CULTIVO IN VITRO DE LAS PLANTAS SUPERIORES

R.L.M. PIERIK

SIB-UCE LABORATORIO DE DIGITALIZACIÓN
Campus Central, calle Jerónimo Leyton y Gatto Sobral
+593 2230757 ext: 808 biblioteca.general@uce.edu.ec
©2022-2024

BASE LEGAL PARA DIGITALIZACIÓN DE LIBROS CON DERECHOS DE AUTOR

El Sistema Integrado de Bibliotecas de la Universidad Central del Ecuador, digitalizará su acervo bibliográfico siempre y cuando sea para fines educativos y de investigación. No se permite la reproducción y distribución para la comercialización directa e indirecta de este.

La digitalización del material bibliográfico se lo realiza de acuerdo al Código Orgánico De La Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación **Art. 212 numeral 9, Literal ii** "(…) Una biblioteca o archivo podrá, además, realizar los siguientes actos (…) La reproducción electrónica y comunicación pública de obras de su colección para ser consultadas gratuita y simultáneamente hasta por un número razonable de usuarios, sólo en terminales de redes de la respectiva institución o para usuarios de esa institución bajo su control, en condiciones que garanticen que no se puedan hacer copias electrónicas de esas reproducciones" y **literal vii** "La reproducción, adaptación, traducción, transformación, arreglo, distribución y comunicación de una obra protegida por derechos de autor o una prestación protegida por derechos conexos, en uno o más formatos accesibles para el uso exclusivo de personas con discapacidad".

Este material se considera un producto intelectual a favor de su autor; por tanto, la titularidad de sus derechos se encuentra protegida por el Código Orgánico De La Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación. La violación a dichos derechos constituye un delito que será responsabilidad del usuario.

Este libro está disponible físicamente en

Biblioteca:

Facultad de Ciencias Agrícolas

Piso:	**Estante:**	**Bandeja:**
PB	02	01

Convenio interinstitucional:

Enlace al catálogo:

FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS

QUITO — ECUADOR

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM POTENTIOR EST SCIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

821.021

B24-B2
cod= 1284

Librería
AGROPECUARIA
Av. 10 de Agosto N22-51 y Ramírez Dávalos. Tel.: 557190
Quito

Para la Facultad de Ciencias Agrícolas de los alumnos de Botánica. 2002-2003

T. Aguilar Castro

CULTIVO IN VITRO DE LAS PLANTAS SUPERIORES

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM SCIENTIARUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM POTENTIOR EST SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

631.52 ID: 14229
P618

R.L.M. PIERIK
Department of Horticulture,
Agricultural University
Wageningen, The Netherlands

CULTIVO IN VITRO DE LAS PLANTAS SUPERIORES

Versión española
de
Luis AYERBE MATEO-SAGASTA
Dr. Ingeniero Agrónomo

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM POCULUM SAPIENTIAE
FUNDADA EN 1620
QUITO

Ediciones Mundi-Prensa
Castelló, 37 • 28001 Madrid

1990

La edición original de esta obra ha sido publicada en inglés con el título
IN VITRO CULTURE OF HIGHER PLANTS
third edition
por MARTINUS NIJHOFF PUBLISHERS, miembro del Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, The Netherlands

© 1987, Kluwer Academic Publishers B. V.
© 1988, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid
Depósito Legal: M-5.859-1990
ISBN: 84-7114-267-8

No se permite la reproducción total o parcial de este libro ni el almacenamiento en un sistema informático, ni la transmisión de cualquier forma o cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia, registro u otros medios sin el permiso previo y por escrito de los titulares del Copyright.

IMPRESO EN ESPAÑA - PRINTED IN SPAIN

artes gráficas palermo, s.l. - palermo, 58 - 28043 madrid

PROLOGO A LA EDICION ESPAÑOLA

Sale a la luz esta edición en castellano de la obra de R.L.M. Pierik: "In vitro culture of higher plants", muy poco tiempo después de la aparición de la versión inglesa. Cuando su cuantiosa información permanece viva, rigurosamente actual, al alcance de nuestra mano para ser utilizada de forma inmediata. Como el propio profesor Pierik indica en su prólogo, se echaba de menos una obra con este contenido, que abarca una doble vertiente; es por un lado un texto de introducción al amplísimo campo del cultivo in vitro de los vegetales superiores, y también un excelente manual para la persona, de cualquier formación, que precise en el laboratorio resolver algún aspecto práctico. Este libro sirve así tanto al profesional o estudiante avanzado, que quiere saber desde un punto de vista teórico qué hay detrás de ese título: "Cultivo in vitro de las plantas superiores", como a la persona que ha entrado ya en contacto directo con este área botánica, y se mueve día a día en el laboratorio, pero precisa tener a mano un libro, que contenga muchos datos claves, que se refiereen al "como hacer" esto y aquello.

Cuando se ha leído detenidamente esta obra, surge en nosotros una idea, que no todos los libros son capaces de producir: se trata de un trabajo de una gran honestidad, en el que el autor entrega con sencillez una rica experiencia, que solo se puede conseguir después de innumerables horas de trabajo paciente en el laboratorio. Este caudal, de precio tan difícil de valorar, pasa sin reservas, a través de sus páginas, al lector, que se beneficia de un maestro amigo, cercano y fácil de comprender. Por otro lado, el libro no se agota en la información directa de sus páginas, ya que en cada uno de sus capítulos se cita una bibliografía abundante y actual.

