

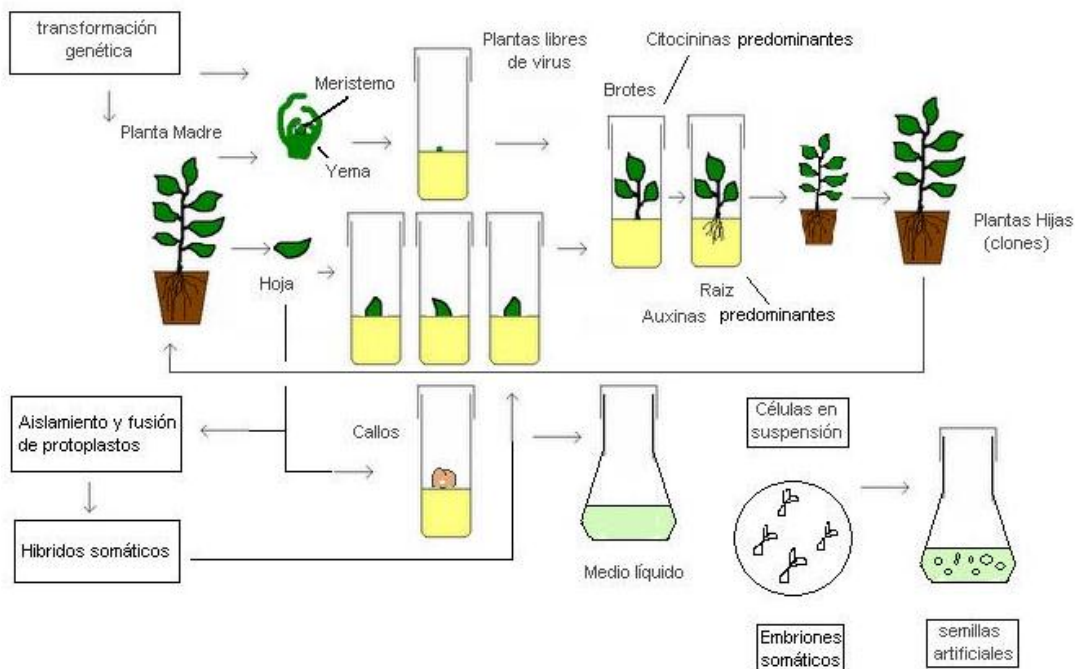
MICROPROPAGACIÓN VEGETAL

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica en la cual órganos o pequeñas secciones de tejido, son disectados de una planta donadora y cultivados asépticamente en un medio nutritivo.

Por manipulación de la composición química del medio y de otros parámetros ambientales, el crecimiento y el desarrollo de los tejidos puede ser dirigido en diferentes formas: a) Biosintéticos, mediante los cuales es posible la síntesis y/o transformación de metabolitos secundarios o b) Morfogenéticos, por lo que es posible inducir procesos de dediferenciación y diferenciación celular; lo cual es aprovechado para obtener células individuales aisladas o más comúnmente, crecimientos amorfos de células en activa división celular (callos) y llegar a inducir su desarrollo hasta plantas completas (regeneración).

Con base en la teoría celular, la totipotencialidad de las células hace posible que, teóricamente, cualquier célula pueda regenerar un nuevo individuo, ya que en la práctica, los tejidos inmaduros, meristemos y embriones han resultado con mayor poder regenerativo que otros.

En la respuesta de los tejidos, están implicados varios factores: genético, fisiológico y bioquímico; requerimientos nutritivos como sales orgánicas (macro y micronutrientes), vitaminas, aminoácidos y de manera muchas veces fundamental, los reguladores del crecimiento como son auxinas, citocininas y menos comúnmente giberelinas.



En términos generales, la técnica del cultivo de tejidos vegetales es relativamente sencilla. Se fundamenta en incubar pequeños trozos de semillas o tejido, en un medio de cultivo estéril conteniendo los nutrimentos, vitaminas y hormonas necesarios para estimular y soportar su crecimiento; pudiendo obtenerse callos, raíces, tallos, hojas y flores o plantas completas.

