soluciones Stock en condiciones de refrigeración y en frascos color ámbar.
- e) Hacer revisiones periódicas de las soluciones Stock, con el fin de descartar aquellas en las que se detecte la aparición de hongos o

bacterias.

- f) Si se van a disolver dos o más sustancias, poner aquéllas que no reaccionan entre sí para evitar que se formen compuestos insolubles.

Para la preparación de soluciones Stock se requieren los siguientes materiales:

- 1.- Sales inorgánicas y compuestos orgánicos.
- 2.- 11 frascos de 250 ml color ámbar con tapón.
- 3.- Agua bidestilada y desionizada.
- 4.- Refrigerador.
- 5.- Probetas de 250 ml.
- 6.- Pipetas volumétricas o graduadas de 1 ml.

A continuación se dá una lista de los reactivos empleados en el medio de Murashigue y Skoog, debido a que este es uno de los medios de cultivo - más completo y con mucha frecuencia utilizado como punto de partida para una gran mayoría de especies vegetales sometidas a micropropagación.

Desarrollo: De la tabla 1 pesar de cada uno de los reactivos enlistados en ella la cantidad correspondiente a la columna correspondiente a - - "Reactivo concentrado en mg".

Una vez pesadas las sales diluirlas en agua bidestilada y desionizada en los volúmenes indicados en el procedimiento de preparación de soluciones concentradas.

Tabla 1, Medio Murashigue y Skoog rico en sales.

Reactivo	mg/l	Factor de multiplicación	Reactivo concentrado en mg.
$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	1650.000	5	8250.0
KNO_3	1900.000	5	9500.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000	10	4400.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000	10	3700.0
KH_2PO_4	170.000	10	1700.0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800	10	278.0
Na EDTA	33.600	10	336.0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.300	10	223.0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600	10	86.0
H_3BO_3	6.200	10	62.0
KI	0.830	20	16.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250	100	25.0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	1000	25.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	1000	25.0
Myo-inositol	100.000	10	1000.0
Acido Nicotínico	0.500	20	10.0
Piridoxina H.cl	0.500	20	10.0
Tiamina H.cl	0.100	100	10.0
Glicina	2.000	10	20.0
Kinetina	10.000	-	10.0
ANA	10.000	-	10.0
AIA	10.000	-	10.0
2,4-D	10.000	-	10.0

Procedimiento para la preparación de soluciones concentradas.

Solución "A".

Pesar 8250 mg de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ y 9500 mg de KNO_3 . Diluir ambos en 250 ml de agua bidestilada desionizada.

Solución "B".

Pesar 4400 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y diluirlos en 100 ml de agua bidestilada desionizada.

Solución "C".

Pesar 25 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y diluirlos en 100 ml de agua bidestilada desionizada. Tomar 2 ml de esta solución y agregarlos a los 98 ml de agua bidestilada desionizada donde se diluyen 16.6 mg de KI para completar 100 ml de solución concentrada "C".

Solución "D".

Para la preparación de la solución "D" pesar 25 mg de Na_2MoO_4 y diluirlos en 10 ml de agua bidestilada desionizada, de estos 10 ml de solución tomar 1 ml y agregarlo a los 99 ml de agua donde se diluyen 1700 mg de KH_2PO_4 y 62 mg de H_3BO_3 para completar 100 ml de solución "D" concentrada.

Solución "E".

Pesar 25 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y diluirlos en 100 ml de agua bidestilada desionizada, de esta solución tomar 1 ml y agregarlo a los 99 ml de agua bidestilada y desionizada donde se diluyen 3700 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 223 mg de MnSO_4 y 86 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para completar 100 ml de solución concentrada "E".

Solución "F".

Diluir 278 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua bidestilada y desionizada. Poner a entibiar la solución.

Diluir 336 mg de Na_2 EDTA en 50 ml de agua bidestilada y desionizada. Poner a entibiar la solución.

Vertir una solución sobre la otra y agitar hasta obtener una solución color amarillo-anaranjado.

Soluciones concentradas de compuestos orgánicos.

Solución I.

Pesar 1000 mg de mio-inositol y diluirlos en 100 ml de agua bidestilada desionizada.

Solución II.

Pesar 20 mg de ácido Nicotínico y diluirlos en 100 ml de agua bidestilada desionizada.

Solución III.

Pesar 20 mg de Clorhidrato de Piridoxina y diluirlos en 100 ml de agua bidestilada y desionizada.

Solución IV.

Pesar 10 mg de Clorhidrato de Tiamina y diluirlos en 100 ml de agua bidestilada y desionizada.

Solución V.

Pesar 20 mg de Glicina y diluirlos en 100 ml de agua bidestilada desio

nizada.

Soluciones concentradas de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal.

Para la preparación de soluciones concentradas de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal es recomendable pesar 10 mg de la sustancia y diluirlos en 10 ml de agua bidestilada y desionizada para facilitar su dilución sucesiva 1/10 y obtener concentraciones de 1 mg, 0.1 mg, 0.01 mg, etc. del regulador.

Para diluir el ácido indolacético, el ácido naftalenacético, el ácido indolbutírico y el ácido 2,4-Dicloro fenoxiacético se debe emplear alcohol etílico al 50% .

Para diluir la 6-Bencil adenina y la cinetina se debe emplear una solución al 0.1 N de KOH, la cual será añadida poco a poco hasta lograr la disolución de la citocinina en cuestión y aforando a 10 ml con agua bidestilada desionizada.

3) Preparación de los medios de cultivo.

Para la preparación de los medios de cultivo se requieren los siguientes materiales y equipo:

- 1.- Soluciones concentradas A, B, C, D, E, F, I, II, III, IV, V y S.R.C.V.
- 2.- Sacarosa.
- 3.- Agar-agar.
- 4.- Solución KOH y HCl (0.1 N).
- 5.- Soluciones Buffer pH 4.0 y pH 7.0.
- 6.- Pipetas de 10, 5 y 1 ml.
- 7.- Vasos de precipitados de 1 a 3 l.
- 8.- Potenciómetro.
- 9.- Agitador con parrilla eléctrica.
- 10.- Autoclave.
- 11.- Frascos gerber de desecho.
- 12.- Papel aluminio extragrueso.
- 13.- Ligas.
- 14.- Matraz aforado o probeta de 1 l.

El primer paso para la preparación de medios es tomar de las soluciones concentradas los siguientes volúmenes por cada litro de medio a preparar:

Sol. A	-	50 ml
Sol. B	-	10 ml
Sol. C	-	5 ml
Sol. D	-	10 ml
Sol. E	-	10 ml
Sol. F	-	10 ml
Sol. I	-	10 ml
Sol. II	-	5 ml
Sol. III	-	5 ml

Sol. IV - 1 ml
Sol. V - 10 ml y

Solución concentrada de S.R.C.V.- Volúmenes proporcionales a la concentración a probar o utilizar, partiendo de la solución concentrada 10 mg/10 ml.

- 4) Calibración del pH
- 5) Agregación del agar
- 6) Envasado
- 7) Esterilizado de los frascos con medio de cultivo.

A continuación del paso 3)

- En una probeta de 1000 ml agregar 250 ml de agua bidestilada desionizada e ir añadiendo los volúmenes indicados de cada una de las soluciones concentradas.
- Una vez que se han añadido las soluciones concentradas añadir añadir la sacarosa y disolver por medio de agitación; en este punto aforar aproximadamente a 980 ml.
- Añadir las S.R.C.V.
- Aforar a 1000 ml.
- Ajustar el pH a 5.6 agregando KOH o HCl (0.1 N) respectivamente.
- Vertir el litro de medio en un vaso de precipitados.
- Calentar el litro de medio y agregar el agar-agar lentamente, al -

mismo tiempo que se agita la solución.

- Disolver el agar hasta que la solución quede color ámbar transparente.
- Poner de 25 a 30 ml de medio en cada frasco gerber.
- Tapar con papel aluminio los frascos gerber, sujetando el papel con una liga.
- Poner los frascos gerber con medio en la autoclave y esterilizarlos a 1 Kg/cm^2 de presión durante 15 minutos.
- Dejar enfriar la autoclave antes de sacar los medios para evitar cambios bruscos de presión dentro de los frascos con medio.

Precauciones:

- a) No dejar hervir y subirse el medio de cultivo en el momento de disolver el agar-agar el cual deberá quedar perfectamente disuelto.
- b) Sellar bien los frascos con el papel aluminio, sin dejar arrugas - en el borde de la boca del frasco para evitar una posterior contaminación.
- c) No esterilizar los medios por más de 15 minutos a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ para evitar que se caramelicen la sacarosa y el agar.

CAPITULO V

PREPARACION Y DISECCION DEL EXPLANTE

- V.1. CRITERIOS DE SELECCION DE LAS PLANTAS DONADORAS.
- V.2. TRATAMIENTOS DE LAS PLANTAS DONADORAS PREVIOS A LA MICROPROPAGACION.
- V.3. TIPOS DE EXPLANTES QUE PUEDEN SER MICROPROPAGADOS.
- V.4. SELECCION DEL EXPLANTE.
- V.5. LAVADO Y DESINFECCION DEL EXPLANTE.
- V.6. DISECCION DEL EXPLANTE.
- V.7. OBTENCION DE CADA UNO DE LOS DIVERSOS TEJIDOS.

V.1. CRITERIOS DE SELECCION DE LAS PLANTAS DONADORAS

Para seleccionar las plantas donadoras de explantes se deben tener presentes los siguientes criterios:

- 1.- Las plantas deben ser portadoras de las características tipo.
- 2.- Debe existir referencia de su capacidad de regeneración o proliferación.
- 3.- Deben ser plantas que presenten una buena productividad.
- 4.- Las plantas deben presentar resistencia o tolerancia a las principales plagas o enfermedades.
- 5.- Las plantas deberán haber recibido las prácticas culturales adecuadas.
- 6.- No se deberá permitir que las plantas tengan una productividad ni de brotes ni de frutos abundante en el ciclo anterior a la colecta de explantes, (Hartman y Kester, 1975).

En la práctica resulta difícil poder controlar todos los criterios antes mencionados; pero es muy importante, al menos, controlar los 4 primeros, ya que de esto dependerá en gran medida el propagar a los individuos adecuados.

V.2. TRATAMIENTOS DE LAS PLANTAS DONADORAS PREVIOS A LA MICROPROPAGACION

En varias ocasiones es necesario tener bajo tratamiento y/o observación a las plantas de las cuales se van a tomar los explantes debido a las condiciones fitosanitarias o a la deficiencia en técnicas de cultivo a que han estado sometidas.

En otros casos el tratamiento se aplica con la finalidad de inducir a la planta a una mayor producción de brotes o ramas "in situ" con el objeto de disponer de un número mayor de explantes para micropropagar, o bien el tratamiento puede estar encaminado a elevar el porcentaje de seguridad en la certificación de las condiciones sanitarias y de libertad de enfermedades en las plantas obtenidas "in vitro".

Los tratamientos de las plantas donadoras previos a la micropropagación pueden ser agrupados en tratamientos físicos y tratamientos químicos.

Dentro de los tratamientos químicos se tienen:

Aplicación de plaguicidas, fungicidas y/o bactericidas.

Aplicación de antibióticos.

Aplicación de fertilizantes y reguladores del crecimiento vegetal.

Dentro de los tratamientos físicos están:

La Termoterapia.

El Fototratamiento.

Las Podas.

Aplicación de plaguicidas, fungicidas y bactericidas.

Este tratamiento debe llevarse a cabo cuando se detecta la presencia de insectos chupadores o masticadores en la superficie del vegetal o cuando se tiene la sospecha o existe la evidencia de ataque por hongos y/o bacterias.

En el caso de fungicidas y bactericidas existen los denominados de contacto y los sistémicos; estos últimos son capaces de eliminar a los microorganismos alojados en los sistemas de conducción y en diversos tejidos internos de la planta.

Es recomendable aplicar este tipo de tratamientos tomando las siguientes precauciones:

- a) Llevar a cabo las aplicaciones necesarias que garanticen la supresión del agente patógeno.
- b) Darle tiempo a la planta para que pueda eliminar el químico y no introducir variables no controladas a la hora de estar micropropagando.
- c) Observar las indicaciones en cuanto a dosificación, métodos de aplicación y controles que el fabricante especifique.

Aplicación de antibióticos.

En este tipo de tratamientos es necesario observar las precauciones señaladas en la aplicación de fungicidas y plaguicidas. Es necesario hacer in capie en dejar recuperar a la planta el tiempo suficiente para eliminar el antibiótico y/o cualquier efecto residual que derive de su aplicación.

Aplicación de fertilizantes y/o sustancias reguladoras del crecimiento vegetal.

Cuando las plantas donadoras de explantes no han recibido las técnicas culturales adecuadas pueden presentar síntomas de carencia nutricional, lo que hace imperativo el someterlas a un tratamiento de fertilización y vigorización.

El programa de fertilización debe ser elaborado de acuerdo al tipo de plantas que se está empleando, a la edad de la planta y a la disponibilidad de fertilizantes.

En algunos casos es necesario aplicar además de los fertilizantes S.R. C.V. para inducir a las yemas a brotar antes de tiempo o compensar conteni-

dos hormonales internos deficientes debido a la falta horas frío.

Tratamientos físicos.

En algunas ocasiones es posible aplicar estímulos físicos como luz y calor para obtener una respuesta determinada que favorezca el comportamiento de los tejidos "in vitro".

Termoterapias.

Este tipo de tratamiento se aplica a plantas en las cuales se tiene sospecha o existe la evidencia de cuadros virosos y consiste en someterlas a una temperatura de 40-42°C durante varios días (7-14 días) para reducir - la tasa de multiplicación de los virus y darle tiempo al meristemo de alejarse de las zonas infestadas, (Hartman y Kester, 1975).

Fototratamiento.

Este tipo de tratamiento se aplica con frecuencia a semillas en el momento del disparo de la germinación y principalmente se basa en mantener - creciendo a estas plantas en condiciones de obscuridad para que los cloroplastos no se diferencien y de esta manera poder inducir a los tejidos a la producción de callo una vez que son cultivados "in vitro".

Podas.

La poda puede ser considerada como un tratamiento previo a la micropropagación cuando es efectuada con el fin de inducir a las yemas axilares a brotar para poder disponer de un número mayor de yemas o meristemas para - ser micropropagados.

V.3. TIPOS DE EXPLANTES QUE PUEDEN SER MICROPROPAGADOS

En teoría cualquier tejido vegetal que esté constituido por células -

que contengan protoplastos puede ser micropropagado. En la práctica es más fácil trabajar con tejidos cuyo grado de diferenciación se semeje al del tejido parenquimático, es decir tejidos en los que las células presenten las siguientes características:

- Una relación núcleo/citoplasma grande,
- paredes primarias delgadas ni lignificadas y
- poco grado de vacuolación.

A la fecha se han utilizado explantes de toda la planta y en todos los estados de desarrollo, lo que ha permitido la siguiente clasificación:

- Cultivo "in vitro" de yemas.
- Cultivo "in vitro" de meristemas.
- Cultivo "in vitro" de pecíolos.
- Cultivo "in vitro" de hoja.
- Cultivo "in vitro" de tallo.
- Cultivo "in vitro" de embriones.
- Cultivo "in vitro" de cotiledones.
- Cultivo "in vitro" de anteras.
- Cultivo "in vitro" de ovarios.
- Cultivo "in vitro" de polen.

Cultivo "in vitro" de raíz.

En términos generales el procedimiento para el cultivo "in vitro" de cada uno de los tejidos u órganos antes mencionados no difiere mucho entre sí; encontrándose las diferencias más significativas en lo que respecta a la forma de disectar el tejido, el tipo y cantidad de S.R.C.V. adicionados al medio, la cantidad de luz aplicada en la cámara de crecimiento y a la época de colecta del explante.

V.4. SELECCION DEL EXPLANTE

Uno de los principales problemas a que se enfrenta el investigador - cuando empieza a trabajar con una especie no reportada, es el de elegir el explante o los explantes que cultivará. Los criterios que pueden en un momento dado dar la respuesta a esta pregunta son:

1. El objetivo que persigue al micropropagar dicha especie.
2. La observación de las técnicas empleadas en los sistemas tradicionales de propagación de dicha especie lo cual indicará cuales son los tejidos con la mayor capacidad regenerativa.

En caso de tratarse de una especie silvestre la cual se pretende propagar; la observación de su comportamiento reproductor en el habitat natural, seguramente dará alguna pauta para elegir el explante adecuado para proceder a su micropropagación.

En la actualidad son cerca de un millar de especies en las que se ha practicado y establecido la técnica o técnicas de micropropagación. Esto implica que se dispone de literatura en donde se especifica el medio empleado, el tipo de explante cultivado, condiciones de esterilización, incubación y de transferencia a suelo.

Resulta de suma importancia aclarar cuales son los criterios que deter

minan la elección de un explante lo cual está en función del objetivo perseguido. A continuación se da una lista de los diversos tipos de explantes y los resultados obtenidos al micropropagarlos:

Grano de polen.- Célula gamética masculina, se han obtenido plantas haploides en las cuales se han realizado cruza de células somáticas por medio de la técnica de fusión de protoplastos.

Ovocélulas.- Célula gamética femenina; el cultivo "in vitro" de este tipo de explante está en proceso de investigación.

Meristemas caulinares.- Se reporta su empleo frecuentemente cuando se pretende producir masivamente plantas libres de virosis.

Yemas.- Ampliamente utilizadas en la micropropagación de diversas especies con el fin de obtener producciones masivas de plantas.

Yemas con porciones de tallos.- Empleados frecuentemente en la producción de plantas por la ruta organogénica; de aquí que el número de plantas obtenidas por explante no sea muy grande.

Embriones.- Se reporta su empleo sobre todo para la producción de plantas libres de virosis con el fin de obtener patrones clonales sanos. También son muy utilizados en la técnica de microinjerto, ya que por medio de esta técnica se acortan los tiempos de germinación y de injertación, al mismo tiempo que se eleva la calidad fitosanitaria de las plantas.

Pecfolos, tallos y hojas.- Son empleadas en la producción masiva de plantas ya sea siguiendo la vía organogénica y/o la embriogénica. Las plantas producidas a través de estos tipos de explantes están libres de hongos y bacterias, pero no elimina los virus cuando están presentes en las plantas donadoras.

Anteras.- Se ha reportado que con la siembra de estas estructuras se

han obtenido plantas tanto haploides como diploides, dependiendo del tejido del cual surja la proliferación.

V.5. LAVADO Y DESINFECCION DEL EXPLANTE

Para el lavado y desinfección de la superficie del explante se han probado varios tipos de detergente y agentes desinfectantes.

Entre los detergentes que mejor resultado han dado se encuentran los "biodegradables" como el extrán ya que no dejan residuos.

En caso de no disponer de este tipo de detergente se pueden emplear de detergentes comerciales previamente diluidos, pero siempre y cuando el enjuague del material se haga de manera profusa.

Con respecto a los agentes desinfectantes empleados en el esterilizado de los explantes se tienen dos ampliamente reportados:

- a) El hipoclorito de sodio.
- b) El hipoclorito de calcio.

El hipoclorito de sodio es empleado con menor frecuencia que el de calcio debido a que es contaminante, sin embargo se puede utilizar teniendo cuidado en no sobreexponer a los tejidos.

El hipoclorito de calcio es el agente desinfectante más utilizado ya que no lesiona tanto como el anterior a los tejidos y no es tan contaminante.

El alcohol etílico acidificado a un pH 2.0 es también un poderoso germicida solo que posee una gran capacidad de penetración en los tejidos, razón por la que el explante no puede ser expuesto a este agente por más de dos minutos.

Ya sea que se emplee uno u otro agente desinfectante con un tipo de explante determinado, las variables que deben ser tomadas en cuenta son:

- 1) Concentración del agente desinfectante.
- 2) Tiempo de exposición del explante al agente desinfectante.
- 3) Consistencia y grado de madurez del explante.

- 1) Concentración del agente desinfectante y
- 2) Tiempo de exposición del explante al agente desinfectante.

El rango más frecuentemente reportado en la utilización del $\text{Ca}(\text{ClO})$ va del 2% al 10%. Para determinar el punto óptimo de concentración dentro de este rango se procederá de acuerdo a un ensayo "prueba y error" teniendo en cuenta las siguientes precauciones:

- a) Una vez desinfectado y sembrado el explante no debe aparecer contaminación en la base del tejido o en las zonas de la interfase explante-medio de cultivo.
- b) El tratamiento resultará drástico cuando el tejido empiece a perder su característico color verde, lo que implicará una sobredosis del agente desinfectante o una sobreexposición; entonces se procederá a bajar la concentración del desinfectante o a disminuir el tiempo de exposición.