El cultivo in vitro de las plantas comprende una serie de conocimientos y técnicas relativamente nuevas, dentro de la biología vegetal, sobre todo si consideramos su aplicación práctica en las empresas que se dedican a la mejora genética y producción de plantas, sin embargo tiene ya un gran presente y mayor futuro en las áreas de la silvicultura y cultivos extensivos, y aún más en especial en la horticultura. Precisamente en este área España puede y debe decir mucho en el ámbito de la CEE. Este libro podrá ayudar a muchos lectores a estar a la altura del reto que supone obtener productos de origen vegetal, de forma competitiva, en la economía comunitaria.

Madrid, noviembre de 1989
EL TRADUCTOR

Donación actualmente Botánica del Rugo. Tafur 19-03-003

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

Indice

1. **Prólogo, 13**

2. **Introducción, 15**

   Nociones generales, 15
   Abreviaturas y glosario, 19

3. **Historia, 29**

   Introducción, 29
   Desarrollo en Holanda y otros países, 33

4. **Tipos de cultivo, 35**

5. **Equipo de laboratorio, 37**

   Material, 37
   Cámara de flujo laminar, 39
   Esterilización de los medios nutritivos, 41
      Esterilización por irradiación, 45
      Esterilización por filtración, 45
      Esterilización en la escuela y en el hogar, 46
   Sala de preparación, 47
   Lavado del vidrio, 47
   Los robots en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, 47

6. **Preparación y composición de los medios nutritivos, 49**

   Introducción, 49
   Material de vidrio y plástico, 52
   Preparación, 54
   Composición, 57
      Agua, 57
      Agar, 57
      Azúcar, 63
      Nutrición mineral, 65
      pH, 68
      Potencial osmótico, 69
      Reguladores, 69
      Vitaminas, 78

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FUNDADA EN 1620
QUITO

Otros compuestos, 78
Medios preparados comerciales, 83
Almacenado de los medios nutritivos, 84

7. **Cerrado de los tubos de ensayo y matraces, 85**

8. **Cuidado del material vegetal, 89**

9. **Esterilización del material vegetal, 91**

Introducción, 91
Esterilización química, 92
Cultivos aparentemente estériles, 94
Infecciones internas, 95
Cultivos simbióticos, 96

10. **Aislamiento, inoculación y repicado, 97**

Introducción, 97
Aislamiento, 98
Inoculación, 99
Repicado, 101

11. **Mecanización, 103**

12. **Influencia del material vegetal sobre el crecimiento y desarrollo, 109**

13. **Influencia de los factores físicos sobre el crecimiento y desarrollo, 117**

La cámara de cultivo, 117
Discusión sobre factores físicos y especiales, 120

14. **El traspaso desde el medio nutritivo al suelo, 127**

15. **Ayudas al estudio, 133**

Bibliografía, 133
Sociedades y Asociaciones, 136
Cuaderno de laboratorio, fotografías y diapositivas, 136

16. **Cultivo de embriones, 139**

Introducción, 139
Técnicas, 141
Factores que afectan al éxito del cultivo de embriones, 143
Aplicaciones prácticas, 145

17. **Germinación de semillas de orquídea, 149**

Introducción, 149
Factores que afectan a la germinación y al crecimiento, 155

18. **Propagación vegetativa de las orquídeas, 159**

Introducción, 159
Cultivo de meristemos, 161
Propagación por cultivo de meristemos, 162
Otros métodos de propagación, 165
Variaciones que aparecen durante el cultivo, 166
Aplicaciones prácticas, 167

19. **Producción de plantas libres de enfermedades, 169**

Introducción, 169
Producción de plantas libres de virus, 171
Tratamiento por calor, 171
Cultivo de meristemos, 172
Tratamiento por calor y cultivo de meristemos, 176
Formación de vástagos adventicios, seguida de cultivo de meristemos, 177
Plantas libres de virus obtenidas a partir de callos y protoplastos, 177
Injerto de meristemos sobre patrones (plántulas), libres de virus (micro-injerto), 178
Identificación de los virus, 178
Producción de plantas libres de hongos y de bacterias por cultivo de meristemos, 179

20. **Propagación vegetativa, 181**

Introducción general, 181
Cultivo de segmentos nodales, 188
Método de las yemas axilares, 191
Regeneración de explantos, 197
Introducción, 197
Formación de raíces adventicias, 199
Formación de vástagos adventicios, 206
Inducción de callos, cultivos de callos y regeneración de órganos y embriones, 209
Introducción, 209
Inducción del callo, 211
Cultivo de callos, 213
Regeneración de órganos y embriones, 216
Regeneración de plantas a partir de células aisladas, 223
Semillas sintéticas, 224

21. **Variación somaclonal, 227**

22. **Fertilización en tubo de ensayo, 235**

23. **Producción de haploides, 239**

Introducción general, 239
Obtención de haploides *in vitro*, 243
Problemas asociados a la inducción de haploides, 251