El empleo de un medio químicamente definido puede no bastar para lograr una respuesta deseada, siendo en esta circunstancia que se recomienda la adición de complejos orgánicos, como son jugos de frutos: jitomate, piña, verduras y agua de coco verde, entre otros. Los medios pueden contener agar para hacerlos semisólidos o pueden ser líquidos y requerir de agitación continua para mantener la oxigenación y la distribución homogénea de los nutrimentos.

De los diferentes medios de cultivo que existen (Knudson C, White, Vacin y Went), el de Murashige-Skoog (1962) es el más ampliamente usado por los excelentes resultados que brinda. Los componentes principales de este medio son: macro y microelementos, una fuente de carbono, vitaminas, aminoácidos y pH de 5.7-5.8.

Actualmente se cuenta con una serie de modalidades de esta técnica como son: propagación vegetativa, obtención de plantas libres de virus, transformación de células carentes de pared celular (protoplastos), obtención de líneas puras a través del cultivo de granos de polen para la obtención de plantas haploides, selección de células individuales (en medios líquidos con agentes mutagénicos), fusión de especies diferentes para la generación de híbridos somáticos.

El uso del cultivo de tejidos vegetales para la multiplicación y preservación de genotipos valiosos en bancos de germoplasma, formando clones, con variedades o especies importantes a nivel económico, es ya un hecho, por lo que la técnica ofrece una gran cantidad de posibilidades importantes, como apoyo a la investigación en ciencia básica trascendiendo al área aplicada.

OBJETIVO:

Observar, a partir de la resiembra de plántulas o secciones de *Dionaea muscipula* y/o *Drosera capensis*, la formación de plantas completas por cultivo *in vitro*.

MATERIAL:

Una cámara de siembra (flujo laminar), bisturí, mechero de alcohol, dos cajas de Petri estériles, 1 frasco Gerber estéril, un aspersor de 200 ml con alcohol al 70 %, plantas carnívoras establecidas en cultivo *in vitro*, unas pinzas de disección largas y frascos Gerber con medio de cultivo.

El medio basal utilizado en este caso está constituido por las sales minerales del medio Murashige y Skoog (1962), adicionado con vitaminas y reguladores del crecimiento vegetal (apéndice anexo).

MÉTODO:

1. Lavar las manos y antebrazos perfectamente con agua y jabón.
2. Una vez dentro del cuarto de siembra, colocarse el cubrebocas y limpiar, minuciosamente, las manos y antebrazos con alcohol al 70%.
3. Limpiar la superficie de la cámara de siembra.
4. Limpiar la superficie de frascos y todo el material que se vaya a usar dentro de la campana de flujo laminar.
5. Encender el mechero (posiblemente ya esté encendido). Tener cuidado de no rociar o derramar alcohol sobre la flama
6. Coloque los fragmentos, uno o dos por frasco, con la sección del tallo en dirección del medio, enterrándolos ligeramente.
7. Flamee la tapa del frasco y ciérrelo nuevamente después de cada trozo sembrado.
8. Incube sus tejidos bajo luz fluorescente y condiciones controladas (pregunte por los valores de temperatura y fotoperiodo a los cuales quedarán los frascos).
9. Realice observaciones periódicas de sus frascos (por lo menos una vez a la semana) y anote los cambios que observe (también puede tomar fotos).
10. En la última semana de octubre se entregará el reporte correspondiente.

RESULTADOS:

- Observe la presencia de contaminación y señale el porcentaje de frascos de su equipo, que fueron desechados por ésta razón.
- Señale el porcentaje de frascos, del total de frascos sembrados por su equipo, en los que hubo un crecimiento favorable de las plántulas.
- A través de esquemas o imágenes, registre los cambios morfológicos semanales que se dieron en las plántulas, desde que fueron sembradas hasta la segunda semana de octubre.