Se puede establecer como "regla general práctica" que dosis menores al 2.5% de $\text{Ca}(\text{ClO})$ y tiempos de exposición menores a 10 minutos resultan insuficientes.

A continuación se dan algunos métodos de lavado y desinfección de explantes:

Método N^o1 (para porciones con tricomas y/o muy sucias):

- 1.- Lavar con detergente las porciones donadoras.
- 2.- Enjuagar de 4 a 6 veces con agua corriente.
- 3.- Sumergir las porciones donadoras en Ca(ClO) al 5% durante 20 minutos.
- 4.- Enjuagar 4 veces con agua destilada.
- 5.- Sumergir las porciones donadoras en alcohol etílico al 70% durante 1 minuto.
- 6.- Sumergir las porciones donadoras en Ca(ClO) al 7.5% durante 20 minutos.
- 7.- Enjuagar 4 veces con agua destilada estéril y en área estéril.

Método N^o2 (para porciones donadoras con una gran cantidad de tricomas, o - muy cerosas o con muchas partículas de tierra adheridas):

- 1.- Lavar con detergente y un cepillo de cerdas suaves.
- 2.- Enjuagar profusamente con agua corriente.
- 3.- Sumergir la porción donadora en Ca(ClO) al 7.5% más tween 20 al 1% durante 20 minutos.
- 4.- Enjuagar 4 veces con agua destilada.
- 5.- Sumergir en Ca(ClO) al 10% más tween 20 al 1% durante 20 minutos.
- 6.- Enjuagar con agua destilada estéril 4 veces y dentro del área estéril.

Método N^o3 (para porciones de plantas que se han desarrollado en ambientes controlados o con tejidos suaves poco serosos o tejidos muy frágiles):

- 1.- Lavar con detergente.
- 2.- Enjuagar con agua corriente.
- 3.- Inmersión en alcohol etílico al 70% durante 1 minuto.
- 4.- Inmersión en Ca(ClO) al 2.5% durante 20 minutos.
- 5.- Enjuagar con agua destilada estéril y dentro del área estéril.

V.6. DISECCION DEL EXPLANTE

Este paso es quizás el que mayor habilidad manual y práctica demanda - debido a que algunos de los tejidos empleados son tan pequeños (0.1 mm-1.0 mm) que es necesario disectarlos en el microscopio estereoscópico.

Otro aspecto muy importante en la obtención del tejido es el conocer - las características anatómicas, histológicas y citológicas de éste, ya que en algunos casos como en el cultivo "in vitro" de los meristemos para la ob_o tención de plantas libres de virus es indispensable sembrar únicamente este tejido para evitar la contaminación vírosa que pudiera acarrear en los te_o jidos próximos a él.

Las precauciones que deben ser observadas en la disección del tejido - son:

- a) Hacer el menor número de cortes posibles.
- b) Hacer cortes precisos.
- c) Emplear herramientas adecuadas y bien afiladas.
- d) Realizar los cortes de manera rápida para evitar la oxidación y - deshidratación.
- e) Disectar el tejido en "seco" para evitar la difusión de virus por medio del agua.
- f) Obtener el o los tejidos bajo el área aséptica una vez que la porción donadora ha sido previamente lavada y desinfectada.
- g) Flamear frecuentemente el instrumental de disección para prevenir al máximo el riesgo de contaminación.

V.7. OBTENCION DE CADA UNO DE LOS DIVERSOS TEJIDOS

Obtención de yemas.

Las yemas pueden ser apicales o axilares. Las yemas apicales siempre están ubicadas en el extremo distal de una rama mientras que las yemas axilares están localizadas en el hueco que forma un pecíolo o una hoja en el punto donde se une al tallo.

Existe otra clasificación en la que se establece una distinción entre yemas foliares o vegetativas y yemas florales o reproductoras. Las yemas foliares son responsables de la producción de tallos y las yemas florales son las que van a diferenciarse en flores.

Las yemas también pueden ser clasificadas de acuerdo a su estado de actividad fisiológica pudiendo ser divididas en yemas en latencia y yemas activas. Las yemas en latencia son aquellas en las que la actividad fisiológica de crecimiento está completamente inhibida y las yemas activas son aquellas en las que el proceso de crecimiento y diferenciación están plenamente manifiestos.

Las yemas están constituidas por los primordios foliares que envuelven al tejido meristemático.

En micropropagación se pueden emplear yemas apicales o axilares y aunque en la mayoría de los casos en que se pretende producir plantas masivamente se escogen las yemas foliares, también es posible producirlas de yemas florales poco diferenciadas.

En algunas plantas herbáceas como el clavel, las yemas axilares localizadas hacia el extremo basal del tallo no responden a las condiciones de cultivo "in vitro" como lo hacen las yemas ubicadas en la región media y distal; incluso se llega a presentar una atrofia anatómica en las yemas basales que se denota por un aplanamiento.

En el caso de algunas yemas con tricomas como en el rosal, durazno, manzana, fresa y crisantemo, es necesario esmerar al máximo el proceso de lavado y esterilizado de los explantes para evitar contaminación en el medio de cultivo.

Cuando las yemas tienden a oxidarse rápidamente después de ser lavadas, esterilizadas y disectadas, pueden añadirse al medio de cultivo ácido cítrico (0.1-10 mg/l) como antioxidante.

A continuación en la figura 1 se ilustra la ubicación y apariencia de yemas axilares y apicales de rosal.

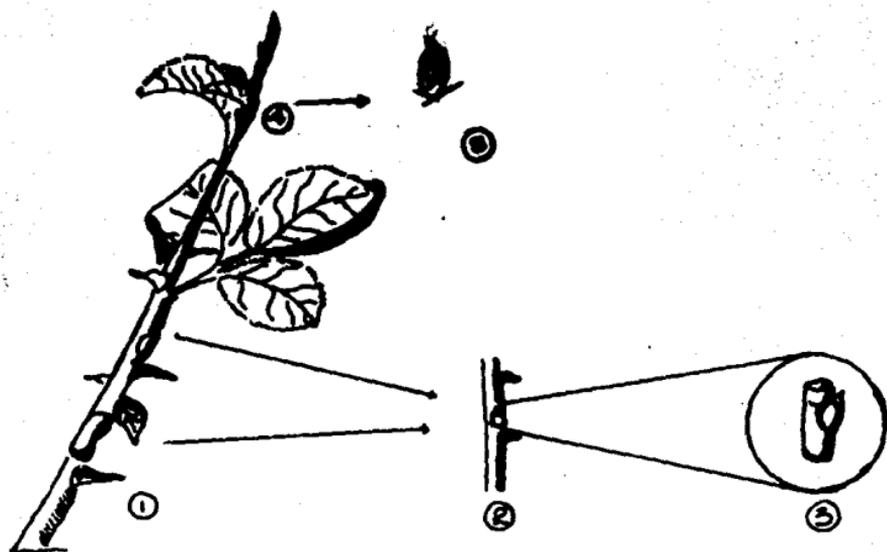


Figura 1. OBTENCION DE YEMAS APICALES Y AXILARES DE ROSAL.

- 1.- Porción distal de una estaca de rosal.
- 2.- Fragmento de estaca con yema axilar una vez que ha sido retirada la hoja.
- 3.- Yema axilar con la porción de tallo con la cual será sembrada en el método de yema con porción de tallo.
- 4.- Apice caulinar.
- 5.- Yema apical.

Obtención de meristemas.

Como su nombre lo indica el meristemo es un tejido implicado en la actividad de división celular. Este tejido es altamente especializado; teniendo como funciones la producción de nuevas células que serán incorporadas al eje de la planta y el perpetuarse así mismo como meristemo, (Esau, 1965).

El crecimiento primario está directamente relacionado con los meristemas apicales, tanto caulinar como radicular; siendo el resultado de este crecimiento el incremento de la superficie de contacto de la planta con el aire, el suelo y eventualmente la formación de estructuras reproductivas.

El cambium es un tejido meristemático implicado en el incremento del volumen del sistema de conducción y en la formación de células de soporte y protección. El crecimiento secundario es el resultado directo de este incremento. Tanto los meristemas apicales como el cambium pueden mostrar fluctuaciones estacionales en su actividad meristemática.

La clasificación más común de los meristemas se basa en la posición que éstos ocupan en la planta agrupándolos en meristemas apicales y meristemas laterales.

Los meristemas apicales están localizados en las puntas o ápices de ramas y raíces. Los meristemas laterales están ubicados de manera paralela al o a los lados del órgano del cual surgen. (Esau, 1965).

Los meristemas también pueden ser clasificados en primarios y secundarios; clasificación basada en la naturaleza de las células que dan origen a los tejidos meristemáticos; de aquí que los primarios son aquellos que derivan de células embrionarias y que siempre se mantienen en relación con el crecimiento, mientras que los meristemas secundarios son aquellos que derivan de células que una vez han pertenecido a tejidos diferenciados o maduros se revierten a una actividad meristemática, (Esau, 1965).

Existe otro tipo de meristemo denominado intercalar el cual se caracteriza por ser un tejido de activo crecimiento primario ubicado entre tejidos más o menos diferenciados. Ejemplos de este tipo de meristemo se encuentran en los entrenudos y las cubiertas de las hojas de monocotiledoneas, (Esau, 1965).

Las características citológicas de los meristemas son variables pero - en términos generales se pueden mencionar las siguientes:

- 1) Poseen un bajo contenido de retículo endoplásmico.
- 2) La estructura interna de las mitocondrias es muy sencilla.
- 3) El grado de vacuolación es pequeño o nulo.
- 4) Ausencia de paredes secundarias y lignina.
- 5) Durante la etapa de división activa de las células carecen de inclusiones ergásticas.
- 6) Los plastidios se encuentran en estadio de proplastidios.
- 7) Son células con una gran actividad metabólica, mostrando una fuerte reacción a peroxidasas.
- 8) Son células isodiamétricas ricas en citoplasma, (Esau, 1965).

Todas estas características consideradas de indiferenciación resultan de gran utilidad en micropropagación ya que en términos generales se puede decir que a mayor grado de diferenciación y especialización citológica, mayor dificultad para que los tejidos se adapten y respondan a condiciones de cultivo "in vitro".

En micropropagación se emplean los diversos tipos de tejidos meristemá

ticos que existen; pero los más común y ampliamente utilizados son los meristemos apicales; sobre todo cuando se pretenden obtener plantas "libres - de algún tipo de virosis".

El meristemo apical caulinar está contenido dentro de la yema apical y su disección puede variar en grado de dificultad dependiendo del tamaño del meristemo, la fase en que éste se encuentre, el momento fisiológico en que se localice la yema, en la ausencia o presencia de tricomas y en la disposición de las hojas que conforman a la yema.

En general para disectar el meristemo es necesario observar las siguientes precauciones:

- a) Conocer la anatomía del meristemo en cuestión, en cada una de sus fases (área máxima y área mínima).
- b) Hacer el menor número posible de cortes.
- c) Obtener el meristemo en seco, para evitar la difusión de virus.
- d) Emplear el menor tiempo posible en la disección del meristemo para evitar su desecación.
- e) Orientar al meristemo en el momento de la siembra "in vitro" para favorecer el desarrollo; pues en este tejido es importante la polaridad.

En las figuras 2, 3 y 4 se esquematizan los pasos sucesivos para la obtención de meristemos a partir de yemas apicales y axilares.

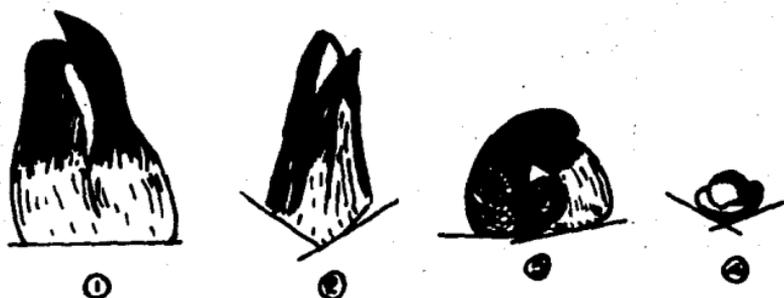


Figura 2. OBTENCION DE MERISTEMOS DE CLAVEL PROVENIENTES DE YEMAS AXILARES.

- 1, 2, 3.- Cortes en el proceso de aislamiento del meristemo.
4.- Aspecto del meristemo de clavel.

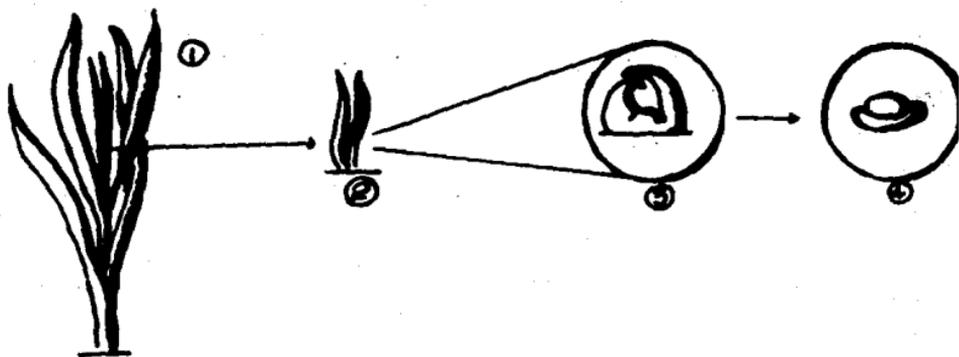


Figura 3. OBTENCION DE MERISTEMOS DE CLAVEL PROVENIENTES DE YEMAS APICALES.

- 1, 2, 3.- Pasos en el proceso de aislamiento del meristemo del clavel.
- 4.- Meristemo de clavel proveniente de una yema apical.



Figura 4. OBTENCIÓN DE MERISTEMOS DE CRISANTEMO A PARTIR DE YEMAS APICALES.

- 1, 2.- Pasos en el proceso de aislamiento de meristemas de crisantemo.
- 3.- Aspecto del meristemo de crisantemo con un par - de primordios.

Obtención de explantes de pecíolo.

Existe una gran similitud entre los tejidos primarios del tallo y del pecíolo, siendo muy marcada en la estructura de la epidermis.

El parénquima fundamental del pecíolo es similar al tejido cortical - del tallo en cuanto al arreglo de las células y el número de cloroplastos. Los tejidos de soporte en el tallo son el colénquima y el esclerénquima, - los cuales son similares en cuanto a disposición y estructura con los del - tallo. El tejido vascular de los pecíolos de diferentes plantas muestran una variación considerable en la distribución, (Esau, 1965).

La presencia de células parenquimáticas, epidérmicas y corticales hacen del pecíolo un explante de fácil adaptación y óptima respuesta a las - condiciones de micropropagación.

En algunas plantas ornamentales como la *Violeta africana* es posible su propagación "in vitro" empleando como explantes porciones de pecíolos. La - obtención de los explantes de pecíolo no implica mayor dificultad ya que - las porciones que se emplean oscilan entre 2 y 4 mm de espesor, (Cooke, - 1977).

Las precauciones que se deben observar en la obtención de este tipo de explantes son:

- a) Emplear herramientas bien afiladas para evitar se magullen los tejidos a la hora de realizar el corte.
- b) Respetar la orientación del tejido en el momento de la siembra "in vitro" para facilitar el transporte de sustancias.
- c) No lesionar a los explantes para evitar reacciones de oxidación.
- d) Flamear frecuentemente las herramientas de disección para reducir

al máximo el riesgo de contaminación.

En la figura 5 se esquematiza la forma de obtener explantes de pecíolo de hoja de *Violeta africana*.

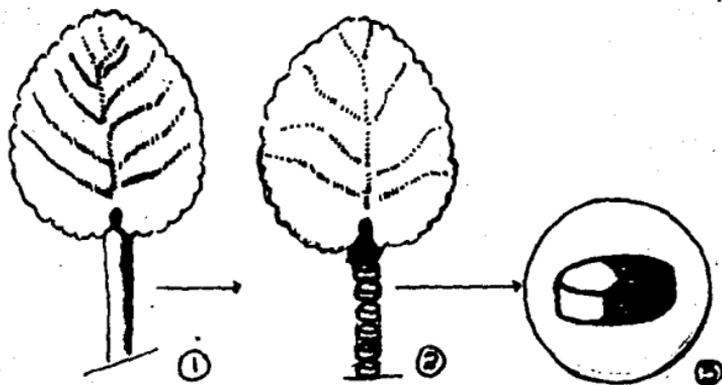


Figura 5. OBTENCION DE EXPLANTES PROVENIENTES DE PECIOLLO DE HOJA DE VIOLETA AFRICANA.

- 1, 2.- Proceso de obtención de explantes de peciolo de hoja.
- 3.- Explante de peciolo. Espesor aproximado de - 3-4 mm.

Es importante respetar la polaridad de este explante.

Obtención de explantes de tallos.

Los tallos en su estadio primario de desarrollo muestran una división en nudos y entrenudos, división que resulta de la forma en que se originan las hojas en el brote apical y del crecimiento del eje que porta las hojas.

En el brote apical los primordios foliares surgen en continua sucesión lo que da la apariencia de una superposición de discos, en los cuales se pueden localizar una o más hojas. Posteriormente en la base de cada disco se da un desarrollo que separa a los discos entre sí, (Esau, 1965).

Los tejidos que constituyen al tallo son el tejido fundamental, el tejido vascular y el tejido dérmico; siendo los tejidos fundamentales y dérmicos los que poseen células con una gran capacidad regenerativa.

Son varias las especies que se pueden propagar "in vitro" por explantes de tallo siendo uno de los casos más comunes el del tabaco.

En algunas ocasiones es necesario que la porción sembrada corresponda a la zona del nudo con el fin de que la yema o yemas axilares que éste posea se desarrollen en brotes; mientras que de la porción del entrenudo se genere un callo y/o raíces adventicias, como es el caso del cultivo de yema de rosa con porción de tallo.

En la obtención de explantes a partir de tallos se recomienda observar las siguientes precauciones:

- a) Emplear herramientas adecuadas y bien afiladas que permitan hacer los cortes sin dañar las proporciones de tallos.
- b) Cortar los fragmentos de tallo de un tamaño que garanticen su desarrollo "in vitro" (3 mm de espesor mínimo) pues cuando las porciones son pequeñas llegan a morir en la fase de adaptación.

- c) Al igual que en otros casos en los que se emplean tejidos maduros y completamente diferenciados se recomienda someter a las plantas donadoras a un pretratamiento con químicos para reducir al mínimo la posibilidad de contaminación o infestación por agentes sistémicos.

- d) Realizar los cortes en seco y flameando las herramientas frecuentemente.

En la figura 6 se esquematiza la forma de obtener explantes a partir - de tallo de tabaco.

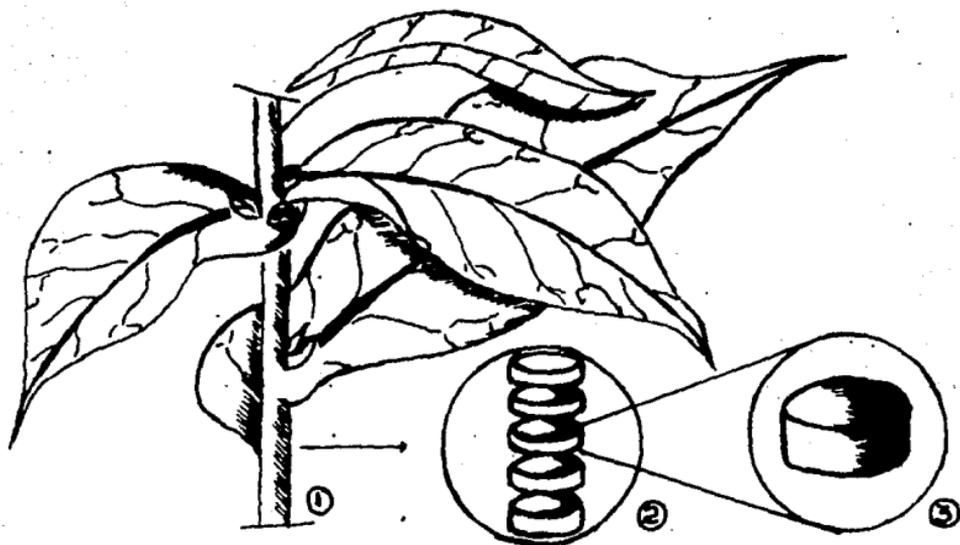


Figura 6. OBTENCION DE EXPLANTES DE TALLO DE TABACO.