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
SIB-UCE

24. Manipulación genética, 253

Introducción general, 253
Descripción, 255
Prerrequisitos para el uso de la manipulación genética, 257
Hibridación somática, 257
Idea general, 257
Discusión de las diferentes fases, 258
Relevancia de la hibridación somática, 263
Desventajas y problemas de la hibridación somática, 265
Procedimientos de selección después de la hibridación somática, 265
Selección de mutantes, 268
Transformación por *Agrobacterium tumefaciens*, 269

25. Miscelánea de aplicaciones, 273

En fitopatología, 273
Perspectiva general, 273
Transporte de material vegetal libre de enfermedades, 274
En mejora vegetal, 276
Desarrollo de quimeras *in vitro*, 276
Separación de quimeras y aislamiento de mutantes, 278
Obtención de tetraploides y triploides; inducción de pérdida de cromosomas, 279
Inducción de mutación *in vitro*, 282
Almacenaje del material vegetal *in vitro*, 288
Biosíntesis de sustancias *in vitro*, 292

26. Clonado in vitro de plantas en Holanda, 297

Anejo, 303

28. Referencias bibliográficas, 307

Bibliografía, 308

29. Reconocimientos, 325

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FUNDADA EN 1620
QUITO

1
PROLOGO

Cuando apareció la primera edición holandesa de este libro en 1975, no se preveía que pudiera despertar tanto interés. El rápido desarrollo de esta materia persuadió al autor para hacer una segunda edición, extensamente revisada en 1985. Esta tercera edición ha sido revisada más profundamente, y ampliada en un 20%, para acomodarse a los avances recientes, incluyendo aquellos presentados en el 6º Congreso sobre Cultivo de Células y Tejidos de Plantas, celebrado en Minnesota (1985) y en el 12º Congreso de Horticultura, en California (1986).

Desde 1975, el cultivo *in vitro* de las plantas superiores ha experimentado un espectacular desarrollo. En los laboratorios de investigación se han desarrollado los métodos para el cultivo de plantas, semillas, embriones, ápices caulinares, meristemos, tejidos, células y protoplastos, sobre medios nutritivos estériles, con el resultado de la producción y regeneración de individuos viables de muchas especies de plantas. Desde 1980 ha habido una explosión en el desarrollo de la manipulación genética y técnicas de biotecnología.

La producción de plantas superiores *in vitro*, uno de los más importantes objetivos del cultivo de tejidos, es enormemente sugerente para nuestra imaginación. Sin embargo, la especulación sobre los aspectos interesantes de la producción de plantas a partir de una célula, tejido, etc., no nos lleva muy lejos. Las personas prácticas como los agricultores están más interesados en saber si la propagación vegetativa puede ser conseguida con éxito por este método, especialmente en casos donde el clonado por los métodos habituales como esquejado, división e injertos de distintos tipos resultan difíciles o incluso imposibles.

Este libro ha sido escrito como respuesta a los problemas prácticos y preguntas que ha ido encontrando el autor, trabajando en un laboratorio de horticultura. Hay dos aspectos de esos problemas prácticos. Primero, era necesario escribir un libro adecuado para los estudiantes universitarios, como introducción al cultivo *in vitro* de plantas superiores. Segundo, los laboratorios de cultivo de tejidos (de investigación o aplicación) requerían un manual práctico, especialmente para auxiliares de laboratorio y ayudantes de investigación. Como resultado de la consulta con numerosos colegas en la enseñanza y la investigación, así como de aquellos relacionados con la horticultura y agricultura práctica, el autor ha intentado responder a las necesidades indicadas.

El autor desea mostrar su agradecimiento al Prof. Dr. Ir. J. Doorenbos, y al Dr. C. J. Gorter por su enjuiciamiento crítico de la primera edición de este libro.

Para evitar errores y omisiones durante la preparación de la segunda edición, expreso mi agradecimiento a los colegas que aceptaron mi invitación a leer de forma crítica capítulos específicos: Dr. Ir. J. B. M. Custers (Capítulo 16), Drs. F. Quak (Capítulo 19), Ir. J. A. J. Van Der Meys y Dr. G. Staritzky (Capítulos 20 y 21), Prof. Dr. Ir. J. G. Th. Hermsen (Capítulos 22, 23 y 24), Dr. J. J. M. Dons (Capítulo 24), Dr. Ir. M. Koornneef (Capítulo 24) y Dr. Ir. C. Broertjes, Prof. Dr. Ir. J. Doorenbos (Capítulo 25). Muchos otros enviaron críticas y adiciones por las cuales estoy máximamente agradecido. El autor espera que en los años que sigan, los lectores de esta tercera edición suministren nuevos comentarios críticos y sugerencias, indicando omisiones o errores.

Me siento especialmente agradecido a los auxiliares de laboratorio y ayudantes de investigación, que han trabajado conmigo a lo largo de los años en el Departamento de Horticultura de la Universidad Agrícola de Wageningen, sin cuyas contribuciones la investigación que se presenta en este libro no habría sido posible. Numerosos estudiantes del segundo ciclo universitario han contribuido de forma importante a esta nueva edición, a través de su investigación durante sus últimos años académicos. Esta investigación ha sido una fuente de inspiración y la piedra fundacional de esta tercera edición.