CUESTIONARIO:

1. ¿Cuál es la importancia de mantener un pH constante en un medio de cultivo?
2. ¿Qué ocasiona la presencia de fenoles en cultivo de tejidos y qué se usa para evitar su efecto?
3. ¿De qué parte de la planta se pueden obtener inóculos y qué factores influyen en el desarrollo de este?
4. ¿Qué se entiende por “callo” en cultivo de tejidos vegetales?
5. En el medio de cultivo que utilizó, ¿Cuáles son los componentes que se agregaron como fuente de carbohidratos y cuáles como reguladores de crecimiento?

BIBLIOGRAFÍA:

Dodds, J. H. y Loring, W. R.,1982. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, Cambridge.

Street, H. E. (ed),1973. Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Pub., Oxford.

Hurtado, D. y H. Merino. 1985. El cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, Méx.

Loyola,V. y M. Robert. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. CONACYT, Méx.

Murashige, T. y T. Skoog.1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology, P.,15:473-497.

APÉNDICE

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE Murashige y Skoog (1962)

SOLUCIÓN A (elementos mayores)	
Compuesto	Pesar en gramos
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3.7
KH ₂ PO ₄	1.7
CaCl ₂ . 2H ₂ O	4.4
KNO ₃	19.0
NH ₄ NO ₃	16.5

Colocar en orden los compuestos, agregando inicialmente un poco de agua a un vaso de un litro, agitando constantemente, finalmente afore a 1 litro de solución y guarde en frío

SOLUCIÓN B	(elementos menores)
Compuesto	Pesar en miligramos
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ . 4H ₂ O	2000
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	830
KI	83
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	25 ml*
CuSO ₄ . 5H ₂ O	2.5 ml*
CoCl ₂ . 6H ₂ O	2.5 ml*

Seguir el mismo procedimiento que para la sol. A.

*Se prepara, de cada compuesto, una solución por separado, conteniendo 100 mg del compuesto en 100 ml de agua destilada. De cada solución tomar la cantidad indicada.

Solución C	Na ₂ EDTA	373 mg y	FeSO ₄ .7H ₂ O	278 mg en 100 ml. de agua destilada.
------------	----------------------	----------	--------------------------------------	--------------------------------------

Para preparar el medio finalmente se vierte un poco de agua en un vaso de 1000 ml. y se agrega en orden las siguientes cantidades, agitando constantemente.

Solución A 100 ml.; solución B 10 ml.; solución C 10 ml.; Posteriormente agregar la parte orgánica.

Preparar las siguientes soluciones agregando al medio lo indicado en cada una de ellas.

Elementos orgánicos para el medio Murashige y Skoog 1962:

Factores de crecimiento: agregar 100 mg de Mioinositol

Vitaminas : Glicina 10 mg, Tiamina Hcl 10 mg, Piridoxina 10 mg, Ac. Nicotínico 10 mg disueltos en 10 ml de agua destilada, tomando un ml por cada litro de medio de trabajo.

Hormonas	Concentración	tomar	para un litro de medio:
Ácido Naftalén Acético	1.0 mg/ml	Callo 2 ml	Raíz 1 ml Brotes 0.5 ml
Bencil Adenina	0.5 mg/ml	0.0 ml	0.5 ml 1 ml

Fuente de energía y soporte:

Sacarosa	30 g/l
*Agar	7 g/l

*(agregar después de aforar y ajustar el pH)

Teniendo ya colocadas las cantidades de la parte orgánica en el medio final, aforar éste a 1 l. y ajustar el pH con KOH 1 N ó HCl 1N para llevar lo a 5.7 - 5.9 agregando el agar posteriormente.

Para diluir este último componente es necesario someterlo a calentamiento. Puede ser en una parrilla con agitación, hasta que hierva (tener cuidado porque hace espuma) o en el autoclave, llevándolo a un Kg. de presión, en el momento que se alcanza, se deja enfriar para después servir el medio en los frascos. En una cantidad de 10-12 ml. por frasco, los cuales se tapan y esterilizan a 120°C y 15 Lb de presión por 15 min.

NOTA.

No apresure el enfriamiento de la autoclave, ya que se pueden botar las tapas de los frascos por la ebullición del medio.