Obtención de explantes de hoja.

La hoja definida como el apéndice lateral principal nacido del tallo, usualmente contiene los mismos sistemas de tejidos que el tallo, es decir, el tejido dérmico, el vascular y el fundamental.

El tallo y la hoja difieren en aspectos relacionados con los patrones de crecimiento y el arreglo de los tejidos. La hoja muestra un crecimiento apical determinado en comparación con el crecimiento indeterminado apical del tallo. La diferencia estructural está relacionada a su vez con la especialización de cada uno de estos dos órganos; siendo en la hoja la abundancia de la superficie externa, el parénquima esponjoso, la abundancia de cloroplastos y la disposición del tejido vascular un indicativo de la adaptación de este órgano a la fotosíntesis, (Esau, 1965).

Algunos investigadores enfatizan la similitud entre el tallo y la hoja, señalando la capacidad de esta última de producir raíces adventicias y tejido secundario a partir del cambium vascular cuando son puestas en condiciones apropiadas de cultivo.

Al igual que el empleo de pecíolos para micropropagación las hojas deben ser maduras pero sin ser hojas muy viejas. Otra precaución muy importante es que la hoja no debe presentar lesiones. En caso de emplearse hojas con abundancia de tricomas o bien hojas que proceden directamente de plantas cultivadas en el campo, se deben extremar las condiciones de lavado y desinfección.

Al momento de disectar los explantes de hoja, es recomendable no lesionarlos por la parte del haz o del envés por exceso de presión con las herramientas y cada explante deberá poseer un fragmento de nervadura central y de nervadura secundaria, (Start y Cumming, 1976).

En la figura 7 se esquematiza la forma de obtener explantes de hoja de Violeta africana.

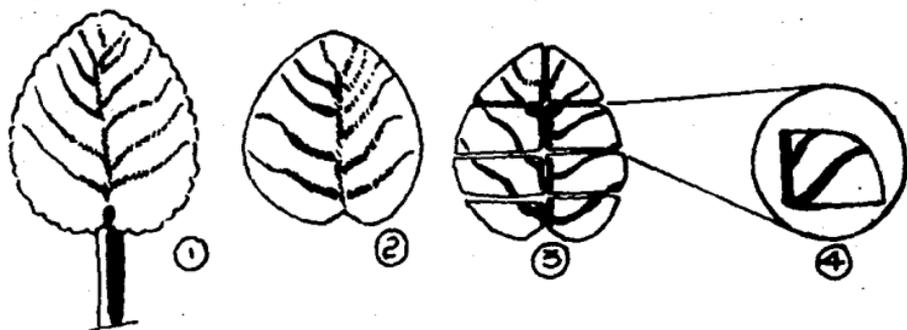


Figura 7. OBTENCION DE EXPLANTES DE HOJA DE VIOLETA AFRICANA

- 1.- Aspecto general de la hoja de Violeta Africana.
- 2.- Corte del borde dentado de la hoja y del pecíolo.
- 3.- Corte longitudinal a lo largo de la nervadura central y cortes transversales.
- 4.- Aspecto del explante de hoja con una porción de nervadura principal y nervadura secundaria.

Obtención de embriones.

El resultado de la fusión de un anterozoide con la ovocélula es la formación de un cigoto, en el cual se restituye la condición diploide.

Este cigoto constituido en la fase inicial por una sola célula; sufre transformaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas como consecuencia de la multiplicación mitótica de esta célula cigótica inicial; dando como resultado los diversos estados embrionarios que dan las configuraciones conocidas como: globular, torpedo y arriñonado. En cada una de las configuraciones anteriores, las cuales determinan un estadio del desarrollo embrionario, se destacan necesidades nutricionales diferentes, necesidades que son más complejas en cuanto que el embrión es más inmaduro.

Una vez que el embrión se desarrolla y se forman los rudimentos meristemáticos tanto caulinar como radicular y el endospermo es absorbido por los cotiledones o cotiledón las necesidades nutricionales quedan reducidas a un mínimo. Esta condición nutricional queda claramente manifiesta en la elaboración de medios para cultivo "in vitro" de embriones; siendo más complejos los cultivos en cuanto más inmaduros sean los embriones.

Cuando se micropropagan plantas partiendo de embriones es muy importante definir la fase de desarrollo en que serán tomados, pues esto aparte de determinar necesidades nutricionales, también implicará pasos diferentes para la disectación de estos tejidos.

En la obtención de embriones que provienen de semillas maduras se recomienda seguir los siguientes pasos:

- 1) Lavar con jabón las semillas y enjuagar con agua corriente en abundancia.
- 2) En caso de que la semilla presente testas duras como en el chabacano y durazno, escarificar mecánicamente para obtener la almendra.

- 3) Emplear el método N^o2 de lavado y desinfectado de porciones donadas de tejido mencionado en el inciso V.5.
- 4) Remojar las semillas desinfectadas en agua destilada estéril con el fin de ablandar la testa interna.
- 5) En condiciones de total asépsia, retirar la "cascarilla" y separar los cotiledones para dejar expuesto el embrión.
- 6) Disectar el embrión tratando de evitar lleve tejido cotiledonario adjunto.
- 7) En el cultivo de embriones empleando la ruta organogénica es importante sembrar respetando la polaridad natural de este tejido.

En la figura 8 se ilustran los pasos para la obtención de embriones de chabacano y durazno.



Figura 8. OBTENCION DE EMBRIONES DE CHABACANO Y/O DURAZNO.

- 1.- Aspecto general de la semilla de durazno.
- 2.- Almendra de la semilla de durazno una vez realizada la escarificación mecánica.
- 3.- Embrión de durazno una vez que ha sido re tirado de entre los cotiledones.

Obtención de anteras.

Las anteras junto con el filamento son estructuras filogenéticamente muy avanzadas. La antera se localiza en el extremo del filamento y es una estructura biloculada y tetraloculada, aunque puede variar en el número de lóculos.

Los tejidos fundamental y conectivo de la antera son parenquimáticos pero muestran una gran especialización en las zonas contiguas a las células esporogénicas formando las capas parietales del microesporogio.

La pared de la antera puede variar en el número de capas y se forman a través de una serie de divisiones paralelas a la periferia del lóculo de la antera. Las capas parietales están ontogénicamente relacionadas al tejido esporogénico. Por debajo de la dermis de la antera se localiza el endote---cio. La capa parietal más interna corresponde al tapetum cuyas células se caracterizan por protoplastos que se tiñen densamente y que poseen núcleos muy grandes, (Esau, 1965).

El estadio en que debe ser disectada y sembrada la antera, varía de una especie a otra, pero siempre tiene que ser antes de que las paredes se deshidraten y se lleve a cabo la dehiscencia del polen.

En la mayoría de los casos la antera es disectada antes que el botón floral se abra, lo cual implica hasta cierto punto la ausencia de gérmenes en los tejidos epidérmicos de esta estructura.

Las precauciones que deben tomarse en cuenta en la obtención de anteras son:

- a) Determinación del tamaño del botón floral en el cual el estadio de desarrollo de la antera sea el óptimo para los objetivos de la micropropagación.

- b) Lavado y desinfectado del botón floral con el método N°3 enunciado en el inciso V.5.
- c) Disección de la antera en condiciones de total asepsia.

En la figura 9 se ilustra la forma de obtener anteras.

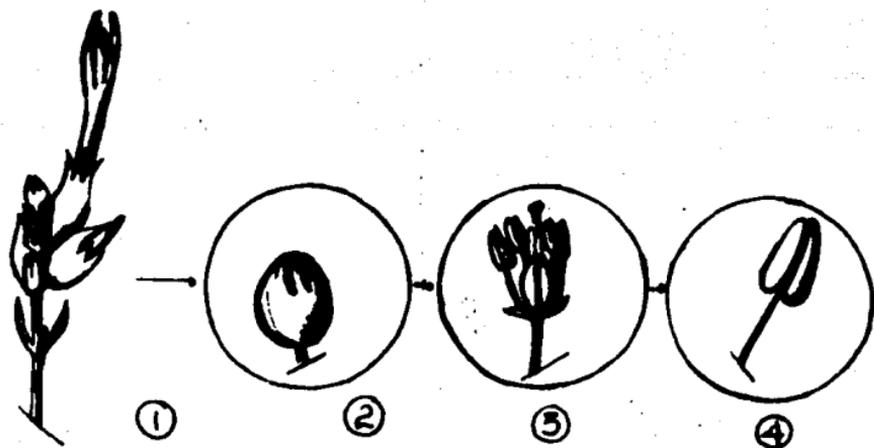


Figura 9. OBTENCION DE ANTERAS DE LA FLOR DE TABACO.

- 1.- Aspecto general de la inflorescencia del tabaco.
- 2.- Botón floral antes de la apertura del cáliz y la corola.
- 3.- Aspecto de los verticilos más internos del botón mostrando anteras y ovario.
- 4.- Antera de tabaco.

Obtención del polen.

El grano del polen pasa por diversas fases de desarrollo antes de alcanzar la madurez anatómica y fisiológica siendo los siguientes los principales estadios: Célula madre del polen, díada, tetrada, microespora joven y microespora madura o grano de polen.

Cada una de las fases anteriores se caracteriza por rasgos anatómicos y fisiológicos que pueden variar de una especie a otra.

Los rasgos anatómicos más comunes son:

Célula madre del polen. El tejido arquesporial se divide en dos veces consecutivas dando como resultado la aparición de 4 células de las cuales 3 degeneran y 1 queda funcional correspondiendo a la célula madre. En esta fase las células madres se localizan en un sincitio en el que los núcleos participan de un citoplasma común.

Díada. En esta fase las células madres sufren una división reduccional que da como resultado la aparición de dos células haploides.

Tetrada. En esta fase las dos células generadas sufren una división equatorial, produciéndose cuatro células que empiezan a rodearse de callosa y a conformar la intina.

Microespora joven. En este punto de desarrollo del polen se empiezan a formar las ornamentaciones del grano del polen ocasionadas por la exina, el núcleo se ha polarizado y dividido en dos núcleos químicamente diferentes: el núcleo germinativo y el núcleo del tubo polínico.

Grano de polen. Esta fase se caracteriza por la presencia de la capa de esporopolenina que recubre al polen. En este momento los dos núcleos se han separado por una tabicación y el endotecio de la antera está listo para llevar a cabo la dehiscencia, (Echlin, 1968).

Para el cultivo "in vitro" de granos de polen es muy importante determinar el tamaño del botón floral en el que se presentan los estadios de día da y tétrada ya que es en estos estadios en los que se logran resultados.

En el cultivo de tejidos vegetales el grano de polen es sembrado principalmente con el objeto de obtener plantas haploides con el propósito de - inducir manipulaciones o mejoras genéticas.

En el cultivo "in vitro" de polen es necesario observar los siguientes puntos para su obtención:

- 1) Determinación del tamaño del botón floral al que correspondan los estadios de día da y tétrada principalmente.
- 2) Esterilización del botón floral.
- 3) Disección de las anteras en condiciones de total asepsia.
- 4) Corte transversal de los dos lóbulos de la antera para dejar ex--- puestos los lóculos. Esto también debe hacerse en condiciones de - total asepsia.
- 5) Con frecuencia es necesario adicionar al medio ácido ascórbico pa- ra evitar la oxidación en la antera.

En la figura 10 se esquematizan los pasos para la obtención de granos de polen.

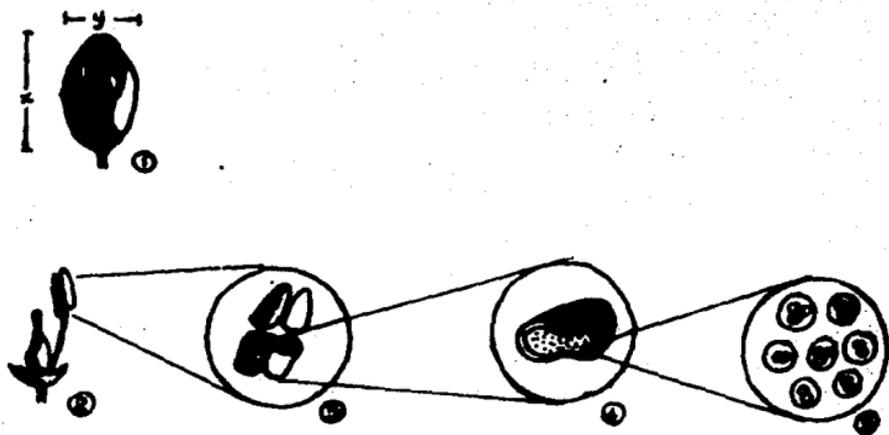


Figura 10. OBTENCION DE POLEN DEL TABACO.

- 1.- Determinación del tamaño del botón floral al que corresponden los estadios de díada y tétrada.
- 2, 3.- Aislamiento y corte de la antera para dejar expuestas las díadas y tétradas.
- 4, 5.- Aspecto de las díadas y las tétradas vistas al microscopio.

Obtención de explantes de raíz.

La raíz es un órgano especializado en la absorción y anclaje. Las condiciones relativamente estables del suelo ocasionan una estructura aparentemente simple de la raíz y una retención de los aspectos estructurales primitivos que desaparecen en el tallo.

La raíz se origina de una radícula o de un meristemo radicular presente en el embrión; en las gimnospermas y en las dicotiledóneas esta raíz produce por elongación y ramificación el sistema radical de la planta; mientras que en las monocotiledóneas la primera raíz que deriva del meristemo radicular del embrión muere y las raíces de la planta madura se forman del tallo como una estructura compuesta de muchas raíces, (Esau, 1965).

En cultivo "in vitro" es posible sembrar ápices de raíces provenientes de plantas recién germinadas.

En términos generales la raíz primaria está compuesta de una capa superficial que es la epidermis. Inmediatamente abajo de esta capa se encuentra el tejido fundamental constituyendo al córtex; el cual rodea al sistema vascular. En algunas ocasiones se puede localizar en el centro de la raíz un tejido parenquimático bien definido llamado médula. Estas características histológicas hacen a la raíz una porción donadora de explantes muy importante.

En cultivo de tejidos vegetales la raíz de zanahoria ha sido ampliamente utilizada desde los primeros intentos de mantener vivos tejidos "in vitro". En la actualidad el cultivo de raíz de zanahoria se lleva a cabo principalmente con el objeto de realizar estudios en callogénesis, embriogénesis y organogénesis.

Para la obtención de explantes de raíz se recomienda cuidar los siguientes aspectos:

- 1) Un lavado exhaustivo y riguroso del material biológico empleando - el método N°2 enlistado en el inciso V.5.
- 2) Descartar todas aquellas raíces que presenten lesiones o síntomas de enfermedad.
- 3) Emplear aquellos tejidos que posean la mayor capacidad generativa o el menor grado de diferenciación, es decir; que estén constituidos por células parenquimáticas.

En la figura 11 se ilustra la manera de obtener explantes a partir de raíz de zanahoria.

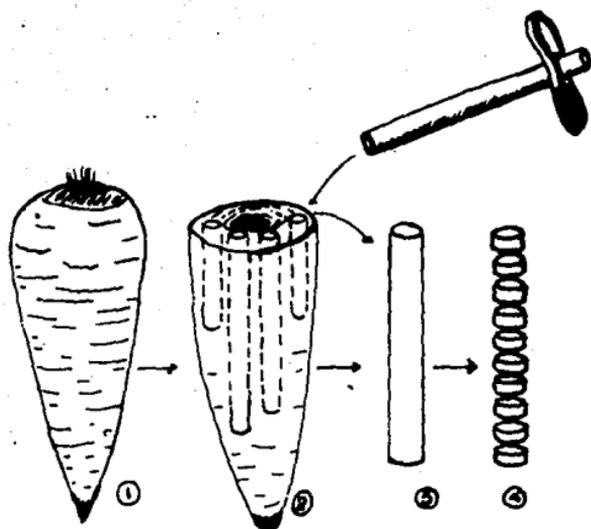


Figura 11. OBTENCION DE EXPLANTES DE RAIZ.

- 1.- Aspecto general de la raíz de zanahoria.
- 2.- Corte de la parte superior de la raíz y perforaciones practicadas con un sacabocados de 1/2" de diámetro.
- 3, 4.- Corte en trozos de 3 mm de espesor del cilindro de tejido obtenido con el sacabocados de 1/2" y 3/4" de diámetro.

CAPITULO VI

SIEMBRA ASEPTICA

VI.1. PREPARACION DEL AREA DE SIEMBRA.

VI.2. PRECAUCIONES EN EL MOMENTO DE LA SIEMBRA.

VI.1. PREPARACION DEL AREA DE SIEMBRA

La preparación del área de siembra es una tarea sencilla pero que requiere se realice con diligencia y exactitud para prevenir al máximo el riesgo de contaminación.

Como se ha visto hasta el momento el área de siembra o mejor dicho el área aséptica se emplea para realizar el último enjuague del material biológico con agua destilada esterilizada, para disectación de los explantes, para la apertura y siembra de los frascos.

Ya sea que se cuente con campana de flujo laminar o con alguno de los sustitutos, se recomienda que se observen las siguientes precauciones:

- a) El área debe estar aislada de corrientes de aire y del tránsito de personas .
- b) Esta área debe ser destinada solo para realizar las operaciones de micropropagación que requieran total aséptica.
- c) Las paredes y los pisos deben ser de materiales que puedan ser lavados con facilidad.
- d) Debe poseer una buena iluminación y las instalaciones mínimas indispensables (ver capítulo II.2 y II.3).
- e) Esta área debe ser accesible solo al personal autorizado y capacitado.

Para la preparación del área de siembra se requieren los siguientes equipos y materiales:

- 1.- Campana de flujo laminar o sustitutos.
- 2.- Mecheros de gas y/o de alcohol.

- 3.- Charola de peltre.
- 4.- Herramientas de disección.
- 5.- Gasa y algodón estériles.
- 6.- Cloruro de benzalconio y/o hipoclorito de sodio o calcio.
- 7.- Cubeta y basurero.
- 8.- Sillas o bancos.
- 9.- Frascos con medios de cultivo ya esterilizados.
- 10.- Porciones donadoras de explantes.

Cada vez que se vayan a realizar manipulaciones dentro de esta área se deberán llevar a cabo las siguientes operaciones:

- 1) Se lavarán con agua y jabón paredes y piso.
- 2) Se limpiará con un trapo húmedo con cloruro de benzalconio o con hipoclorito de sodio las paredes, el piso y el techo así como el mobiliario.
- 3) Se lavarán con detergente y se desinfectarán con especial esmero la superficie de trabajo y la campana estéril; esto último se podrá realizar con cloruro de benzalconio o con hipoclorito de sodio o bien flameando el área.
- 4) Se acomodarán sobre la mesa de trabajo y dentro del área estéril todos los utensilios indispensables para realizar las manipulaciones y debiendo estar estos previamente esterilizados.

Para el acomodo de los utensilios dentro del área estéril se sugiere la distribución descrita en la figura 12.

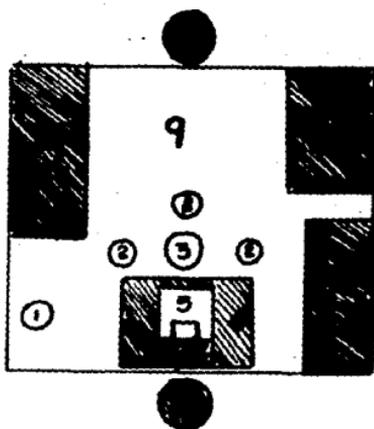


Figura 12. DISTRIBUCION DE LOS UTENSILIOS DE MICROPROPAGACION DENTRO DEL AREA ESTERIL.

- 1.- Recipiente con alcohol para poner el instrumental de disección.
- 2.- Mecheros de alcohol o gas.
- 3.- Recipiente con las porciones donadoras de explantes.
- 4.- Charola de disección.
- 5.- Microscopio estereoscópico.
- 6.- Area para acomodo de frascos con medio de cultivo.
- 7.- Areas de acomodo para frascos con medio.
- 8.- Area para cerrado de frascos.
- A.- Banco para persona que esté realizando las siembras.
- B.- Banco para persona que esté ayudando a cerrar, sellar y etiquetar los frascos.