Mis ayudantes técnicos actuales H. H. M. Steegmans y P. A. Sprenkels han supuesto una gran ayuda durante muchos años. Sus observaciones críticas y añadidos han sido de gran valor durante la preparación de este libro. Agradezco a mi mujer por haber realizado gran parte de la mecanografía y a M. A. Ruibing por las correcciones durantes las últimas etapas de la preparación del manuscrito. Sin la ayuda de mis hijos A. J. Pierik y L. M. Pierik en la utilización del ordenador/procesador de textos, la aparición de este libro ciertamente se habría retrasado varios meses.

Agradezco a C. J. Kendrick la traducción al inglés, y también deseo grandemente mostrar mi aprecio al Dr. P. Debergh por su juicio crítico del manuscrito, en su fase final de producción.

Wageningen, Holanda, abril 1987. Prof. Dr. Ir. R.L.M. Pierik.

FUNDADA EN 1620 QUITO

2
INTRODUCCION

Nociones generales

Cuando se habla del cultivo de las plantas, generalmente nos referimos a cultivarlas en macetas, arriates, invernaderos o en el campo. El cultivo de las plantas se subdivide aún en las disciplinas de agricultura, horticultura, agricultura tropical, silvicultura y mejora de plantas. En 1904 Hännig desarrolló un nuevo método de cultivo de plantas al que se llamó cultivo de embriones. Aisló, *in vitro*, embriones inmaduros de algunos miembros de la familia de las Crucíferas, obteniendo plántulas viables. Muchos nuevos tipos de cultivo se han hecho populares desde 1920, como: La siembra *in vitro* de semillas de orquídea, el cultivo de callos, el cultivo de órganos, etc. (ver Capítulo 3). Después de 1945 todos estos diferentes tipos de cultivo se agruparon bajo el término colectivo de cultivo de tejidos de plantas, un nombre poco prometedor para un grupo tan diverso de cultivos.

Para evitar confusiones se ha elegido como título de este libro: *El cultivo in vitro de las plantas superiores*. Que se define como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores. Estas técnicas se caracterizan porque:

1. Ocurren a micro-escala i. e. sobre una superficie relativamente pequeña.

2. Se optimizan las condiciones ambientales, en lo que se refiere a los factores físicos, nutricionales y hormonales.

3. Se excluyen todos los micro-organismos (hongos, bacterias y virus), así como también las plagas de las plantas superiores (insectos y nematodos).

4. Generalmente no se reproduce el patrón normal de desarrollo de una planta, resultando que un tejido aislado puede dar origen a un callo, o puede desarrollarse de otras formas poco usuales (por ejemplo, formación de órganos, embriogénesis somática).

5. La capacidad de cultivar protoplastos o células individuales permite manipulaciones que antes eran imposibles.

6. El nombre de cultivo *in vitro* (que literalmente quiere decir "en vidrio"), se utilizó, porque, al menos inicialmente, se usaron recipientes de vidrio para el cultivo.

Ya que este libro realmente contiene descripciones de diferentes tipos de cultivo *in vitro* (Fig. 2.1.), puede ser descrito como un manual práctico o metodología sobre las técnicas de cultivo *in vitro*. Los aspectos metodológicos típicos del cultivo *in vitro* se dan en los Capítulos 5 a 14: Disposición del laboratorio, preparación de medios nutritivos, cerrado de tubos de ensayo y frascos, crecimiento y esterilización del material vegetal, aislamiento, inoculación y subcultivo, mecanización, influencia del material inicial y factores físicos sobre el crecimiento y desarrollo, etc.

El cultivo *in vitro* tiene también un papel definido que jugar, y es una herramienta para conseguir cosas que sería imposible *in vivo*. Volviendo a consideraciones prácticas: ¿por qué se practica el cultivo *in vitro*? Este asunto se trata de forma extensiva en los Capítulos 16 a 25, tanto en relación con aplicaciones prácticas en agricultura, horticultura y silvicultura, como con investigación más básica.

Más abajo se da una lista de los diferentes tipos de cultivo y sus posibles aplicaciones, indicando el número del capítulo relevante entre paréntesis. Los términos técnicos que se utilizan en la tabla se definen en el capítulo 2. Los detalles en relación con cada cultivo y sus aplicaciones prácticas se recogen en los capítulos correspondientes.

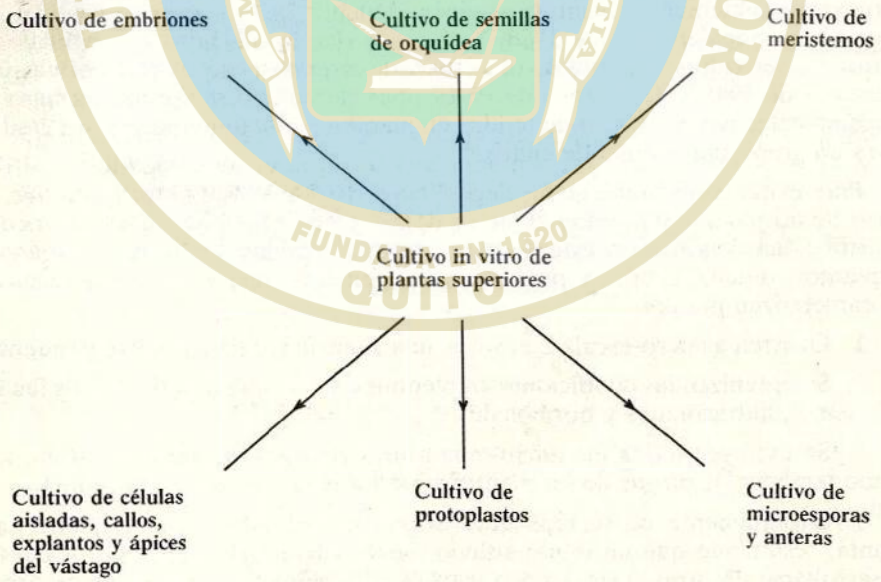


Fig. 2.1 Representación esquemática de las modalidades del cultivo *in vitro* de las plantas superiores.

Tipo de cultivo	*Finalidad*
Cultivo de embriones (16)	Acortamiento del ciclo de mejora Prevención del aborto embrionario Superación de la incompatibilidad Producción de haploides Para conseguir la formación de callo
Cultivo de semillas de orquídea (17)	Acortamiento del ciclo de mejora Sustitución de la simbiosis (micorrizas) Evitar la competición con otros microorganismos
Cultivo de meristemos (18, 19)	Eliminación de patógenos (virus, hongos, bacterias) Propagación vegetativa de orquídeas a través de protocormos Clonado de plantas que no sean orquídeas Almacenado de plantas libres de enfermedades Transporte fitosanitario Colección de germoplasma
Cultivo de segmentos nodales y ápices de vástago (18,20)	Propagación de orquídeas Ramificación axilar como medio de clonado Crío-conservación en bancos de germoplasma
Cultivo de explantos (que no contengan yemas, 19, 20, 25)	Formación de órganos adventicios para clonado Obtención de plantas libres de enfermedades Producción de mutantes fiables (mejora por mutagénesis) Aislamiento de mutantes Resolución de quimeras Obtención de poliploides
Cultivo de células aisladas, en suspensión y de callos (20, 21,25)	Clonado de plantas a través de la formación de órganos y embriones Creación de variantes genéticos Obtención de plantas libres de virus Como fuente de producción de protoplastos Material inicial para crioconservación Producción de metabolitos secundarios Biotransformación
Cultivo de anteras y microesporas (23)	Producción de haploides para obtención de homocigotos Como material inicial para la inducción de mutaciones Creación de plantas exclusivamente masculinas Como herramienta en la manipulación genética Para mejora con niveles más bajos de ploidía
Cultivo de óvulos y flores explantadas (16, 22)	Para superar la incompatibilidad Para prevenir la abscisión precoz de flores Consecución de fertilización en tubo de ensayo
Cultivo de protoplastos (24)	Hibridación somática Creación de cíbridos Transplante de núcleos, (fragmentos de) cromosomas y orgánulos Estudios de transformación Creación de variantes genéticos
Cultivo de protoplastos, células, tejidos y órganos (25)	Como herramienta en la investigación fitopatológica – Penetración y replicación de virus – Cultivo de parásitos obligados – Interacciones huésped-parásito – Cultivo de nematodos (cultivos de

– *Cultivo de nematodos (cultivos de raíces explantadas)*
– *Pruebas de fitotoxinas*
– *Estudios de nodulación*

Como herramienta en la investigación en fisiología vegetal
– *Estudios de ciclo celular*
– *Metabolismo*
– *Estudios sobre nutrición*
– *Estudios morfogenéticos y sobre el desarrollo.*

La propagación vegetativa *in vitro* (también llamada micropropagación), se trata en este libro con mayor detalle, ya que ha producido resultados de enorme importancia para la agricultura, horticultura y silvicultura. Es especialmente notable en horticultura, donde se encuentra una rápida respuesta a los resultados de la investigación en cultivo *in vitro*. Es particularmente llamativo el que los especialistas en horticultura usan muy frecuentemente el cultivo *in vitro* como medio de propagación vegetativa. Gracias al cultivo *in vitro*, un considerable ahorro en espacio (invernaderos) y, por consiguiente en energía, ha cambiado profundamente la producción de plantas propagadas vegetativamente. Esto se ilustra en la Sección *Desarrollo en Holanda y otros países* y en el capítulo 26.

El cultivo de órganos, tejidos y células vegetales, así como sus aplicaciones prácticas, han contribuido también de forma importante a nuestro conocimiento básico de la célula. La teoría celular de Schwann y Schleiden (1838-39), en la cual la célula se describe como la unidad biológica más pequeña a la que se puede considerar totipotente, ha sido respaldada por el cultivo de tejidos: una célula aislada es capaz de transformarse en una planta completa.