VI.2. PRECAUCIONES EN EL MOMENTO DE EFECTUAR LA SIEMBRA ASEPTICA

Los errores que se cometen más frecuentemente en el momento de realizar la siembra aséptica se pueden evitar observando las siguientes precauciones:

- a) Desinfectar áreas, equipos y materiales.
- b) En el área de siembra sólo deben estar aquellas personas que estén realizando la manipulación.
- c) Mantener cerradas puertas y ventanas para evitar corrientes de aire.
- d) Mientras se permanezca en el área estéril llevar puesto gorro, botas, cubrebocas y bata quirúrgica.
- e) Flamear la charola de disección cada vez que se concluya la disección y siembra del explante correspondiente a cada frasco.
- f) Flamear el instrumental de disección cada vez que sea obtenido un explante.
- g) Flamear la boca del frasco antes de retirar la tapa de papel aluminio y antes de volver a taparlo una vez realizada la siembra del explante.
- h) Marcar o etiquetar adecuadamente cada frasco para llevar a cabo un control efectivo del material.

El registro deberá contener los siguientes datos:

- 1.- Fecha de siembra.
- 2.- Tipo de explante.
- 3.- Fecha y número de transferencia.

- 4.- Tipo de medio empleado.
- 5.- Concentración de S.R.C.V.
- 6.- Registro de respuestas biológicas.
- 7.- Condiciones de incubación.
- 8.- Persona que realiza la manipulación.

- i) Una vez concluida la manipulación es recomendable limpiar el área estéril y retirar todos los desperdicios que se generen.
- j) Asegurarse de que puertas y ventanas permanezcan cerradas para evitar la entrada de gérmenes y polvo.

CAPITULO VII

TRANSFERENCIAS "IN VITRO"

VII.1. TIPOS DE TRANSFERENCIAS "IN VITRO".

VII.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA TRANSFERENCIAS.

VII.3. MANIPULACION DE LOS TEJIDOS EN LAS TRANSFERENCIAS.

VII.1. TIPOS DE TRANSFERENCIA "IN VITRO"

Como se emnciona en el inciso III.1, existen cuatro etapas en el proceso de micropropagación:

- 1, Etapa de adaptación "in vitro".
- 2, Etapa de multiplicación "in vitro".
- 3, Etapa de enraizamiento "in vitro".
- 4, Etapa de adaptación a suelo.

En las tres primeras etapas es necesario efectuar una serie de transferencias del explante a medios sucesivos que van induciendo determinadas respuestas biológicas hasta lograr plantas perfectamente constituidas que pueden sobrevivir a las condiciones de cultivo en el suelo.

Estas transferencias sucesivas del explante pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

- Transferencia para mantenimiento o de renovación de medio.
- Transferencia para multiplicación.
- Transferencia para enraizamiento.

En las transferencias para mantenimiento o de renovación de medio el - explante es transferido a un medio de igual composición y consistencia al - medio del que proviene. Este tipo de transplante se realiza con el fin de - evitar un decremento en el desarrollo debido al agotamiento de nutrimentos. En términos generales las transferencias para mantenimeinto se realizan cada tres o cuatro semanas.

Las transferencias para multiplicación se realizan después de la fase de adaptación aséptica, y como su nombre lo indica, se llevan a cabo con el

propósito de que el explante ya adaptado a las condiciones de cultivo "in vitro" se multiplique. Por lo regular la transferencia a medios de multiplicación se realiza de dos a tres semanas después de haber iniciado la fase de adaptación aséptica.

En la fase de multiplicación es frecuente realizar transferencias del explante a medio fresco con el fin de obtener un número creciente de brotes o células, lo cual se logra dividiendo el tejido resultante en porciones más pequeñas y poniendo estas en medios de multiplicación similares al anterior. Esta operación puede repetirse indefinidamente, dependiendo del volumen de producción de plantas requeridas.

Este tipo de transferencia se realiza cada 4 a 6 semanas; aunque este período puede variar hasta 8 semanas; dependiendo de la especie, de lo adecuado que sea el medio y la concentración de S.R.C.V. para este fin.

En las transferencias para enraizamiento se busca inducir a los brotes o plantas generadas en la fase de multiplicación a la proliferación de raíces. Por regla general este transplante se realiza una sola vez y su duración puede variar entre dos y seis semanas, intervalo que dependerá de la especie y la eficiencia del medio junto con las condiciones ambientales de desarrollo (luz y temperatura) para producir raíz o raíces.

Es recomendable realizar la transferencia de plantas previamente separadas a medios de enraizamiento para evitar una distribución irregular de raíces o la lesión de las mismas en el momento de individualizarlas.

VII.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA TRANSFERENCIAS

Medios de cultivo para transferencias de mantenimiento o renovación de medio.

Como ya se apuntaba con anterioridad este tipo de transferencias se realiza sobre medios que no varían en su composición con respecto a los me-

dios en que se encontraba el explante antes del trasplante pues la finalidad de esta transferencia es la de mantener a los tejidos en medios frescos.

En las transferencias de mantenimiento para la fase de adaptación aséptica los medios empleados poseen bajas concentraciones de sales y sobre todo de S.R.C.V. para prevenir que se genere una descompensación por la diferencia de concentración de estas substancias entre el tejido y el medio. Este tipo de medio es particularmente recomendado en el cultivo de explantes muy pequeños como es el caso de los meristemos.

Medios para transferencia de multiplicación: Estos medios presentan una composición muy rica tanto de sales minerales como de S.R.C.V. Dentro de estas últimas las citocininas son las que se encuentran en mayor abundancia (0.1-10 mg/l) y en algunos casos se puede encontrar la participación de algún factor sinérgico como el sulfato de adenina, el cual potencia el efecto citocinínico, (Start y Comming, 1976). Las auxinas también son frecuentemente adicionadas en estos medios aunque en la mayoría de los casos la relación auxina/citocinina es menor a 1.

Los medios para transferencia de multiplicación pueden ser líquidos o sólidos, pero cuando se reporta el empleo de medios líquidos por lo regular son sometidos a agitación.

Medios de transferencia para enraizamiento: En la fase de enraizamiento "in vitro" los medios empleados pueden variar mucho no solo con respecto al contenido de S.R.C.V. sino también en cuanto al tipo y grado de hidratación de las sales, a la presencia de vitaminas, a la concentración de sacarosa y en algunos casos a la presencia de otros factores como el carbón activado y cantidad de agar-agar por litro de medio. Por lo regular en la fase de enraizamiento se emplean medios sólidos con el fin de proporcionar un estímulo físico a la raíz.

VII.3. MANIPULACION DE LOS TEJIDOS EN LAS TRANSFERENCIAS

En las transferencias "in vitro" la manipulación de los tejidos no varía mucho con respecto a la llevada a cabo en la siembra aséptica; salvo - que en las transferencias no hay que esterilizar los explantes y aunque en la fase de multiplicación hay que realizar algunos cortes, éstos por lo general no implican el mismo grado de dificultad que en la disección del explante original.

En la manipulación de los tejidos en las transferencias se recomienda se observen las siguientes precauciones:

- a) Lavar y esterilizar el área de siembra o campana aséptica.
- b) Flamear la charola y el instrumental de disección.
- c) Flamear la boca de los frascos antes y después de destaparse, tanto de los frascos de donde proviene el explante como de los que van a recibir la transferencia.
- d) El instrumental que se está empleando en la introducción de los explantes debe ser flameado al menos una vez antes de que estos sean depositados en el medio fresco.
- e) Emplear gorro, botas, cubrebocas y bata quirúrgica en el momento de realizar las transferencias.
- f) En el caso de tener que hacer cortes en los tejidos, éstos deberán hacerse con presteza y exactitud para evitar su deshidratación y lesión.
- g) Una vez concluida la transferencia asear y ordenar el área de siembra aséptica, asegurándose de dejar cerradas puertas y ventanas.

CAPITULO VIII

TRANSFERENCIA A TIERRA DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS

- VIII.1. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA ADAPTACION A SUELO DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS.
- VIII.2. INSTALACIONES, EQUIPO Y MATERIALES QUE SE REQUIEREN PARA LA ADAPTACION AL SUELO DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS.
- VIII.3. PASOS PARA LA TRANSFERENCIA Y ADAPTACION DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS A SUELO.
- VIII.4. FORMA DE REALIZAR CADA UNO DE LOS PASOS.
- VIII.5. MANEJO DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS YA ADAPTADAS A SUELO.

La transferencia a tierra de las plantas micropropagadas es uno de los cuellos de botella que se presentan en la técnica de micropropagación ya que es en éste punto donde se llegan a registrar los índices más altos de mortalidad en la mayoría de los casos. Esto se debe principalmente a una o varias de las siguientes causas:

- 1.- Raíces generadas "in vitro" deficientes.
- 2.- Sustratos no adecuados para la fase de adaptación a suelo.
- 3.- Una elevada tasa de evapotranspiración con respecto a la velocidad de captación de agua por parte de la planta.
- 4.- Falta de elementos nutritivos en formas fácilmente asimilables.
- 5.- Presencia de hongos, bacterias y/o insectos en el sustrato que propicien una rápida pudrición del sistema radicular.
- 6.- Exceso de humedad en el sustrato lo que induce al ahogamiento de la planta o a la proliferación de patógenos.
- 7.- Exceso de iluminación o temperatura en el área donde están adaptando las plantas.

De la lista anterior se deduce que los factores que afectan en el pre-dimiento y adaptación de las plantas micropropagadas a condiciones de suelo son:

- a) Sustrato: Estructura.
Composición.
Disponibilidad de nutrientes.
Desinfestación.
- b) Humedad relativa.

- c) Temperatura.
- d) Intensidad luminosa.
- e) Fotoperiodo.

VIII.1. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA ADAPTACION A SUELO DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS.

Sustrato:

El sustrato es sin lugar a dudas un factor determinante en el proceso de adaptación a suelo, ya que de sus propiedades dependerá en gran medida - el éxito o fracaso de esta fase.

Un suelo apto para recibir a las plantas micropropagadas debe poseer una estructura tal que permita un buen drenaje, una buena capacidad de agua capilar y buena aireación.

En cuanto a la composición el sustrato puede variar desde los suelos - constituidos totalmente por componentes inertes como la vermiculita, la a--agrolita, el arena de río o la de tezontle, hasta aquellos que poseen un alto contenido de materiales orgánicos como el humus, estiércoles y compos---tas. La selección de cada uno de estos dependerá principalmente de la disponibilidad de estos materiales.

Los nutrimentos en los suelos constituidos por componentes inertes de--ben ser suministrados en forma de riegos fertilizados. Cuando los suelos están constituidos con altos contenidos de materia orgánica, los riegos ferti--lizados deben ser menos concentrados y deben aplicarse durante menos tiempo que en el caso de suelos igertes.

Los suelos que poseen materia orgánica y tierras naturales deben ser - sometidas a tratamientos de desinfestación para prevenir que las plantas mi

cropropagadas sean atacadas por patógenos. Estos tratamientos pueden ser a base de calor, de vapor o por medio de agentes químicos.

En resumen un suelo apto para recibir plantas micropropagadas debe tener las siguientes características:

- 1.- Buena capacidad de retención de humedad.
- 2.- Buen drenaje.
- 3.- Equilibrio entre la retención de agua y aire.
- 4.- Textura suave que facilite la adaptación y desarrollo del sistema radicular.
- 5.- Debe poseer una buena composición química.
- 6.- Debe encontrarse libre de patógenos.

Humedad relativa.

Otro factor determinante en la adaptación a suelo de las plantas micropropagadas es la humedad relativa, pues de esta dependerá la pronta o lenta pérdida de agua por parte del vegetal. Junto con la capacidad del sustrato para retener agua capilar y de la raíz para tomar esta agua, la humedad relativa juega un papel definitivo en lo que se ha denominado "déficit hídrico" que es típico de esta fase, el cual se caracteriza por un rápido marchitamiento de la planta después del trasplante al suelo.

En la fase de adaptación a suelo es necesario llevar a la planta de un estado de alta humedad relativa (85-90%) a estados graduales y paulatinos - de menor humedad hasta alcanzar puntos normales (40-50%).

Temperatura, Intensidad luminosa y Fotoperiodo.

Junto con los factores hasta aquí mencionados la intensidad luminosa y la temperatura también determinan en gran medida la adaptación de las plantas obtenidas "in vitro" a condiciones de suelo.

En clima templado es relativamente fácil mantener temperaturas entre - los 22 y 27 °C reduciendo la intensidad de luz con mallas media sombra en - el día y por medio de la reabsorción de los rayos infrarrojos con coberturas plásticas y por estas mismas mallas durante la noche.

En las regiones de clima extremo el mantenimiento de un rango favorable de temperatura solo se puede lograr a través de sistemas de climatización y calefacción.

En cuanto a la intensidad de luz en la etapa de adaptación a suelo, ésta debe ser durante la fase inicial similar a la de los explantes en la cámara de crecimiento. Esto implica que la intensidad lumínica debe ser del - 60-70% menor a la de un día soleado y aumentarse gradualmente hasta alcanzar las condiciones normales de iluminación de la planta.

El fotoperíodo es otro factor que, junto con la intensidad luminosa, - tiene un efecto directo sobre la adaptación de las plantas en la etapa de adaptación al suelo. Es bien conocido el hecho de complementar deficiencias en horas luz manteniendo a las plantas bajo condiciones de iluminación artificial o bien el de estimular el crecimiento vegetativo o floral modificando el tiempo de iluminación.

VIII.2. INSTALACIONES, EQUIPO Y MATERIALES QUE SE REQUIEREN PARA LA ADAPTACION AL SUELO DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS.

Para la fase de adaptación a suelo son necesarias las siguientes instalaciones, equipos y materiales:

- 1.- Invernadero o local con buena iluminación y ventilación.
- 2.- Instalación de corriente eléctrica monofásica de 117 volts.

- 3.- Instalación de agua potable y drenaje.
- 4.- Instalación climatizadora en zonas con climas extremos.
- 5.- Cámara de nebulización.
- 6.- Bolsas de plástico agrícola negro calibre 800 (varios tamaños).
- 7.- Bolsas de plástico agrícola transparente (varios tamaños).
- 8.- Macetas de plástico de varios tamaños.
- 9.- Vasos desechables de varios tamaños.
- 10.- Vasos desechables transparentes de varios tamaños.
- 11.- Herramientas de jardinería.
- 12.- Pasteurizador de tierras.
- 13.- Mochila de fumigación.
- 14.- Sistema de riego.
- 15.- Agrolita.
- 16.- Vermiculita grado hortícola.
- 17.- Humus.
- 18.- Estiércol procesado de vaca o borrego.
- 19.- Tierra de hojarasca (pino o encino).
- 20.- Arena de tezontle.
- 21.- Arena de río.
- 22.- Perlita.
- 23.- Composta.
- 24.- Soluciones Stock del medio Murashigie y Skoog.
- 25.- Fertilizantes foliares.
- 26.- Fungicidas e insecticidas.

VIII.3. PASOS PARA LA TRANSFERENCIA Y ADAPTACION DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS A SUELO.

Para llevar a cabo la transferencia y adaptación de las plantas micropropagadas a suelo es necesario realizar los siguientes pasos:

- 1) Preparación de sustratos.
- 2) Lavado de los residuos de agar adheridos a las raíces de las plan-

tas obtenidas "in vitro".

- 3) Transferencia de las plantas al sustrato.
- 4) Riego y fertilización de las plantas.
- 5) Generación de un microambiente o microinvernadero.
- 6) Adaptación gradual a las condiciones ambientales normales.
- 7) Manejo de las plantas micropropagadas ya adaptadas a suelo.

VIII.4. FORMA DE REALIZAR CADA UNO DE LOS PASOS

1) Preparación de sustratos.

La preparación de sustratos implica dos actividades que son:

- a) Mezclado de tierras y/o componentes.
- b) Esterilización del sustrato.

Para el mezclado de tierras se puede emplear un solo componente o varios. En el caso de que el sustrato esté constituido por un solo componente éste por lo regular deberá ser inerte, siendo dentro de este tipo más ampliamente utilizados los siguientes: Agrolita, vermiculita, arena de tezontle, arena de río y musgo de Sphagnum.

Salvo el musgo de Sphagnum los otros materiales son de fácil adquisición en nuestro país. Es necesario realizarles un previo lavado y desinfectado antes de emplearlos como sustratos para plantas micropropagadas. Es muy recomendable el empleo de este tipo de materiales en los primeros días de la fase de adaptación ya que por sus características garantizan una buena disponibilidad de humedad en la zona de raíces y una textura suave que permite la expansión del sistema radicular.

El uso de estos materiales hace necesaria la adición de soluciones nutritivas.

Las plantas pueden ser también adaptadas a condiciones de suelo sobre sustratos preparados con más de un componente entre los cuales exista uno o varios de origen orgánico. Por lo general este tipo de sustrato está constituido por tierras naturales y elementos orgánicos razón por la cual es imprescindible un buen proceso de desinfección.

A continuación se presentan una serie de mezclas que han dado buen resultado en la fase de adaptación a suelo en varias especies.

Mezcla N^o1.

- 1 parte de agrolita.
- 1/2 parte de estiércol procesado de borrego.
- 2 partes de tierra de hojarasca de encino, perfectamente triturada.
- 1/2 parte de humus.

Esta mezcla ha sido usada con éxito en la adaptación de Violeta Africana, Crisantemo y Clavel.

Mezcla N^o2.

- 1 parte de arena de tezontle.
- 2 partes de tierra de hojarasca de pino.
- 1/2 parte de estiércol de vaca o borrego (completamente procesado).

Mezcla usada con éxito en la fase de adaptación de Violeta Africana, - Chabacano y Rosal.

Mezcla N^o3.

- 1 parte de agrolita.

1/2 parte de vermiculita.
2 partes de humus.
1/2 parte de estiércol procesado.

Esta mezcla se recomienda para la fase de adaptación de Clavel y Crisantemo.

Mezcla N°4.

1/2 parte de arena de río.
1 parte de arena de tezontle.

Esta mezcla en combinación con una cámara de nebulización da un excelente resultado en el enraizamiento de plantas de Clavel y Crisantemo.

Mezcla N°5.

1 parte de agrolita.
1/2 parte de vermiculita.

Al igual que la anterior esta mezcla favorece el enraizamiento de plantas que presentan un sistema radicular deficiente.

Mezcla N°6.

1/2 parte de agrolita.
1/2 parte de tierra de hojarasca.
1 parte de humus.

Esta mezcla se recomienda para el desarrollo posterior a la fase de adaptación de cualquier planta.

b) Esterilización del sustrato.

Una vez preparado el sustrato se procede a su esterilización o desinfección, lo cual se realiza con productos químicos o con vapor.

Entre los productos químicos más utilizados están los siguientes:

Formaldehído. Producto que resulta ser un buen fungicida pero su eficacia en la eliminación de nemátodos e insectos es baja. Se prepara al 2% v/v de formol en agua y se aplica a razón de 100 l/m³ de tierra. El sustrato debe cubrirse durante 24-48 hrs para evitar la rápida evaporación del formaldehído. Debe dejarse airear durante dos semanas antes de emplearse.

Bromuro de metilo. Se aplica a una dosis de 1 lb/m³, es un producto bastante efectivo aunque no elimina a Verticillium. En necesario cubrir el sustrato con plástico durante 48 hrs, posteriormente se deja airear durante 5 días antes de utilizarse.

Cloropirrina. Se puede aplicar a razón de 200 ml/m³. El sustrato deberá cubrirse para evitar que se volatilice el químico. Se dejará airear el sustrato durante 10 días ya que los vapores de cloropirrina son bastante tóxicos para los tejidos vegetales.

Desinfección con vapor de agua. De todos los métodos de desinfección de sustratos el vapor de agua es sin lugar a dudas uno de los más eficientes y el que mayor número de ventajas ofrece, pudiéndose enumerar entre otras las siguientes: No es tóxico, por lo que se anulan los riesgos en su aplicación tanto para los animales como para las personas. No deja residuos en el sustrato. El sustrato puede ser empleado inmediatamente después de haberse aplicado el tratamiento.

Se recomienda observar las siguientes precauciones en la desinfección de sustratos por medio de vapor de agua:

- a) Cubrir el sustrato con una lona para evitar que el vapor se escape.

- b) Mantener en todos los puntos del sustrato una temperatura de 83 °C durante 30 minutos.

2) Lavado de los residuos de agar adheridos a las raíces de las plantas - obtenidas "in vitro".

Una vez preparado y desinfectado el sustrato se pone en recipientes donde las plantas proseguirán su desarrollo y adaptación en invernadero.