Después del aislamiento con éxito de protoplastos viables, a partir de los cuales se pueden regenerar plantas completas, se ha creado una alternativa (hibridación parasexual o hibridación somática) a las técnicas de propagación convencionales (hibridación sexual o cruzamiento). La posibilidad de poder formar individuos por fusión de protoplastos, quiere decir que, en principio, es posible salvar las barreras genéticas naturales. La hibridación somática hace posible la creación de híbridos citoplásmicos (cíbridos). Técnicas como el trasplante de núcleos o (partes de) cromosomas y orgánulos han sido investigadas por genetistas, mejoradores y biólogos moleculares. En el momento presente el cultivo de células es de gran importancia en biotecnología: los investigadores luchan por conseguir cultivar células vegetales como si fuesen microorganismos para obtener metabolitos secundarios de forma industrial.

Abreviaturas y glosario

ABA	ácido abscísico
BA	6-bencilaminopurina
°C	grados Celsius
CCC	cloruro de (2-cloroetil) trimetilamonio
2,4-D	ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
EDTA	etilendiaminotetraacetato
ELISA	ensayo de inmuno-absorción ligada a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)
GA	ácido giberélico
IAA	ácido 3-indolacético
IBA	ácido 3-indolbutírico
2iP	6-(γ,γ-dimetilalilamino) purina
MS	Murashige y Skoog (1962)
NAA	ácido α-naftalenacético
PBA	6-(bencilamino)-9-(2-tetrahidropiranil)-9H-purina
PEG	polietilenglicol
PVP	polivinilpirrolidona
RNA	ácido ribonucleico
TIBA	ácido 2, 3, 5-triiodobenzoico
UV	luz ultravioleta
v/v	volumen/volumen (concentración)
W	Watt
p/v	peso/volumen (concentración)
Zeatina	6-(4-hidroxi-3-metil-2-butenilamino) purina

Aborto del embrión: Muerte de un embrión.

Acido abscísico: Abreviado por ABA, hormona vegetal que juega un papel en la dormición y senescencia.

Adventicio: Desarrollo de órganos (raíces, yemas, vástagos, flores, etc.) o embriones (estructuras de tipo embrionario), a partir de zonas poco usuales, incluyendo callo (Fig. 2.2). Si los órganos se originan a partir de las células iniciales, primordios de los órganos, o los embriones se desarrollan a partir de cigotos, el término adventicio no puede ser usado.

Agar: Un producto de origen vegetal (obtenido a partir de algas), que se utiliza para solidificar medios nutritivos.

Agitador magnético: Aparato que frecuentemente consta de una plancha calefactada, sobre la que se puede calentar un vaso por ejemplo, al mismo tiempo que en su interior gira una varilla magnética.

Agitador rotatorio: Máquina rotatoria sobre la cual se pueden agitar, por ejemplo, matraces Erlenmeyer conteniendo medio nutritivo líquido.

Agua desionizada: Agua libre de compuestos inorgánicos.

Agua destilada: Agua producida por destilación, que no contiene compuestos orgánicos o inorgánicos.

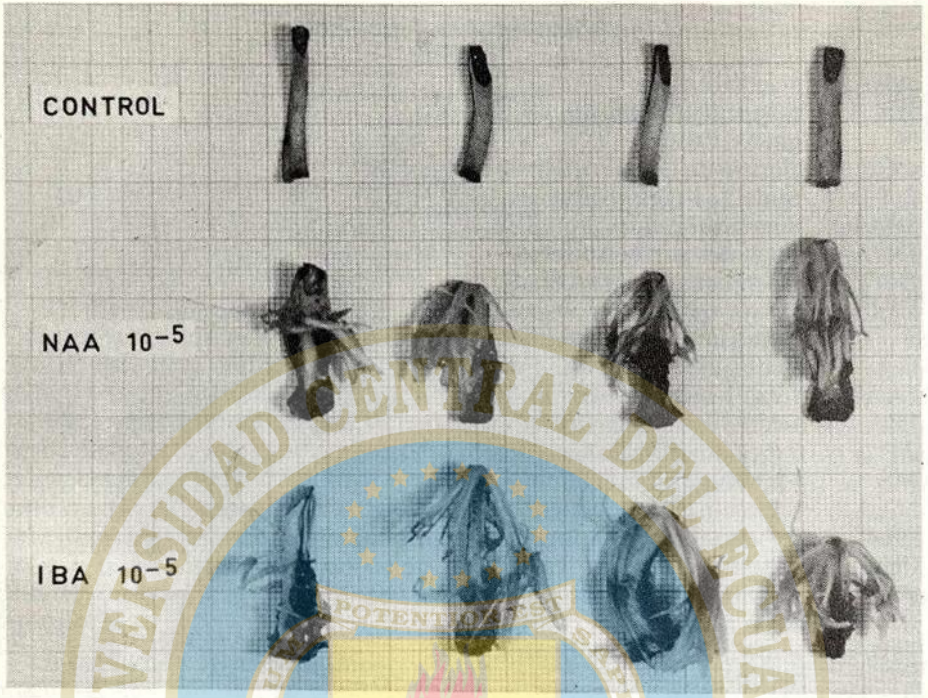


Figura 2.2 Regeneración *in vitro* de raíces adventicias, sobre explantos peciolares *in vitro*, de *Gerbera jamesonii*. El tratamiento testigo no contiene ninguna auxina. La concentración que se indica como 10^{-5} equivale a 10 mg l^{-1}. El enraizamiento sólo se produce cuando se aplican auxinas. La fotografía fue tomada ocho semanas después del aislamiento

Alcohol: Alcohol etílico (C_2H_5OH), también llamado etanol.

Aminoácidos: Grupo de compuestos orgánicos que, aparte de otras funciones, son los constituyentes básicos de las proteínas.

Androgénesis: Partenogénesis masculina. Desarrollo de un individuo haploide a partir de un grano de polen.

Aneuploide: Célula en la cual el número de cromosomas es distinto de x (el número haploide) o múltiplos de x.

Anti-oxidantes: Grupo de sustancias químicas que impide la oxidación, por ejemplo, la vitamina C o el ácido cítrico.

Antisepsia: Procesos o métodos que utilizan antisépticos.

Antiséptico: Que contrarresta la infección, especialmente previniendo el desarrollo de microorganismos.

Apice del vástago: Meristemo del vástago, apical (terminal), o lateral que contiene algunos primordios foliares u hojas.

Apomixia: Sustitución de la reproducción sexual por diferentes tipos de reproducción asexual, sin que se produzca fusión de gametos.

Asepsia: Ausencia de microorganismos.

Aséptico: Libre de cualquier microorganismo (hongos, bacterias, levaduras, virus, micoplasmas, etc.), estéril.

Asimbiótico: Que no está en simbiosis con microorganismos. Ver simbiosis.

Autoclave: Aparato en el cual se esterilizan, por medio de vapor a presión, los medios nutritivos, instrumental de vidrio, etc.

Autotrofo: Que no requiere sustancias orgánicas.

Auxinas: Grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que producen elongación celular, y en algunos casos división celular; frecuentemente inducen la aparición de raíces adventicias e inhiben el desarrollo de yemas adventicias (en los vástagos).

Axénico: Aislado de otros organismos.

Axilar: Que se origina en las axilas de las hojas.

Binocular: Microscopio simple que produce un aumento de 5-20X.

Biosíntesis: Síntesis de compuestos por la planta o por células.

Bisturí: Cuchilla pequeña y afilada de uso quirúrgico.

Caja de Petri: Plato redondo y plano, fabricado de vidrio o material sintético, provisto de tapa.

Callo: Tejidos no organizados, formados por células diferenciadas y no diferenciadas, que se dividen de forma activa y que generalmente se originan en zonas dañadas (por heridas), o en cultivo de tejidos.

Figura 2.3 Cámara de cultivo, en un laboratorio comercial de cultivo de tejidos, en California, EE UU

Cámara de crecimiento: Ver cámara de cultivo.

Cámara de cultivo: Cámara para el mantenimiento de cultivos, con luz, temperatura y humedad controladas (Fig. 2.3.).

Cámara de flujo laminar: Cámara para inoculación, que se mantiene estéril por medio de un flujo no turbulento y continuo de aire estéril.

Cámara de inoculación: Pequeña habitación o cámara para inoculación, frecuentemente con una corriente de aire estéril.

Cámara estéril: Recinto para trabajar con plantas, cámara de inoculación; actualmente sustituida por cámaras de flujo laminar.

Cambium: Tejido capaz de dividirse y que en los tallos origina la corteza y la madera.

Carbohidratos: Grupo de compuestos que sirven como fuente de energía (por ejemplo glucosa, sacarosa, fructosa, etc.).

Cíbrido: Híbrido citoplásmico, que se origina por la unión de un citoplasto (citoplasma sin núcleo) con una célula completa.

Citokininas: Grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que inducen la división celular y frecuentemente la formación de yemas adventicias (en vástagos). En la mayor parte de los casos inhiben la formación de raíces adventicias. Las citokininas disminuyen la dominancia apical.

Clon: Grupo de células, tejidos o plantas que son en principio genéticamente idénticas. Un clon no tiene por qué ser necesariamente homogéneo.

Contaminante: Micro-organismo.

Cultivo de células: Células *in vitro*, en crecimiento.

Cultivo de embriones: Cultivo de embriones sobre medio nutritivo.

Cultivo de órganos: Cultivo de órganos *in vitro*, de tal forma que permite el desarrollo y/o conservación del órgano aislado originalmente.

Cultivo de segmentos nodales: Cultivo de yemas laterales separadas, portando cada una una porción de tejido del tallo.

Cultivo de tejidos: Cultivo de protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones o semillas *in vitro*.

Cultivo en suspensión: Cultivo en el que las células aisladas y/o agregados celulares crecen y se multiplican, suspendidos en un medio líquido.

Cultivo primario: Cultivo que se obtiene a partir de células, tejidos u órganos obtenidos de un organismo.

Desarrollo: Ciclo de semilla a semilla en una planta, o desde la iniciación de los órganos hasta la senescencia; también los cambios en la forma de la planta debidos al crecimiento y la diferenciación.

Desdiferenciación de células: Conversión de células diferenciadas en no diferenciadas (meristemáticas).

Desinfección: Muerte de micro-organismos.