Estas plantas deben ser retiradas de los frascos con medio de cultivo observando las siguientes precauciones:

- a) Añadir 10 ml de agua al frasco para remojar y ablandar el agar del medio de cultivo.
- b) Después de 5 minutos escurrir el remanente de agua y retirar con cuidado la o las plantas del frasco.
- c) Lavar con agua corriente el agar que quede adherido a las raíces - para evitar que se generen focos de incubación de gérmenes en estos puntos.

3) Transferencia a tierra de las plantas obtenidas "in vitro".

Ya que las plantas se han retirado del agar y sus raíces están perfectamente limpias, la transferencia al sustrato debe hacerse de la siguiente manera: Practicar un orificio en el sustrato lo suficientemente grande para evitar que se lesionen las raíces generadas "in vitro". Una vez acomodadas las raíces, proceder a compactar con suavidad el sustrato en torno a las raíces para evitar que se oxiden por el contacto con el aire. Evitar mantener a las raíces expuestas al aire por períodos mayores a 5 min.

4) Riego y fertilización de las plantas transferidas a suelo.

Una vez transferidas las plantas al sustrato se deben realizar las siguientes operaciones: Preparar la cantidad requerida de la solución nutritiva con las sustancias A, B, C, D, E y F del medio de Murashigue y Skoog calculando 50 ml/100 grs de sustrato (ver inciso IV.3).

Regar profusa y uniformemente el sustrato con la solución nutritiva. - Esta operación deberá realizarse durante las tres primeras semanas. El riego deberá aplicarse cada vez que sea necesario para mantener húmedo pero no anegado el sustrato.

5) Generación de un microambiente o microinvernadero.

Una vez realizadas las operaciones anteriores es necesario rodear a la planta de un ambiente que propicie una alta humedad relativa y que evite la deshidratación de los tejidos. Para lograr esto se pueden llevar a cabo las siguientes acciones: Proveer a cada maceta, vaso o recipiente con una "capucha" que evite la desecación. Esta capucha puede hacerse con una bolsa de plástico transparente o con un vaso de plástico translúcido o transparente, en los cuales se practicarán perforaciones para permitir el intercambio gaseoso.

En caso de contar con cámara de nebulización se darán aspersiones en forma de neblina durante 30 segundos a 1 minuto cada 10 minutos durante 2 - semanas. Este tipo de aspersiones favorecerá el desarrollo de las raíces, - aún en plantas que son transferidas sin previa formación de raíces "in vitro".

b) Adaptación gradual a las condiciones ambientales normales.

Cuando han transcurrido de 2 a 4 semanas en las condiciones antes mencionadas y las plantas se han mantenido turgentes y vigorosas, deben ser - adaptadas gradualmente a las condiciones normales de cultivo. Para ello se irán retirando las capuchas paulatinamente, practicando perforaciones sobre éstas o retirándolas progresivamente hasta dejar los recipientes con las - plantas completamente descubiertas.

En caso de haber llevado a cabo la adaptación en la cámara de nebuliza

ción los riegos intermitentes se irán espaciando hasta realizar uno o dos - cada hora durante 30 segundos.

La concentración de los riegos fertilizados también deberá disminuirse a 1/2 y a 1/4, alternándolos con riegos a base de agua.

Las características de los riegos fertilizados en la etapa de adaptación gradual a condiciones normales de cultivo se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Riegos fertilizados para la fase de adaptación a suelo.

Primera semana de adaptación.

Preparar los litros necesarios de solución nutritiva con las soluciones Stock A, B, C, D, E y F del medio de Murashigue y Skoog. Regar las plantas con esta solución.

Tercera semana de adaptación.

Preparar los litros de solución nutritiva necesarios con las soluciones Stock A, B, C, D, E y F de Murashigue y Skoog a 1/2 de su concentración. Regar las plantas con esta solución.

Cuarta semana de adaptación.

Preparar los litros de solución nutritiva necesarios con las soluciones Stock A, B, C, D, E y F de Murashigue y Skoog a 1/4 de su concentración. Regar las plantas con esta solución.

VIII.5. MANEJO DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS YA ADAPTADAS A SUELO.

Cuando se ha logrado la completa adaptación de las plantas obtenidas - "in vitro" a condiciones de suelo estas deben ser transferidas a macetas o recipientes más grandes y recibir un manejo adecuado para que continuen con su desarrollo.

Los cuidados que implica este manejo adecuado son:

- a) Los recipientes deberán tener las características de tamaño, forma y resistencia que garanticen un buen y vigoroso desarrollo de raíces.
- b) El sustrato deberá contener aquellos componentes que aseguren un buen aporte de nutrimentos junto con una textura y estructura adecuada.
- c) El sustrato será pasteurizado para evitar posible ataque de patógenos.
- d) Las plantas se manejarán de manera individual y llevando un estricto control fitosanitario para prevenir la infestación de todo el "Bloque Madre".
- e) Deberá controlarse al máximo la calidad de masas de aire, agua de riego, asepsia de personal y herramientas, aplicación y dosificación de plaguicidas y fertilizantes.
- f) Se procederá a examinar semanalmente cada una de las plantas con el fin de detectar cualquier anomalía de calidad o fitosanitaria.
- g) Los recipientes con las plantas deberán estar en alto y no entrar en contacto con el terreno. Este, de preferencia, deberá estar cubierto con una capa de concreto para evitar la difusión de patóge-

nos hacia las macetas.

- h) Cuando las plantas obtenidas "in vitro" sean destinadas a la producción de material certificado, se procederá a realizar una indexación del material para certificarlo.

TERCERA PARTE

CAPITULO IX

EMPLEO DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS POR MICROPROPAGACION

IX.1. ALTERNATIVAS DE EMPLEO PARA LAS PLANTAS OBTENIDAS "IN VITRO".

IX.2. ESQUEMAS DE MANEJO Y PRODUCCION DE PLANTAS CERTIFICADAS.

IX.1. ALTERNATIVAS DE EMPLEO PARA LAS PLANTAS OBTENIDAS "IN VITRO"

Las opciones de empleo para las plantas obtenidas "in vitro" son varias, quedando comprendidas en dos categorías que son:

- A) Comercialización de las plantas obtenidas "in vitro" una vez concluida la fase de desarrollo en invernadero.
- B) Incorporación de las plantas micropropagadas a secuencias de producción de plantas vía otras técnicas de propagación; por ejemplo: acodado, injertación, estacado, deshijado, estolonización, etc.

La elección de una u otra opción dependerá de los siguientes factores:

- 1) Costo de producción de la planta obtenida "in vitro".
- 2) Precio de venta de esa planta en el mercado.
- 3) Capacidad de producción en el laboratorio.
- 4) Demanda o disponibilidad de mercado para las plantas.
- 5) Calidad fitosanitaria requerida en el mercado.

El costo de producción de la planta obtenida "in vitro" depende de:

- La cantidad de plantas obtenidas por unidad de propágulo o de medio de cultivo.
- La cantidad de transferencias "in vitro".
- El tiempo requerido en la producción "in vitro" en la fase de adaptación y desarrollo en invernadero.

- El porcentaje de plantas adaptadas a suelo.
- El porcentaje de sobrevivencia hasta la etapa de comercialización.

Para algunas especies como la violeta africana, la Gloxinia, el Anthurium y las orquídeas, entre otras plantas que pueden alcanzar altos precios de venta en el mercado y pueden ser replicadas en gran número y en poco tiempo, la adaptación a suelo y el desarrollo en invernadero se convierten en la antesala de su comercialización. Sin embargo existen otras especies como el clavel, el crisantemo, la fresa, especies frutícolas y hortícolas para las cuales la fase de adaptación y desarrollo en invernadero solo implican el cierre de un ciclo en una cadena de producción compuesta de 2, 3 y hasta 4 ciclos más antes de la comercialización.

Por lo general en este último tipo de plantas se llevan a cabo el 2º, 3º y 4º ciclo apoyándose en otras técnicas de propagación asexual con el fin de masificar aun más la producción y reducir los costos de la misma, aprovechando los altos niveles de calidad fitosanitaria que se alcanzan en las plantas producidas en el laboratorio.

Dentro de las alternativas más generales de empleo para las plantas micropropagadas existen:

1. Plantas con una gran capacidad reproductiva "in vitro" y con alto precio de venta. Ejemplo: plantas ornamentales y/o exóticas.
 - a) Producción "in vitro".
 - b) Adaptación y desarrollo en invernadero.
 - c) Comercialización.
2. Plantas hortícolas que se propagan por semillas.
 - a) Producción "in vitro".
 - b) Adaptación y desarrollo en invernadero.

- c) Producción de semillas en invernadero.
 - d) Cultivo y desarrollo de las semillas F_1 en condiciones controladas.
 - e) Producción de semillas F_2 en condiciones controladas.
 - f) Producción de semilla certificada.
 - g) Comercialización.
3. Plantas frutícolas con alta capacidad reproductiva "in vitro" o con lato precio de venta.
- a) Producción "in vitro" de patrones clonales sanos y de "micro-púas" libres de enfermedades.
 - b) Microinjerto (injertación "in vitro").
 - c) Adaptación en invernadero.
 - d) Desarrollo en vivero.
 - e) Comercialización.

ó bien

- a') Producción "in vitro" de plantas patrones sanas.
 - b') Adaptación en invernadero.
 - c') Injertación con "púas" venidas de una planta microinjertada libre de enfermedades.
 - d') Desarrollo en vivero bajo estrictas condiciones de certificación.
 - e') Comercialización.
4. Plantas que se requieren en grandes cantidades, que tienen que ser renovadas después de cada cosecha y cuyo precio de venta no es alto. Ejemplo: fresa, clavel y crisantemo.
- a) Producción "in vitro" de plantas.
 - b) Adaptación, desarrollo y multiplicación asexual en invernadero.

- c) **Desarrollo y multiplicación de la primera generación asexual, bajo cubierta y en condiciones controladas.**
 - d) **Desarrollo y multiplicación de la segunda generación asexual, bajo cubierta y en condiciones controladas.**
 - e) **Comercialización de la tercera generación asexual.**
5. **Plantas que son requeridas en grandes cantidades pero que van a producir durante varios ciclos o cosechas. Ejemplo: cultivos de plantación como rosales y espárrago.**
- a) **Producción "in vitro" de plantas.**
 - b) **Reproducción "in vitro" por microesqueje o yemas, etc.**
 - c) **Adaptación y desarrollo en invernadero.**
 - d) **Comercialización.**

IX.2. ESQUEMAS DE MANEJO Y PRODUCCION DE PLANTAS CERTIFICADAS

En la actualidad, gracias a la micropropagación y el cultivo "in vitro" de meristemas, es posible producir material "libre de patógenos", en el cual se ha erradicado al agente que ocasiona la enfermedad. En contraste con el material que se venía produciendo antes del desarrollo de esta técnica, el cual se certificaba como "libre de enfermedades", lo que implicaba que en dicho material la infección se mantenía latente o sin manifestarse - aunque el organismo causante estuviera presente.

Para evitar la diseminación de patógenos se hace imperioso el establecimiento de programas de certificación que asesoren, supervisen y reglamenten la producción de materiales "libres de patógenos". Es bien sabido que una planta que lleva virus o cualquier otro patógeno en estado latente y que no se manifiesta en el lugar de origen, puede transmitirlo y hacerse patente en otra región e infestar incluso otras especies del nuevo medio.

Países como E.E.U.U., Italia, Israel, Inglaterra y Japón entre otros, tienen en la actualidad programas bien establecidos de producción y certificación, tanto de semillas como de materiales vegetativos, de los cuales se dan a continuación algunos esquemas adaptados a las condiciones de nuestro país.

Producción y certificación de materiales vegetativos.

Para la producción y certificación de materiales vegetativos se sugieren los siguientes pasos:

- 1) Localización de una o varias plantas uniformes y genéticamente fieles al tipo, en buen estado de desarrollo y fructificación y de las cuales se tengan referencias de fácil propagación, (Hartman y Kester, 1975).
- 2) Aplicación de tratamientos químicos o térmicos para aumentar la ga

rancia de obtener porciones libres de patógenos, (Hartman y Kester 1975).

- 3) Micropropagación de las porciones libres de patógenos para establecer el Núcleo Fundación, el cual estará constituido exclusivamente por plantas que no han rebasado la fase de producción "in vitro".
- 4) Desarrollo en invernadero de las plantas provenientes del Núcleo - Fundación y establecimiento del Bloque Fundación, integrado por - plantas que han sido sometidas a pruebas de indexación después de haber sido propagadas "in vitro".
- 5) Multiplicación asexual por otras técnicas de propagación diferentes a la micropropagación del Bloque Fundación. Ejemplo: esqueje, estolón, acodado etc.
- 6) Desarrollo bajo cubierta plástica y ambiente controlado de la progenie asexual venida del Bloque Fundación.
Esta progenie, en estas condiciones de cultivo establece la - calidad "Registrada".
- 7) Multiplicación bajo cubierta y ambiente controlado de las plantas calidad Registrada.
- 8) Desarrollo bajo cubierta plástica de la progenie asexual venida de la calidad Registrada.
Esta nueva progenie establece la calidad "Certificada".

En la anterior secuencia de producción de materiales se debe establecer al menos una prueba de indexación o de certificación inmunológica de libertad de virus en la fase 4, que es donde se lleva a cabo el desarrollo de la calidad "Fundación" en invernadero.

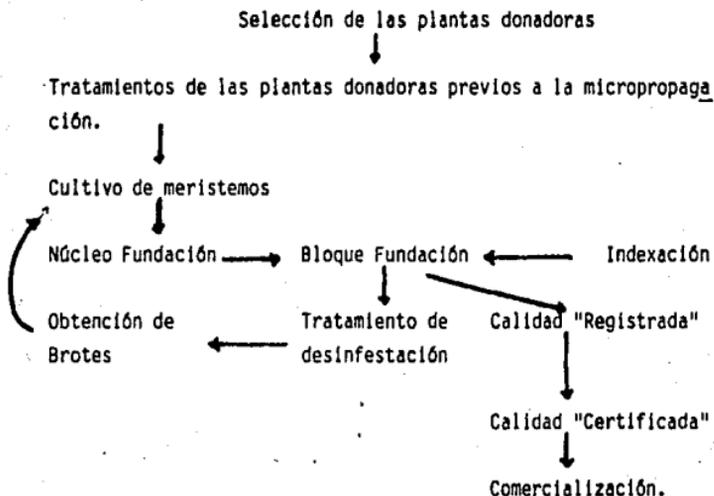
El material "certificado" es el material comercial de plantación y se

le llama certificado porque ha sido producido bajo normas mínimas de sanidad vegetal y bajo la supervisión de una oficina legalmente autorizada. Por lo tanto es muy importante en un programa de "certificación de materiales" el observar y respetar la procedencia y condiciones de cultivo en cada fase de la secuencia de producción.

Para la certificación de materiales "libres de patógenos" el flujo de los pasos del proceso deberá mantener un orden que garantice la "calidad fitosanitaria" que corresponde a cada paso.

A continuación se propone un esquema de flujo de materiales que asegure la generación de la calidad correspondiente a cada paso y las normas mínimas que tienen que observarse en cada uno de los pasos para satisfacer adecuadamente las necesidades de un programa de certificación.

ESQUEMA DE FLUJO DE MATERIALES Y PRODUCCION DE DIVERSAS CALIDADES DE PLANTAS (Pasos del Programa de Certificación de materiales vegetativos).



Normas Míminas de Cultivo para Cada Uno de los Pasos que Componen un Programa de Producción de Material Vegetativo Certificado.

El núcleo fundación estará constituido por los meristemas cultivados "in vitro" provenientes de las plantas seleccionadas por sus características genéticas para establecer el clon libre de patógenos.

Las plantas que se generen en el laboratorio pasarán a formar parte del bloque fundación el cual será manejado en un invernadero, estará constituido por un número muy pequeño de plantas. Estas, deberán ser mantenidas de manera individual para que puedan ser eliminadas rápidamente aquellas que presenten síntomas de enfermedad o una mutación no deseada. Todo el equipo y herramientas empleados en el manejo del bloque fundación deberán ser esterilizados y las operaciones serán realizadas por el personal mínimo indispensable y altamente calificado.

El bloque fundación será el único paso bajo condiciones normales de producción que tendrá un reflujo directo hacia el núcleo fundación, y también será en este material en el que se practiquen pruebas de indexación o pruebas inmunológicas de detección de virus.

El bloque fundación será inducido a producir esquejes, estolones o ramas para estacas a través de podas, riegos y fertilizaciones, las cuales serán enraizadas y llevadas a la siguiente fase de cultivo.

Fase de Cultivo bajo Cubierta o Túneles Plásticos. Producción del Material con Calidad Registrada.

En esta etapa el material producido asexualmente del bloque fundación será llevado a cultivo en condiciones de aislamiento bajo cubiertas o túneles plásticos donde se le inducirá a crecer y a producir a su vez una progenie asexual abundante y vigorosa.

El suelo deberá ser previamente esterilizado con agentes drásticos co-

mo el bromuro de metilo, la cloropícrina y el vapam ya sean solos o en combinación de dos.

En caso de no fumigarse el suelo, el cultivo se realizará en bancales cavados en el terreno, en los cuales el fondo será recubierto por varios centímetros de grava, sobre la que se pondrá sustrato pasteurizado, también es necesario establecer programas eficientes de control de plagas y enfermedades. De este paso en adelante es importante el establecer la zona de plantero lejos de las zonas de cultivo para evitar la difusión de patógenos. Los riegos y los programas de fertilización deberán ser adecuados a la variedad y la especie; así como, al vigor y sanidad que se requiere en esta calidad.

Las plantas desarrolladas en esta fase producirán progenies asexuales las cuales pasarán a constituir la calidad "Certificada" la cual será vendida como material propagativo a los productores. Esta progenie asexual puede venderse enraizada o no pero deberá presentar las siguientes características:

- Uniformidad en talla.
- Uniformidad en vigor.
- Portar las características genéticas "tipo".
- Alta calidad fitosanitaria, avalada por la oficina correspondiente.
- Etiquetamiento y empaque adecuados.
- Deberá llegar a los productores en la época adecuada.

CAPITULO X

SUSTITUCION DE EQUIPO Y MATERIALES

- X.1. EL AUTOCLAVE.
- X.2. EL DESTILADOR DE AGUA.
- X.3. EL PASTEURIZADOR DE TIERRA.
- X.4. LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR.
- X.5. EL MICROSCOPIO DE DISECCION.
- X.6. EL POTENCIOMETRO.
- X.7. INSTRUMENTAL DE DISECCION.
- X.8. MATERIAL DE CRISTALERIA.
- X.9. LA CAMARA DE INCUBACION.
- X.10. ALGUNAS SUBSTITUCIONES PARA LA FASE DE ADAPTACION A SUELO.

En el establecimiento de un laboratorio de micropropagación surgen con frecuencia problemas relacionados con la adquisición de equipos y materiales debido a el alto costo de adquisición de equipos y materiales, así como también, a que algunos equipos y materiales son de importación; lo cual implica una demora extra en el montaje u operación del laboratorio, debido a que tienen que ser adquiridos bajo pedido.

Para que esto no se convierta en un problema insalvable, a continuación se dan una serie de sugerencias sobre adaptación y elaboración de equipo y materiales que han dado buenos resultados y que observando un mínimo de precauciones en su manejo pueden resultar tan eficientes como los de patente.

X.1. EL AUTOCLAVE

Por lo general las autoclaves generan el vapor por medio de resistencias eléctricas, están construidas con acero inoxidable y vienen en varias capacidades dependiendo del tipo y cantidad de materiales que vayan a esterilizar.

En el laboratorio de micropropagación al igual que en el de microbiología, el autoclave puede ser sustituida satisfactoriamente por una olla express, ya sea del tipo industrial o del casero. Las ollas de tipo industrial poseen un manómetro en el cual se registra la presión interna que se está generando.

En las ollas tipo doméstico el manómetro está sustituido por una válvula de escape a la cual se le sobrepone un tapón una vez que el aire de la olla ha sido purgado.

Ya sea que se cuente con uno u otro tipo de olla express las precauciones que se deben observar en su empleo cuando sustituyen a el autoclave -- son:

- a) Verificar que los empaques sellen perfectamente.
- b) Poner agua hasta la mitad de la altura de los frascos de la cama inferior.
- c) Esperar a que el indicador de presión marque 1 Kg/cm^2 , o bien a que el tapón de la válvula de purga empiece a bailar para iniciar el conteo del tiempo de esterilización.
- d) La presión interna de la olla será regulada por medio de la intensidad de la flama; una vez alcanzada la presión adecuada bajar la flama para mantenerla estable.
- e) Concluido el tiempo de esterilización dejar enfriar la olla lentamente.
- f) De preferencia no abrir la olla hasta el momento de realizar la siembra y hasta que haya transcurrido el tiempo necesario para que los medios de cultivo se hayan solidificado.

En la figura 13 se muestran los 2 tipos de ollas express y las partes de que están constituidas.

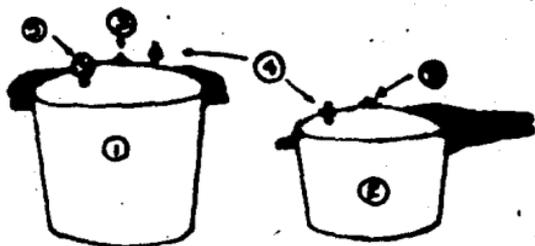


Figura 13. TIPOS DE OLLA EXPRESS.

- 1.- Olla express uso industrial.
- 2.- Olla express uso casero.
- 3.- Válvula de seguridad.
- 4.- Válvula de purga.
- 5.- Manómetro.

X.2. EL DESTILADOR DE AGUA

Dependiendo de la capacidad de destilación, los destiladores generan vapor a base de resistencias eléctricas o por medio de combustibles como el petróleo o el combustóleo. El vapor es generado en una cámara de ebullición que está comunicada a un condensador que es enfriado por agua corriente y en donde el vapor es llevado al estado líquido.

En el laboratorio de micropropagación vegetal se puede destilar agua aprovechando la olla express como generador de vapor y un serpentín condensador, acoplados de la manera como lo muestra la figura 14.

Este sistema de destilación presenta dos inconvenientes:

- 1.- Alto gasto de energía (gas o corriente eléctrica).
- 2.- Alto gasto de agua empleada para enfriamiento.

Para solucionar el primer inconveniente es necesario seleccionar aquel tipo de energía que sea más barato, y para reducir el consumo de agua empleada para enfriamiento se necesita reciclar el agua empleando un mecanismo similar al mostrado en la figura 15.

En las figuras 14 y 15 se dan dos alternativas para destilar agua con una capacidad máxima de 2.1 litros/hora.

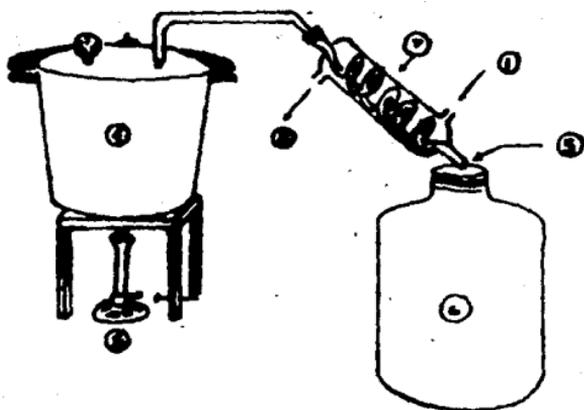


Figura 14. DESTILADOR DE AGUA.

- 1.- Entrada de agua para enfriamiento.
- 2.- Salida de agua de enfriamiento.
- 3.- Salida de agua destilada.
- 4.- Olla express funcionando como generador de vapor.
- 5.- Fuente de calor.
- 6.- Garrafón colector de agua destilada.
- 7.- Condensador de vapor.

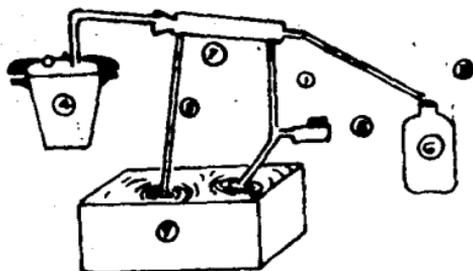


Figura 15. DESTILADOR CON SISTEMA RECICLADOR DE AGUA PARA ENFRIAMIENTO.

- 1.- Entrada de agua para enfriamiento.
- 2.- Salida de agua de enfriamiento.
- 3.- Salida de agua destilada.
- 4.- Olla express funcionando como generador de vapor.
- 5.- Garrafón colector de agua destilada.
- 6.- Condensador de vapor.
- 7.- Bomba.
- 8.- Recipiente colector de agua para enfriamiento.

X.3. EL PASTEURIZADOR DE TIERRA

Este aparato está constituido por un generador de vapor y conductos para llevar el vapor generado a los bancales de desinfección.

En la actualidad una unidad pasteurizadora por pequeña que sea cuesta varios millones de pesos, lo cual pudiera ser un impedimento en el establecimiento de las plantas micropropagadas en invernadero.

A continuación se ofrecen dos sugerencias para la elaboración de sustitutos de los pasteurizadores de patente. La elección de una u otra alternativa dependerá del volumen de tierra que se necesita desinfectar y a la disponibilidad de recursos.

El primer sustituto está construido a base de un tambor de 200 l y la forma de adaptarlo para este fin se muestra en las figuras 16 y 17.

El segundo sustituto emplea una olla express como generador de vapor, presentando como desventaja con respecto al anterior, de tener una capacidad menor. La instalación de este sistema se muestra en las figuras 18 y 19.

Para ambos sustitutos las precauciones que deben observarse en su empleo son:

- a) El sustrato se pasteurizará a 82°C durante 30 minutos.
- b) El tiempo de pasteurización deberá ser tomado a partir del momento en que son alcanzados los 82°C en todos los puntos del sustrato.
- c) En caso de elevarse la temperatura más de los 82°C existe el riesgo de formación de óxidos de magnesio, los cuales resultan altamente tóxicos para las plantas.

- d) Una vez concluido el tiempo de pasteurización se dejará enfriar el sustrato antes de transferir las plantas a él, para evitar lesiones en las raicillas.
- e) En caso de emplear el sustituto de la olla express asegúrese de cubrir bien el sustrato para evitar que el vapor se pierda rápidamente, para lo cual se recomienda el empleo de una lona ahulada, la cual se ajustará por medio de un amarre a la superficie exterior del recipiente, como lo muestra la figura 19.
- f) Si se emplea el sistema del tambo, asegurarse de que existan escapes de vapor para impedir se eleve demasiado la presión interior del bote, lo cual podría ocasionar una explosión. Para evitar este riesgo se cubre el recipiente empleando un plástico o una lona.

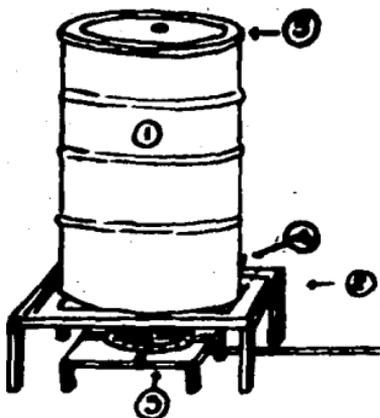


Figura 16. PASTEURIZADOR DE TIERRAS.

Sistema de vaporera.

- 1.- Tambo de 200 l.
- 2.- Base metálica.
- 3.- Fuente de calor.
- 4.- Nivel y alimentador de agua.
- 5.- Tapadera o lona ahulada para evitar que escape el vapor.

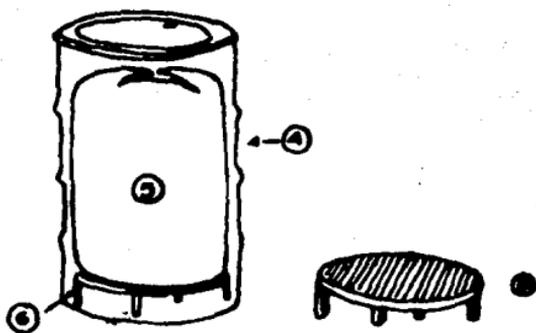


Figura 17. VISTA INTERIOR DE LA VAPORERA.

- 4.- Tambo de aceite.
- 5.- Costal de yute con tierra.
- 6.- Base soporte para el costal.
- 7.- Vista de la base soporte del costal.

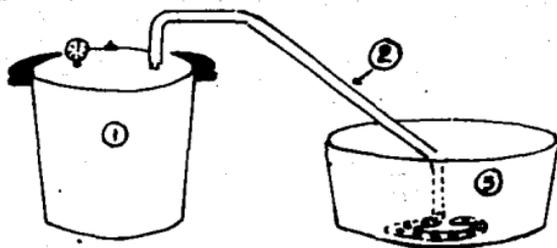


Figura 18. PASTEURIZADOR DE TIERRAS.

Sistema con generador de vapor.

- 1.- Olla express adaptada como generador de vapor.
- 2.- Conducto de vapor.
- 3.- Recipiente para tierra o sustratos.

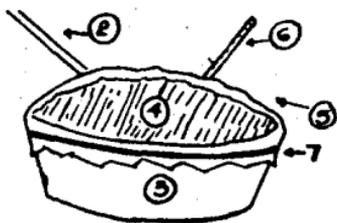


Figura 19. DISPOSICION DEL RECIPIENTE PARA TIERRAS.

- 2.- Conducto de vapor.
- 3.- Recipiente para tierra o sustratos.
- 4.- Tierra o sustratos.
- 5.- Lona o plástico para cubrir el sustrato.
- 6.- Termómetro de 0 a 110 °C.
- 7.- Amarre de la lona.

X.4. LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR

Este es sin lugar a dudas uno de los aparatos requeridos en el laboratorio de micropropagación más costoso y también más útil ya que por medio de él se consiguen condiciones de esterilidad "completa" en el área de manipulación aséptica.

La campana de flujo laminar puede ser sustituida con una campana construida con madera y vidrio, que aunque no brinda las mismas comodidades en la manipulación, si puede reducir hasta un 5% el rango de contaminación. El diseño dado a continuación (Figura 20) está pensado para dar acomodo a 2 personas, al material y equipo necesario en las operaciones asépticas,

Las precauciones que se deben observar en el empleo de este sustituto son:

- a) Realizar un buen esterilizado de las superficies internas de la campana, empleando soluciones de benzal, cloralex o alcohol.
- b) Prender los mecheros al menos 10 minutos antes de iniciar la manipulación.
- c) Esterilizar el equipo, instrumental y materiales que van a ser introducidos en la campana.
- d) Destapar, sembrar y/o transferir debajo del área estéril generada por la flama de los mecheros.
- e) Evitar al máximo corrientes de aire.
- f) Lavar y desinfectar las manos y los brazos antes y durante el curso de la manipulación.

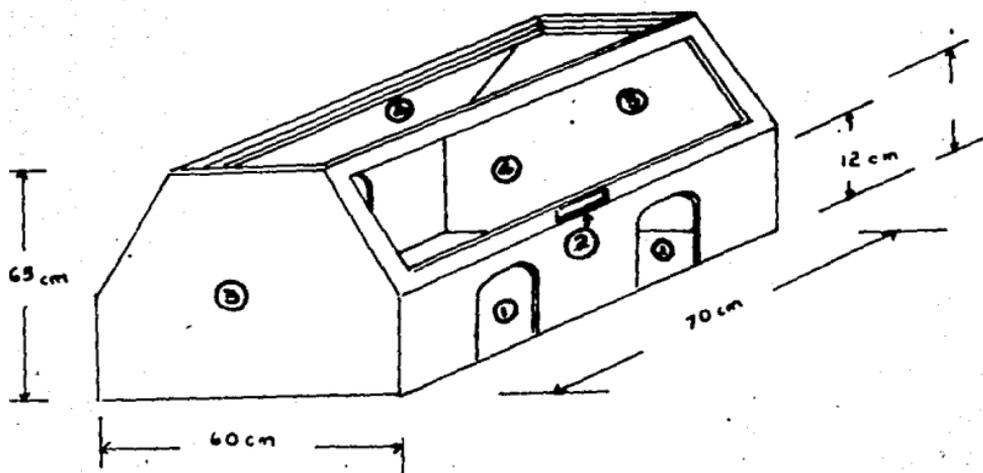


Figura 20. CAMPANA DE MADERA Y VIDRIO CON CAPACIDAD PARA DOS PERSONAS.

- 1.- Aberturas para introducir los brazos y manipular dentro de la campana.
- 2.- Abertura para los oculares del microscopio de disección.
- 3.- Costados, de madera.
- 4.- Caras con vidrio para facilitar la observación de la manipulación en el interior de la campana.

X.5. EL MICROSCOPIO DE DISECCION

Este aparato puede ser sustituido con relativa facilidad por una lupa 10X unida a un brazo flexible, el cual se sujetará a una base (Ver la figura 21). La eficacia de esta sustitución dependerá del conocimiento previo - que se tenga del tejido a diseccionar en cuanto a sus características anatómicas.

En la disección de anteras, embriones y ovarios la lupa es una herramienta versátil y ágil. En el caso de la obtención de meristemas es probable que este sustituto resulte insuficiente, al menos en los primeros intentos de aislar estos tejidos.

X.6. EL POTENCIOMETRO

En los casos en que no se cuenta con un potenciómetro para determinar y calibrar el pH de las soluciones se recomienda emplear el papel tornasol.

En la calibración del pH en los medios de cultivo para micropropagación recomendamos emplear el papel Merk, acilit, pH 0-6 (Figura 22) teniendo las siguientes precauciones:

- a) Hacer las lecturas cuando el papel está húmedo.
- b) Añadir la solución tituladora (HCl o NaOH 0.1N) despacio y agitando constantemente el medio.
- c) Realizar la titulación a temperatura ambiente (20-25 °C).

X.7. INSTRUMENTAL DE DISECCION

Los instrumentos de disección pueden ser sustituidos por elementos menos costosos. El bisturí puede ser remplazado con mucho éxito por un mango de madera o unas pinzas de disección de punta larga a las que se sujeta fir

memente un fragmento de hoja de afeitar de acero inoxidable cortado en forma de triángulo (Fig. 23).

Las agujas de disección son eficientemente sustituidas por mangos de madera (por ejemplo, palitos de paleta) a los que se insertan firmemente agujas rectas de costura (Fig. 23).

X.8. MATERIAL DE CRISTALERIA

Para realizar los cultivos en micropropagación se reporta con frecuencia el empleo de matraces y tubos de ensaye en los cuales se pone el medio de cultivo y se lleva a cabo la siembra del explante. Debido al elevado costo del material de cristaleria pyrex éste puede ser remplazado por frascos gerber de desecho (Fig. 24).

Para el empleo de estos frascos se recomienda se observen las siguientes precauciones:

- a) Lavar y enjuagar perfectamente los frascos.
- b) Esterilizarlos durante 20 minutos en autoclave antes de emplearlos.
- c) Si para su uso se tapan los frascos con papel aluminio, descartar aquellos que tengan despostilladuras en la boca.
- d) Eliminar los frascos que estén fracturados para evitar se revienten al momento de esterilizar los medios.

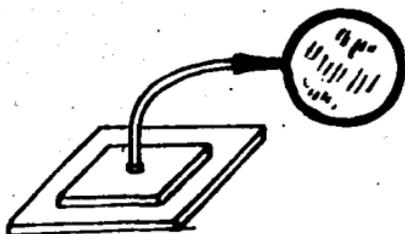


Figura 21. LUPA CON PEDESTAL Y BRAZO FLEXIBLE.

- 1.- Vidrio de aumento 10X.
- 2.- Extensión flexible.
- 3.- Base pesada para brindar mayor estabilidad.

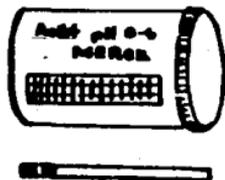


Figura 22. PAPEL INDICADOR DE pH RANGO 0-6.

- 1.- Tira de plástico con papel tornasol en el extremo.
- 2.- Extremo con papel tornasol de 3 colores diferentes.
- 3.- Escala indicadora del viraje de color para diferentes pH.

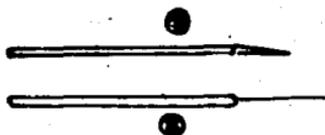


Figura 23. INSTRUMENTAL DE DISECCION.

- 1.- Bisturí construido con un mango de madera y un fragmento de hoja de afeitarse cortado en triángulo.
- 2.- Aguja de disección elaborada con un mango de madera y una aguja de costura.



Figura 24. El FRASCO GERBER DE BOCA ANCHA ofrece múltiples ventajas cuando es empleado en micropropagación, pudiéndose mencionar entre otras las siguientes: Soporta muy bien la presión y temperatura de esterilización en autoclave.

Debido a su boca ancha facilita la manipulación de los tejidos y plantas dentro de él.

Su costo de adquisición es relativamente bajo.

X.9. LA CAMARA DE INCUBACION

Aunque este inciso no se refiere exactamente a una sustitución a continuación daremos una serie de elementos que constituyen la cámara de incubación y que pueden ser manufacturados por uno mismo.

El bastidor de lámparas.

Este es un marco construido de preferencia en madera y sobre el cual se dispondrán 6 lámparas de luz blanca fría de 40 watts cada una, de tipo Slim line o Agrolux.

El marco deberá tener 1.20 m de alto por 1.00 m de ancho y estará construido con tablas de 0.12 m de ancho por 2.5 cm de espesor (Fig. 26).

Una vez armado el bastidor, debe ser colocado a 1.00 m de distancia con respecto a la superficie que va a iluminar dando una intensidad aproximada de 1000 lux al centro. Cuando se emplee este tipo de fuente luminosa la iluminación será proporcionada a los cultivos de manera lateral, lo cual implicará que los frascos dispuestos en filas posteriores a la primera irán recibiendo menor cantidad de luz, por lo que habrá que colocar los frascos sobrepuestos para aprovechar al máximo la luz, o bien, en las filas posteriores se acomodarán aquellos cultivos que requieran de menor iluminación.

En la práctica ha resultado ser un sistema de iluminación bastante satisfactorio para la micropropagación de fresa, clavel, crisantemo, violeta africana, rosal y chabacano.

Anaqueles.

Los anaqueles que se emplean en micropropagación pueden ser de madera, metal o vidrio. La elección de uno u otro anaquel dependerá del presupuesto disponible. En la mayoría de los laboratorios se utilizan anaqueles de metal y/o madera debido a su resistencia y alta durabilidad.

Los factores que se deben tomar en cuenta en la construcción de la estantería para micropropagación son los siguientes.

1.- El largo del estante debe ser un múltiplo de la longitud de las lámparas de luz blanca fría disponibles en el mercado; sobre todo si se piensa iluminar los cultivos desde arriba, es decir, si la iluminación va a ser vertical e individualizada para cada estante como en la figura 25.

2.- Es recomendable que el anaquel tenga una altura total que permita un acceso fácil y rápido a cada uno de los entrepaños.

En la figura 25 se presenta un esquema de un anaquel con 4 entrepaños.

3.- Los estantes deberán estar pintados con esmalte blanco para que permitan la reflexión de la luz y para que se puedan lavar y desinfectar con facilidad.

4.- El ancho del anaquel dependerá de los siguientes factores:

a) La iluminación que se quiera dar a cada entrepaño, lo cual determinará la cantidad de lámparas que se tendrán que disponer en la parte alta de cada entrepaño.

b) El tipo de frascos que se empleen en micropropagación y los volúmenes de producción que se estén generando.

c) El espacio del que se disponga en el área de incubación.

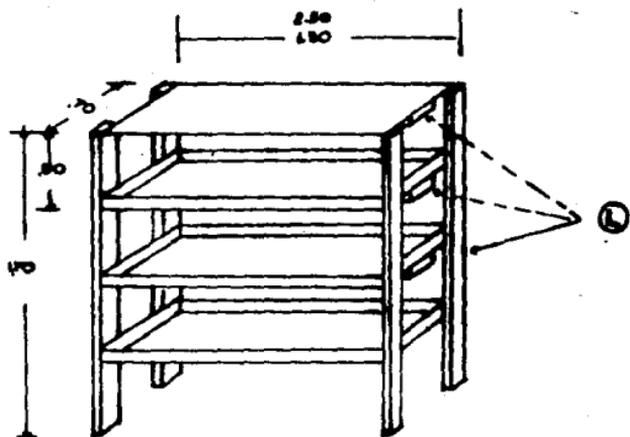


Figura 25. ESTANTE construido en madera, constituido de cuatro entrepaños y con iluminación vertical proporcionada por las lámparas (L) de luz - blanca fría.

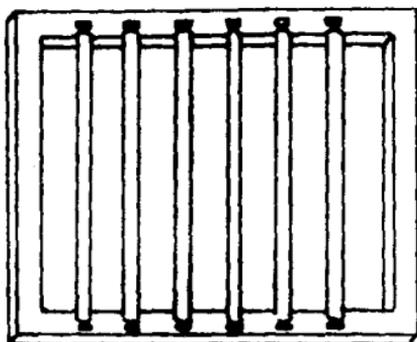


Figura 26. BASTIDOR de madera con seis lámparas de 40 watts de luz blanca fría, que proporcionan la intensidad necesaria para las fases de adaptación y multiplicación - "in vitro".

X.10. ALGUNAS SUSTITUCIONES PARA LA FASE DE ADAPTACION A SUELO

En el capítulo VIII se discutió cómo la transferencia y adaptación al suelo implica una serie de riesgos que las plantas micropropagadas tienen - que librar antes de llegar a la culminación de su desarrollo en invernadero, por lo tanto a continuación se presentan una serie de ideas para la elaboración de elementos que nos han sido de gran ayuda en esta fase de la secuencia de propagación.

En primer término se sugerirá la manera de generar un microambiente propicio para las plantas en la fase de adaptación a suelo. Este se puede lograr por medio de las siguientes opciones.

1) Maceta cubierta con una capucha de plástico.

Esta alternativa se logra poniendo 4 palitos en posición vertical y equidistante, clavados en el sustrato a manera de postes. Sobre estos se va a colocar una bolsa de plástico transparente y del diámetro adecuado para que pueda cubrir la pared externa en la boca de la maceta. Esta debe ser de preferencia de plástico para que se pueda sujetar con una cinta de papel adhesivo a la maceta (Fig. 27).

Las precauciones que se deben tener en cuenta son:

- a) No permitir que la bolsa de plástico entre en contacto con la planta, ya que esto ocasiona una rápida pudrición de los tejidos.
- b) Recordar practicar orificios o áreas de intercambio gaseoso en la bolsa plástica para prevenir al máximo el ataque de hongos. La cantidad de perforaciones deberá aumentarse conforme la adaptación de la planta avance, hasta llegar a retirar por completo la cubierta plástica.
- c) Mantener a las plantas en sus macetas, cubiertas con plástico, en

áreas donde la incidencia de luz sea del 30% a 40% con respecto a la luz del sol. Gradualmente las plantas deberán irse adaptando a las condiciones normales de iluminación.

- d) Procurar mantener fresca el área donde se localizan las plantas. - Esto se puede lograr mojando piso y paredes en las horas del día en que sea más alta la temperatura.

2) Vasos desechables adaptados como microinvernaderos.

Los vasos desechables también pueden ser muy útiles en el manejo de plantas en la fase de adaptación a suelo. Esto se logra poniendo un vaso sobre otro, unidos por las bocas y procurando que el vaso superior sea de material translúcido. Los vasos así dispuestos pueden ser fijados por medio de una cinta de papel adhesivo (Fig. 28).

En este caso las precauciones que se deben seguir son las mismas que las indicadas para las macetas con cubiertas plásticas.

3) Construcción de una cámara de nebulización.

En la regulación del microambiente de las plantas en la fase de adaptación, se puede generar una atmósfera saturada de humedad por medio de un equipo nebulizador, el cual puede ser construido por uno mismo con pocos materiales.

Las ventajas de este sistema son:

- 1.- Mantiene una diferencia térmica entre la parte aérea y radicular de las plantas, lo que estimula un enraizamiento más rápido y abundante.
- 2.- El riego puede ser suministrado con fertilizantes lo que acelera el desarrollo de las plantas.

3.- Las plagas pueden ser controladas añadiendo plaguicidas al agua - de riego.

4.- Se puede recuperar y reciclar el agua de riego.

En las figuras 29 y 30 se presenta un modelo sencillo de cámara de nebulización que puede construirse fácilmente.



Figura 27. MACETA CON CAPUCHA PLASTICA para generar un microambiente favorable en la fase de adaptación a suelo.

- 1.- Maceta.
- 2.- Bolsa de plástico.
- 3.- Palitos de madera para mantener extendida la capucha plástica.
- 4.- Orificios para intercambio gaseoso.

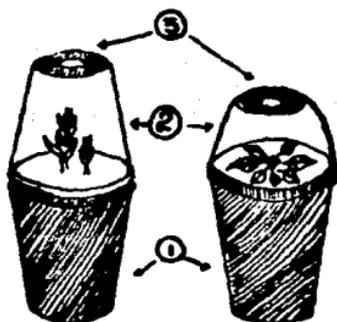


Figura 28. VASOS DESECHABLES ADAPTADOS COMO MICROINVERNADEROS.

- 1.- Vasos desechables opacos.
- 2.- Vasos desechables transparentes o translú
cidos.
- 3.- Orificios para intercambio gaseoso.

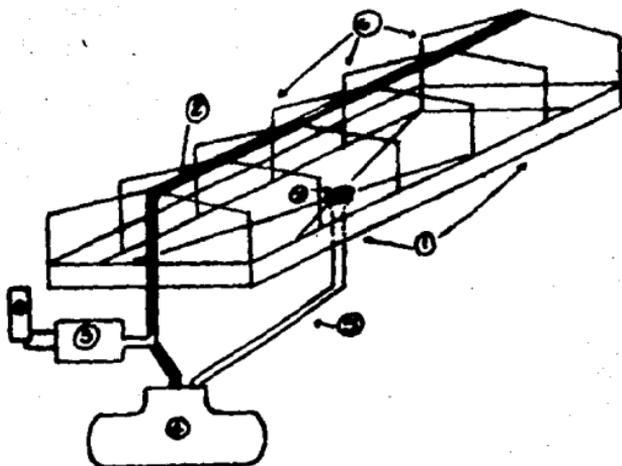


Figura 29. BANCAL DE INVERNADERO ADAPTADO COMO CÁMARA NEBULIZADORA.

- 1.- Bancal de concreto.
- 2.- Tubo PVC de 3/4" con boquillas aspersoras tipo "microjet".
- 3.- Bomba de 1/2 HP.
- 4.- Tinaco o recipiente colector de agua.
- 5.- Línea colectora de agua que va del drenaje del bancal al tinaco colector.
- 6.- Estructuras para soportar la línea aspersora y el plástico con que se cubre la cámara nebulizadora.
- 7.- Coladera de desagüe del granaje protegida con una malla fina para evitar el escape de partículas de sustrato.
- 8.- Reloj de período para encendido intermitente de la bomba de impulsión de agua.

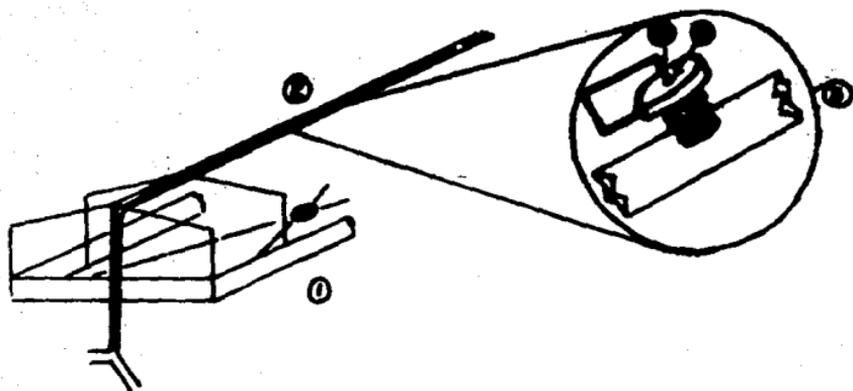


Figura 30. Aspecto de una BOQUILLA ASPERSORA TIPO MICROJET que provee de una neblina que favorece el enraizamiento y adaptación de las plantas en el invernadero.

- 1.- Bancal de concreto adaptado como cámara nebulizadora.
- 2.- Tubería de PVC con boquillas aspersoras.
- 3.- Ampliación de una boquilla aspersora tipo "microjet".
- 4.- Orificio de salida del agua propulsada por la bomba.
- 5.- Punto de generación de la sombrilla de neblina.

CUARTA PARTE

CAPITULO XI

MICROPROPAGACION DE ESPECIES SELECTAS

XI.1. MICROPROPAGACION DE VIOLETA AFRICANA.

XI.2. MICROPROPAGACION DE TABACO.

XI.3. MICROPROPAGACION DE ROSA.

XI.4. MICROPROPAGACION DE DURAZNO Y CHABACANO.

XI.5. MICROPROPAGACION DE ZANAHORIA.

XI.6. MICROPROPAGACION DE CLAVEL.

XI.7. MICROPROPAGACION DE CRISANTEMO.

XI.8. MICROPROPAGACION DE FRESA.

En este capítulo se expone a manera de resúmen las experiencias adquiridas durante 10 años de práctica y enseñanza de la micropropagación de algunas especies vegetales, haciendo referencia a las recomendaciones y "recetas" dadas en los capítulos precedentes.

Así mismo, este último capítulo está planeado de tal manera que si se van realizando las prácticas en el orden propuesto, irán llevando gradualmente al lector a niveles de dificultad mayor, hasta adquirir la destreza necesaria para abordar el cultivo "in vitro" de meristemas el cual, en opinión de varios micropropagadores, es el que mayor habilidad y experiencia requiere.

XI.1. MICROPROPAGACION DE VIOLETA AFRICANA

Explante: Fragmentos de hoja de 1 a 2 cm²; la manera de obtener este tipo de explante se explica e ilustra en el inciso V.6 figura 6.

Esterilización de los explantes: Para proceder a la esterilización de este tipo de explantes emplear el método N^o1 mencionado en el inciso V.5.

Al igual que para los pecíolos de hoja de violeta africana, primero es sterilizar la superficie de las hojas y posteriormente disectar los fragmentos de 1 ó 2 cm².

Etapas del proceso: Para la micropropagación de esta planta por medio de explantes de hoja se requieren 2 etapas de cultivo "in vitro":

- 1) Etapa de multiplicación.
- 2) Etapa de enraizamiento.

La etapa de multiplicación comprende de la primera a la décima semana, la etapa de enraizamiento va de la décima a la décimocuarta semana. La etapa de adaptación y desarrollo en el suelo abarca de la décimocuarta semana a la vigésimo quinta o vigésimo octava semana.

Medios empleados en cada etapa: En la fase de multiplicación el medio empleado es el de Murashigue y Skoog al cual se le adicionan 0.1 mg/l de ácido naftalenacético, 5.0 mg/l de 6-Bencil adenina, 30,000 mg/l de sacarosa y 2,000 mg/l de agar-agar.

En la fase de enraizamiento se emplea el medio Murashigue y Skoog al cual se le agregan 170 mg/l de NaH_2PO_4 , 20,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar-agar.

En la fase de adaptación y desarrollo en suelo se recomienda el empleo de las mezclas N^o1 y N^o6, enlistadas en la sección VIII.4.

Condiciones de "incubación" para cada una de las etapas: Tanto para la fase de multiplicación como la de enraizamiento "in vitro" la intensidad luminosa debe ser de 2500 a 3000 lux, el fotoperiodo de 12 hrs luz y la temperatura de 23 a 25^oC.

En la fase de adaptación y desarrollo en suelo es importante mantener a las plantas en microambientes como los descritos en la sección X.10 figuras 27 y 28.

XI.1'. MICROPROPAGACION DE VIOLETA AFRICANA

Explante: Fragmentos de pecíolo de 2 mm de espesor. La manera de obtenerlos se ilustra en la figura 5 sección V.6.

Desinfección de los explantes: Para la esterilización de este tipo de explante emplear el método N^o1 sección V.5. Realizar primero la esterilización de los pecíolos y después disectar los explantes.

Etapas del proceso: En la micropropagación de violetas africanas a partir de fragmentos de pecíolo son necesarias dos etapas "in vitro".

- 1) Etapa de multiplicación.
- 2) Etapa de enraizamiento.

La etapa de multiplicación comprende de la primera a la octava semana. La etapa de enraizamiento abarca de la octava a la décimosexta semana. La etapa de adaptación y desarrollo en el suelo vá de la décimosexta a la vigésimo quinta semana.

Medio de cultivo empleado en cada etapa: El medio de cultivo empleado tanto en la etapa de multiplicación como en la de enraizamiento es el de --- Murashigue y Skoog al cual se le adicionan ácido naftalenacético 0.1 mg/l, 6-Bencil adenina 5.0 mg/l, sacarosa 30,000 mg/l y agar-agar 8,000 mg/l. El pH se ajusta a 5.6.

Para la etapa de adaptación y desarrollo en el suelo se recomienda el empleo de las mezclas N^o1 y 6 enlistadas en la sección VIII.4.

Condiciones de "incubación" para cada una de las etapas: Para la etapa de multiplicación es requerida una intensidad luminosa de 1000 lux, una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de iluminación/oscuridad de 16/8 h.

En la etapa de enraizamiento la intensidad luminosa debe reducirse a -

800 lux para inducir la etiolación de las plantas y acelerar el enraizamiento; el fotoperiodo, deberá ser 12 h luz y 12 h de obscuridad y la temperatura de 25°C.

La etapa de adaptación a suelo puede ser realizada con adaptaciones para la generación de microambientes como las mencionadas en la sección X.10 figuras 27 y 28.

Observaciones: Este sistema de micropropagación puede ser complementario al de explante de hoja, dando como resultado un aprovechamiento mas integral de las hojas de Violeta Africana en un programa masivo de multiplicación.

XI.2. MICROPROPAGACION DE TABACO

Explante: Porciones de tallo de 3 a 5 mm de espesor, procedentes de plantas recién germinadas y de 25 cm de altura o bien, de plantas adultas. La manera de obtener los explantes de tallo se explica en la sección V.6 y se ilustra en la figura 6.

Desinfección de la superficie de los explantes: Para la esterilización de este tipo de explantes se recomienda el método N^o2 mencionado en la sección V.5. La disección de los explantes se realiza una vez esterilizadas la superficie de las porciones donadoras.

Etapas del proceso: La micropropagación del tabaco involucra 3 etapas "in vitro" mas la fase de adaptación a suelo.

Las etapas "in vitro" son:

- 1) Etapa de callogénesis..
- 2) Etapa de embriogénesis.
- 3) Etapa de diferenciación y enraizamiento.

Medios empleados para cada una de las etapas: En la etapa de callogénesis se emplea el medio de Murashigue y Skoog al cual se le añaden 1.0 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 0.03 mg/l de cinetina, 30,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar-agar. El pH se ajusta a 5.6.

En la etapa de embriogénesis el medio utilizado es el de Murashigue y Skoog al cual se le adicionan 1 mg/l de ácido indol-3-acético, 3 mg/l de cinetina, 30,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg de agar-agar. El pH se ajusta a 5.6.

El enraizamiento "in vitro" se lleva a cabo en el medio de Murashigue y Skoog al cual se le agregan 20,000 mg/l de sacarosa, 8,000 mg de agar y - el pH se ajusta a 5.6.

El proceso de adaptación a suelo se puede realizar sobre la mezcla N^o2 mencionada en la sección VIII.4.

Condiciones de "incubación" para cada una de las etapas: Para la fase de calogénesis se requiere de una iluminación de 1000 lux, un fotoperiodo de 12 h luz y una temperatura de 24 °C.

Las etapas de embriogénesis y enraizamiento se realizan bajo las siguientes condiciones.

Iluminación de 8,000 lux, fotoperiodo de 16 h luz y 24 °C de temperatura.

La adaptación a suelo se puede realizar empleando cualquiera de los métodos explicados en la sección X.10 figuras 27 y 28.

XI.3. MICROPROPAGACION DE ROSA

Explante: Yema axilar con porción de tallo de aproximadamente 1 cm de longitud. La forma de obtener el explante se explica en la sección V.6 y se ilustra en la figura 1.

Desinfección de los explantes: La desinfección de los explantes deberá hacerse con el método N^o2 mencionado en la sección V.5.

Las porciones donadoras se cortarán a la mitad de los entrenudos para obtener porciones de tallo de 5-6 cm de largo, debiéndose encontrar una yema axilar a la mitad de cada segmento (esterilizar estas porciones).

Etapas del proceso de micropropagación: La micropropagación de rosa por medio de este tipo de explante comprende 2 etapas "in vitro" a saber:

- 1) Etapa de proliferación.
- 2) Etapa de enraizamiento.

En la etapa de proliferación se induce a la yema a generar de 4 a 6 brotes y a la sección anexa de tallo a formar callosidad, de la cual posteriormente se generarán las raíces.

Esta etapa abarca de la primera a la sexta semana.

La etapa de enraizamiento se lleva a cabo de la sexta a la décimasegunda semana. En esta fase se induce la formación de raíces a partir del callo generado en la fase de multiplicación.

Medio de cultivo empleado en cada fase: Para la fase de multiplicación el medio de cultivo utilizado es el de Murashige y Skoog complementado con los siguientes compuestos: 6-bencil aminopurina 2.0 mg/l, ácido naftalenacético 0.1 mg/l.

En la etapa de enraizamiento los brotes producen raíces rápidamente al

ser transplantados al medio de Murashigue y Skoog a 1/4 de su concentración y sin añadirse ninguna hormona.

Los brotes enraizados "in vitro" son transferidos a la mezcla N^o 4 6 6 mencionada en la sección VIII.4 para proseguir con su desarrollo en invernadero.

Condiciones de "incubación" para cada una de las etapas: Para las fases de multiplicación y enraizamiento "in vitro" son necesarias las siguientes condiciones: 20,000 lux de intensidad luminosa, 22 a 25 °C y un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

En la etapa de adaptación a suelo se recomienda el empleo del sistema de macetas con capucha plástica (sección X.10 figura 27).

XI.3'. MICROPROPAGACION DE ROSA

Explante: Yemas apicales caulinares (ver sección V.5, figura 1 para la forma de obtener el explante).

Desinfección de los explantes: La esterilización de la superficie de los explantes deberá realizarse con el método N°2 mencionado en la sección V.5.

Etapas del proceso de micropropagación: Al igual que el proceso de micropropagación de rosa por medio de yemas axilares todo el proceso comprende 2 etapas "in vitro" y la fase de adaptación a suelo.

Las dos etapas "in vitro":

- 1) Etapa de multiplicación.
- 2) Etapa de enraizamiento.

La etapa de multiplicación se realiza en un total de 8 a 12 semanas, mientras que la etapa de enraizamiento se lleva a cabo en 6 semanas más.

Medio de cultivo empleado para cada una de las etapas: La fase de multiplicación "in vitro" se realiza sobre el medio de Murashigue y Skoog adicionando 3.0 mg/l de 6-bencil adenina y 0.5 mg/l de ácido indolacético, 30,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar-agar.

La etapa de enraizamiento se lleva a cabo en el medio de Murashigue y Skoog complementado con 0.5 mg/l de ácido indolacético, 20,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar.

La adaptación a suelo se debe hacer sobre la mezcla N°4 ó 6 (sección VIII.4).

Condiciones de "incubación" para cada una de las etapas: En la fase de multiplicación se recomienda una intensidad luminosa de 1,500 a 2,000 lux, una

temperatura de 26 °C y el fotoperíodo debe ser de 16 h luz.

En la etapa de enraizamiento se debe dar una iluminación de 10,000 lux y, mantener la temperatura en un rango de 24 a 28 °C bajo un fotoperíodo de 12 h luz. Para la adaptación en suelo se debe proporcionar a las plantas una intensidad luminosa de 10,000 a 12,000 lux, una temperatura de 24-28 °C y una humedad relativa del 80-85%, empleando la alternativa propuesta en la figura 27 de la sección X.10.

XI.4. MICROPROPAGACION DE DURAZNO Y CHABACANO

Explante: Embriones sin porciones de cotiledones.

La forma de obtener este tipo de explantes se explica en la sección V.6.5 y se ilustra en la figura 8.

Para la desinfección de la almendra emplear el método N^o3 enlistado en la sección V.5.

Etapas del proceso: La micropropagación por medio de embriones puede comprender dos alternativas:

- 1.- Un embrión una planta.
- 2.- Un embrión varios brotes.

En la primera alternativa de un embrión se obtiene directamente una planta y el proceso comprende una sola etapa. En la segunda alternativa de un embrión se obtienen varios brotes y este proceso comprende las siguientes fases "in vitro":

- 1) Multiplicación.
- 2) Enraizamiento.

La fase de multiplicación abarca de la primera a la octava semana y la fase de enraizamiento de la octava a la décimosegunda semana.

Medios de cultivo empleados en cada una de las fases: Para la micropropagación de estas especies por la primera alternativa se debe utilizar el medio de Murashigue y Skoog adicionando 300 ml/l de agua de coco, 15,000 mg/l de sacarosa y agar al 8%.

Las plantas deben ser adaptadas a suelo empelando la mezcla N^o1 mencionada en la sección VIII.4.

Para la producción de plantas de durazno y chabacano por la segunda alternativa se emplea el medio de Murashigue y Skoog para la fase de multiplicación al cual se le añades 5.0 mg/l de 6-bencil adenina, 0.5 mg/l de ácido naftalenacético, 30,000 mg de sacarosa, 8,000 mg/l de agar y 150 ml/l de agua de coco.

En la fase de enraizamiento "in vitro" se emplea el medio de Murashigue y Skoog al cual se le agregan 200 ml/l de agua de coco, 15,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar-agar.

Para la fase de adaptación a suelo se recomienda el empleo de las alternativas N^o27 y N^o28 enlistadas en la sección X.10.

Condiciones de "incubación para cada una de las fases. Para la fase de multiplicación se requiere de una intensidad luminosa de 1,500 lux, un fotoperíodo de 10 h luz y una temperatura de 22-25 °C.

Para la etapa de enraizamiento "in vitro" la intensidad luminosa debe ser de 5,000 lux, el fotoperíodo de 12 h y la temperatura de 28°C.

En la fase de adaptación a suelo se recomienda emplear macetas con capucha plástica (ver sección X.10, figura 27).

XI.5. MICROPROPAGACION DE ZANAHORIA

Explante: Porciones de raíz.

Las precauciones y la manera de obtener este tipo de explante se especifican en la sección V.6 figura 11.

Desinfección de los explantes. El desinfectado de la superficie de raíz de be hacerse con el método N^o2 mencionado en la sección V.5.

La disección de las porciones donadoras debe hacerse antes de disectar los explantes.

Etapas del proceso. En la producción de plantas de zanahoria se induce al explante a la producción de callo, posteriormente a la de embriones y por último a la diferenciación y enraizamiento; de aquí que las fases que integran este proceso sean:

- 2) Embriogénesis.
- 3) Organogénesis y enraizamiento.

Medios empleados para cada una de las etapas. Para la etapa de callogénesis el medio empleado es el de Murashigue y Skoog al cual se le añaden 1.0 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 0.03 mg/l de cinetina, 30,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar-agar.

En la inducción a la formación de embriones se emplea el medio Murashigue y Skoog al cual se le adicionan 30,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar-agar.

En la etapa de organogénesis y enraizamiento se emplea el medio de Murashigue y Skoog el cual se complementa con 15,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar-agar.

Condiciones de "incubación" para cada una de las etapas. En las fases de -

callogenesis y embriogenesis se requiere de una intensidad luminosa de 100 lux, un fotoperíodo de 14 h luz y una temperatura de 25°C.

Para la etapa de organogenesis y enraizamiento se necesita de una intensidad luminosa de 3,000 lux, un fotoperíodo de 14 h luz y una temperatura de 25°C.

XI.6. MICROPROPAGACION DE CLAVEL

Explante. El clavel se micropaga por medio de meristemas ya que de esta manera se obtienen plantas libres de enfermedades.

El método para obtener este tipo de explantes se explica e ilustra en la sección V.6, figuras 2 y 3.

Desinfección de los explantes. Para llevar a cabo la esterilización de la superficie de las porciones donadoras de los explantes emplear el método - N^o1 expuesto en la sección V.5.

Para facilitar el lavado y desinfectado de las yemas axilares retirar las hojas cortándolas lo más próximo al nudo.

Etapas del proceso. Para garantizar al máximo la producción de plantas libres de virosis es necesario sembrar exclusivamente el meristemo, lo cual implica la necesidad de una fase de adaptación a condiciones de cultivo "in vitro". Posteriormente los explantes pasarán a la fase de multiplicación y enraizamiento "in vitro", después de las cuales proseguirán la etapa de adaptación a suelo.

Medios empleados para cada una de las fases. En la etapa de adaptación al cultivo "in vitro" se debe emplear el medio de Murashigue y Skoog al cual se le adicionan 30,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar. El pH se le ajusta a 5.6.

Para la etapa de multiplicación se puede emplear tanto un medio sólido como un medio líquido teniendo como base la fórmula de Murashigue y Skoog complementada con 0.2 mg/l de ácido naftalenacético, 2.5 mg/l de cinetina, 30,000 mg/l de sacarosa y en el caso de medios sólidos 8.0 gr/l de agar. - El pH se ajusta a 5.5.

La fase de enraizamiento se lleva a cabo en el medio de Murashigue y Skoog al cual se le añaden 1.0 mg/l de ácido indol butírico, 20,000 mg/l

de sacarosa y 8,000 mg/l de agar; el pH se ajusta a 5.5.

Para la adaptación a suelo se pueden emplear la mezcla N^o5 y la N^o4 - mencionadas en la sección VIII.4.

Condiciones de "incubación" para cada una de las etapas. Para la adaptación a cultivo "in vitro" la intensidad luminosa debe ser de 1000 lux, el fotoperíodo de 12 h luz y la temperatura de 22°C.

En la fase de multiplicación y enraizamiento "in vitro" la intensidad luminosa deberá aumentarse a 10,000 lux, y el fotoperíodo deberá ser de 16 h luz y la temperatura de 22°C.

Para la adaptación a suelo se recomienda el empleo de una cámara nebulizadora como la ilustrada en la figura 29 de la sección X.10, para inducir la producción de raíces.

XI.7. MICROPROPAGACION DE CRISANTEMO

Explante. Al igual que para clavel y fresa, en la micropropagación de crisantemos se emplea el meristemo, pues una de las metas perseguidas es la producción masiva de plantas libres de virosis. La manera de obtener este explante se ilustra en la figura 4 de la sección V.6.

Desinfección de la superficie de las porciones donadoras de explante. Debido a la gran cantidad de tricomas que poseen las yemas de crisantemo, se recomienda un cuidadoso lavado y esterilizado de las porciones donadoras de explantes, empleando el método N^o2 mencionado en la sección V.5.

Etapas del proceso. La micropropagación de crisantemo puede hacerse por dos rutas principales y cuyas etapas son las siguientes:

Ruta organogénica

- 1) Etapa de desarrollo y enraizamiento "in vitro".
- 2) Etapa de adaptación a suelo.

Ruta embriogénica

- 1) Etapa de multiplicación "in vitro".
- 2) Etapa de diferenciación y enraizamiento "in vitro".
- 3) Etapa de adaptación a suelo.

Medios de cultivo para cada una de las etapas.

Ruta organogénica. El medio empleado para la producción de plantas de crisantemo por ésta ruta es el de Murashigue y Skoog al cual se le agregan 200 ml/l de agua de coco, 30,000 mg/l de sacarosa, 0.1 mg/l de ácido naftalenacético y 8,000 mg/l de agar. El pH se ajusta a 5.6.

Ruta embriogénica. Para la etapa de multiplicación "in vitro" se emplea el medio de Murashigue y Skoog al cual se le agregan 150 ml/l de agua

de coco, 0.5 mg/l de ácido naftalenacético, 5.0 mg/l de 6-bencil adenina, 30,000 mg/l de sacarosa y 8,000 mg/l de agar. El pH se ajusta a 5.6.

Para la etapa de diferenciación y enraizamiento "in vitro" se utiliza el medio de Murashigue y Skoog adicionado con 20,000 mg/l de sacarosa, 8000 mg/l de agar y el pH se ajusta a 5.6.

Para la fase de adaptación a suelo se recomienda el empleo de la mezcla N^o 4 6 5 mencionada en la sección VIII.4.

Condiciones de "incubación" para cada una de las fases.

Ruta organogénica. Para la etapa de desarrollo y enraizamiento "in vitro" se requiere de una intensidad luminosa de 3,000 lux, un fotoperíodo de 16 h luz y una temperatura de 24^oC.

Ruta embriogénica. En la etapa de multiplicación "in vitro" se necesita suministrar a los explantes una intensidad luminosa de 1,500 lux, un fotoperíodo de 16 h luz y una temperatura de 22 a 24^oC.

En la fase de diferenciación y enraizamiento "in vitro" los explantes requieren de 8,000-10,000 lux de intensidad luminosa, 16 h luz de fotoperíodo y 22-24^oC de temperatura.

Para las plantas obtenidas por cualquiera de las dos rutas se recomienda que la adaptación a suelo se realice en un ambiente de nebulización o bien empleando el sistema de macetas con capuchas plásticas, como la ilustrada en la sección X.10 figura 27.

XI.8. MICROPROPAGACION DE FRESA

Explante. La fresa es una especie que se micropropaga por medio de meristemas pues el principal objetivo es el de obtener plantas libres de patógenos.

La manera de obtener este explante se explica e ilustra en la sección V.6 figura 4 (la apariencia y disección de estos meristemas es muy similar a los de crisantemo).

Desinfección de los explantes. Para la esterilización de la superficie de las porciones donadoras de explante de fresa se recomienda emplear el método N^o2 mencionado en la sección V.5.

Etapas del proceso. La micropropagación de fresa comprende las siguientes etapas:

- 1) Multiplicación "in vitro".
- 2) Enraizamiento "in vitro".

La fase de adaptación a suelo y desarrollo en invernadero solo completarán el primer ciclo de multiplicación, ya que posterior a éste vendrán dos fases de producción más para alcanzar la calidad certificada, estas fases se deberán realizar en condiciones de cultivo bajo cubierta plástica (consultar la sección IX.2).

Medios de cultivo empleados en cada fase. Para la etapa de multiplicación "in vitro" se deberá emplear el medio de cultivo listado en el apéndice 1 al cual se le deberán agregar las siguientes sustancias: ácido indolbutírico 1.0 mg/l, 6-bencil aminopurina 3.0 mg/l, glucosa 20 gr/l, agar 8.0 mg/l y ajustar el pH a 5.6.

Para la fase de enraizamiento se deberá emplear el mismo medio pero suprimiendo la 6-bencil aminopurina.

Para la etapa de adaptación a suelo se recomienda el uso de las mezclas N°1 ó 6 enlistada en la sección VIII.4.

Condiciones de "incubación" para cada una de las fases. En las fases de multiplicación y enraizamiento se requiere de las siguientes condiciones: - 1000 lux de intensidad luminosa, un fotoperíodo de 16 h luz y una temperatura de 25°C.

Para la etapa de adaptación a suelo se necesita una cobertura plástica que proteja a las plantas de la desecación o bién, debido a la gran escala en que usualmente se produce esta planta, se recomienda el empleo de una cámara nebulizadora como la que se ilustra en la figura 29 de la sección X.10.

APENDICE 1. Medio de Boxus.

Base Knop modificado para fresa.

Sol. A

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000.000 mg/l.
KNO_3	1000.000 mg/l.
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	250.000 mg/l.
KH_2PO_4	250.000 mg/l.

Sol. A'

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/l.
KI	0.830 mg/l.

Sol. B

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250 mg/l.
H_3BO_3	6.200 mg/l.

Sol. C

MnSO_4	17.000 mg/l.
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10.600 mg/l.
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/l.

Sol. F

$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27.800 mg/l.
Na_2 EDTA	37.300 mg/l.
Inositol	100.000 mg/l.
Tiamina	0.100 mg/l.
Acido Nicotínico	0.500 mg/l.

Piridoxina	0.500 mg/l.	
Glicina	2.000 mg/l.	
Sacarosa	20.000 g/l.	6
Glucosa	40.000 g/l.	
AIB	1.000 mg/l.	
6 BAP	1.300 mg/l.	
Agar-agar	8.000 g/l.	

QUINTA PARTE

CAPITULO XII

BIBLIOGRAFIA

XII.1. BIBLIOGRAFIA CITADA.

XII.2. BIBLIOGRAFIA GENERAL.

XII.3. BIBLIOGRAFIA ESPECIALIZADA.

XII.1. BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Adams, A.N., (1972). "An improved medium for strawberry meristem culture". *J. Hort. Sci.*, 47: 263-264.
2. Birkley, P.C., B.H. Mc Cown and A.C. Hildebrand. (1978). *Hort Science*, 13(1): 37-38.
3. Cooke, R.C. (1977). "Tissue culture propagation of African Violets". *Hort Science*, 12(6): 549. *
4. Cooke, R.C. (1977). "The use of an agar substitute in the initial growth of Boston ferns in vitro". *Hort Science* 12, 339.
5. Davis, M.J., R. Baker and J.J. Hanan. (1977). "Clonal multiplication of Carnation by micropropagation". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 107(1): 48-53.
6. Devlin, R.M. (1976). "Fisiología Vegetal". Ed. Omega. Barcelona, España.
7. Dodds, J.H. and L.W. Roberts. (1985). "Experiments in plant tissue Culture". Cambridge University Press. Second Edition.
8. Echlin, P., (1968). "Pollen. *Scientific American*". 218(4): 80-90.
9. Esau, K., (1965). "Plant Anatomy". John Wiley & Sons. Second Edition.
10. Gurdon, J.B. (1968). "Transplanted nuclei and cell differentiation". *Scientific American*. 219-6: 24-35.
11. Hartman, H.T., D.E. Kester. (1975). "Propagación de plantas principios y prácticas". CECSA. México.

12. Holley, W.D. and R. Baker. (1963). "Carnation production". Colorado State University. pp. 23-28.
13. Hurtado, M.D., Merino, M.M.E. (1987). "Cultivo de Tejidos Vegetales". Trillas, México.
14. Hyndman, S.E., P.M. Hasegawa and R.A. Bressan. (1982). "Stimulation of root initiation from cultured rose shoot through the use of reduced concentration of mineral salts". Hort Science 17(1): 82-83.
15. Jacobs, W.P. (1979). "Plant hormones and plant development. Cambridge University Press.
16. Klein, R.M., and Klein, D.T. (1970). "Research methods in plant science". Garden City, N.Y.: Natural History Press.
17. Lehninger, A.L. (1970). "Biochemistry". Worth Publishers Inc. Second Edition.
18. Morel, G., and Muller, J.R. (1964). "La culture in vitro du méristème apical de la pomme de terre". C.R. Acad. Sci. (Paris). 258: 5250-5252.
19. Murashigue, T., and F. Skoog. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture". Physiologia Plantarum. 15: 473-479.
20. Salisbury, F.B. (1957). "Plant Growth Substances". Scientific American (Reprinted from).
21. Skirvin, R.M., and M.C. Chu. (1979). "In vitro propagation of (Forever yours) Rose". Hort Science. 14(5): 608-610.
22. Start, N.D., and B.G. Cumming. (1976). "In vitro propagation of Saintpaulia ionantha Wendl". Hort Science. 11(3): 204-206.

XII.2. BIBLIOGRAFIA GENERAL

1. Alpi, A., y Tognoni, F. (1983). "Coltivazione in serra". Edagricole. Bologna. Italia.
2. Butler, W.L., and R.J. Downs. (1960). "Light and plant development". Reprinted from Scientific American.
3. Naylor, A.W. (1952). "The control of flowering". Reprinted from Scientific American.
4. Salisbury, F.B. (1958). "The flowering process". Reprinted from Scientific American.
5. White, P.R. (1963). "The cultivation of animal and plant cells". The Ronald Press Company. N.Y.

XII.3. BIBLIOGRAFIA ESPECIALIZADA

1. Adams, R.N., S.S. Koenigsberg and R.W. Langhans. (1979). "In vitro propagation of the Butter Wort Pinguicola moranensis H.B.K.". Hort Science. 14(6): 701-702.
2. Adams, II.R.N., S. Koenigsberg and R.W. Langhans. (1979). "In vitro propagation of Cephalotus follicularis (Australian Pitcher plant)". Hort Science. 14(4): 512-513.
3. Boxus, Ph. (1974). "The production of strawberry plants by in vitro micropropagation". J. Hort Sci. 49: 209-210.
4. Boxus, Ph., M. Quorin and J.M. Laine. (1977). "Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture". Reinert and Y.P.S. Bajaj. Chap. 7.
5. Broome, O.C. and R.H. Zimmerman. (1978). "In vitro propagation of Blackberry". Hort Science. 13(2): 151-153.
6. Chaturvedi, H.C., A.K. Sharma and R.N. Prasad. (1978). "Shoot apex culture of Bougainvillea glabra Magnifica". Hort Science. 13(1): 36.
7. Chua, B.U., J.T. Kunisaki and Y. Sagawa. (1981). "In vitro propagation of Dracaena marginata (tricolor)". Hort Science. 16(4): 494.
8. Fannesbech, A. and M. Fannesbech. (1980). "In vitro propagation of Monstera deliciosa". Hort Science. 15(6): 740-741.
9. Gautheret, M.R. (1977). "Histophysiologie Végétale. Etude comparative de la multiplication in vitro de deux especes horticoles d' Anthurium". C.R. Acad. Sci. Paris. T. pp. 284.
10. Handley, L.W. and O.L. Chamblis. (1979). "In vitro propagation of

- Cucumis sativus L.". Hort Science. 14(1): 22-23.
11. Hasegawa, P.M. (1979). "In vitro propagation of rose". Hort Science. 14(5): 610-612.
 12. Hasegawa, P.M., T. Murashigue and F.H. Takatori. (1978). "Propagation of Asparagus through shoot apex culture". J. Amer. Soc. Hort Sci. 98(2): 143-148.
 13. Henny, R.J. (1978). "In vitro propagation of Peperomia (Red Ripple) from leaf discs". Hort Science. 13(2): 150-151.
 14. Hosoki, T. and Y. Sagawa. (1972). "Clonal propagation of Ginger Zingiber officinale Roscoe through tissue culture". Hort Science. 12(5): 451-452.
 15. Hosoki, T. and Asahira. (1980). "In vitro propagation of Narcissus". Hort Science. 15(5): 602.
 16. Hui, L.H. and S.Y. Zee. (1981). "In vitro propagation of Peperomia viridis using medium supplemented with Ginseng Powder". Hort Science. 16(1): 86-87.
 17. Johnson, B.B. (1978). "In vitro propagation of Gloxinia from leaf explants". Hort Science. 13(2): 149-150.
 18. Johnson, B.B. and E.D. Mitchell, Jr. (1979). "In vitro propagation of broccoli from leaf stem and leaf rib explants". Hort Science. 14(1): 246-247.
 19. Kunisaki, J.T. (1980). "In vitro propagation of Anthurium andreanum Lindl.". Hort Science. 15(4): 508-509.
 20. Litz, R.E. and R.A. Conover. (1978). "In vitro propagation of papaya".

Hort Science. 13(3): 241-242.

21. Meyer, Jr. M.M. (1980). "In vitro propagation of Hosta sieboldiana". Hort Science. 15(6): 737-738.
22. Mikkelsen, E.P. and K.C. Sink Jr. (1978). "In vitro propagation of Rieger, Eliator, Begonias". Hort Science. 13(3): 242-244.
23. Norton, M.E. and A.A. Boe. (1982). "In vitro propagation of ornamental rosaceous plants". Hort Science. 17(2): 190-191.
24. Pierik, R.L.M., H.H.M. Steegmans and J.A.J. Van der Meys. (1974). "Plantlet formation in callus tissue of Anthurium andreanum Lind". Scientia Horticulturae. 2: 193-198.
25. Pierik, R.L.M. and H.H.M. Steegmans. (1976). "Vegetative propagation of Anthurium scherzerianum Schott through callus culture". Scientia Horticulturae. 4: 291-292.
26. Pierik, R.L.M. (1976). "Anthurium andreanum plantlets produced from callus tissue cultivated in vitro". Physiol. Plant. 37: 80-82.
27. Poole, R.T. and C. Conover. (1983). "Establishment and growth of in vitro cultured Dieffenbachia". Hort Science. 18(2): 185-187.
28. Rodriguez, R. (1982). "Callus initiation and root formation from in vitro cultured of walnut cotyledons". Hort Science. 17(2): 195-196.
29. Schnabelrauch, L.S. and K.C. Sink. (1979). "In vitro propagation of Phlox subulata and paniculata". Hort Science. 14(5): 607-608.
30. Smith, R.H. and A.E. Nightingale. (1979). "In vitro propagation of Kalanchoe". Hort Science. 14(1): 20.
31. Tabachnick, L. and D.E. Kester. (1977). "Shoot culture of almond and

- almond peach hibrid clones in vitro". Hort Science. 12(6): 245-247.
32. Werner, E.M. and A.A. Boe. (1980). "In vitro propagation of Malling Apple root stock". Hort Science. 15(4): 509-510.
 33. Won Lee and C.M. Skirvin., A.L. Soltero and J. Janick. (1977). "Tissue culture of Salpiglossis sinuata L. from leaf discs. Hort Science. 12(6): 547-549.
 34. Zepeda, C. and Y. Sagawa . (1981). "In vitro propagation of Pineapple". Hort Science. 16(4): 495.