Detergente: Sustancia que rebaja la tensión superficial de una solución; se añade para mejorar el contacto entre las plantas y los agentes esterilizantes.

Diferenciación: El desarrollo de células o tejidos con una función específica y/o la regeneración de órganos o estructuras orgánicas (raíces, vástagos, etc.) o (pro)embriones.

Diferenciación de células: Asunción por las células de una o varias funciones específicas.

Dihaploide: Individuo (representado por 2n = 2x), que proviene de un tetraploide (2n = 4x) (Hermsen, 1977).

Diplofase: Fase con 2n cromosomas.

Diploide: Un núcleo es diploide si contiene dos veces el número básico (x) de cromosomas (Hermsen, 1977). La fórmula de su genoma es 2n = 2x.

Dominancia apical: Fenómeno por el que la yema terminal de un vástago impide el crecimiento de las yemas axilares.

EDTA: Acido etilendiamino tetraacético, compuesto quelante al cual el hierro queda unido de tal manera, que es asimilable por la planta.

Eficiencia de placa: Porcentaje de células sembradas, que dan origen a colonias celulares.

Embriogénesis: Proceso por el cual un embrión se desarrolla a partir de una célula huevo, o asexualmente a partir de una o un grupo de células.

Embrioide: Estructura embrionaria, producida *in vitro*, a partir de células somáticas; también embrión adventicio que se desarrolla *in vitro* de forma vegetativa.

Embrión nucelar: Embrión desarrollado de forma vegetativa, a partir del tejido somático que rodea al saco embrionario, en lugar de producirse por fertilización de la célula huevo.

Endomitosis: Duplicación del número de cromosomas, sin que se produzca división del núcleo, con el resultado de poliploidía.

Endopoliploidía: Producción de células poliploides como resultado de endomitosis.

Endurecimiento: Aclimatación gradual de plantas cultivadas *in vitro* a condiciones *in vivo*, por ejemplo, disminución gradual de la humedad.

Escindir: Cortar (con un bisturí, escalpelo, etc.) y preparar un tejido, órgano, etc. para el cultivo.

Esferoblasto: Nódulo de la madera que puede dar origen a vástagos adventicios con características juveniles.

Estereomicroscopio: Ver binocular.

Estéril: Medio u objeto que no contiene micro-organismos perceptibles o viables. Son necesarias pruebas de esterilidad para comprobación.

Esterilización: Procedimiento para la eliminación de micro-organismos.

Esterilización por filtrado: Proceso de esterilizar un líquido, haciéndolo pa-

sar a través de un filtro, cuyos poros son lo suficientemente pequeños para ser impermeables a los micro-organismos.

Esterilizar: Eliminación de micro-organismos, como, por ejemplo, por medio de sustancias químicas, calor, irradiación o filtración.

Explanto: Una porción de tejido escindida, u órgano tomado de la planta, para iniciar un cultivo.

Extracto de levaduras: Mezcla de sustancias obtenidas a partir de las levaduras.

Extracto de malta: Mezcla de compuestos extraídos a partir de malta.

Fase juvenil: Período de la vida de una planta durante el cual no se puede inducir la floración. Durante la fase juvenil las plantas presentan frecuentemente características muy especiales (morfológicas, fisiológicas, etc.), que son diferentes de las de la fase adulta.

Filtro de membrana: Elemento de la esterilización por filtrado.

Flameado: Técnica de esterilización, que consiste en bañar una porción de un instrumento en alcohol, haciéndolo arder posteriormente.

Formación de órganos (organogénesis): Formación de una raíz, vástago, yema, flor, tallo, etc.

Giberelinas: Grupo de hormonas vegetales que induce, entre otras respuestas, elongación y división celulares.

Habituación: Fenómeno por el que, después de un número de subcultivos, las células pueden crecer p. e. sin la adición de hormonas, aunque éstas eran necesarias al principio.

Heterocarionte: Célula con dos o más núcleos diferentes como resultado de una fusión celular.

Heterótrofo: Que requiere sustancias orgánicas.

Hibridación de células: Fusión de dos o más células diferentes, produciéndose una célula híbrida.

Hibridación somática: Hibridación a nivel somático.

Hidrolizado de caseína: Mezcla de compuestos (sobre todo aminoácidos), que se obtienen a partir de la caseína.

Homocarionte: Célula con dos o más núcleos idénticos como resultado de fusión.

Hormona: Sustancia orgánica que se produce en la planta y que a bajas concentraciones promueve el crecimiento, lo inhibe, o lo modifica cuantitativamente, generalmente en un lugar diferente de donde se origina.

Inducción: Iniciación de un proceso particular, con el resultado del desarrollo de órganos (p. e. raíces, vástagos, flores).

Inducción haploide: Estimulación de gametos normales, masculinos y femeninos (después de la meiosis), para crecer de forma autónoma (Hermsen, 1977).

Infección: Transmisión de una enfermedad por micro-organismos.

Iniciación: Formación de una estructura o un órgano, p. e. un primordio de la raíz o del vástago.

Iniciales: Grupo de células que sirven como precursoras de un órgano (hoja, raíz, yema).

Inocular: Poner en, o sobre un medio nutritivo (Fig. 2.4).

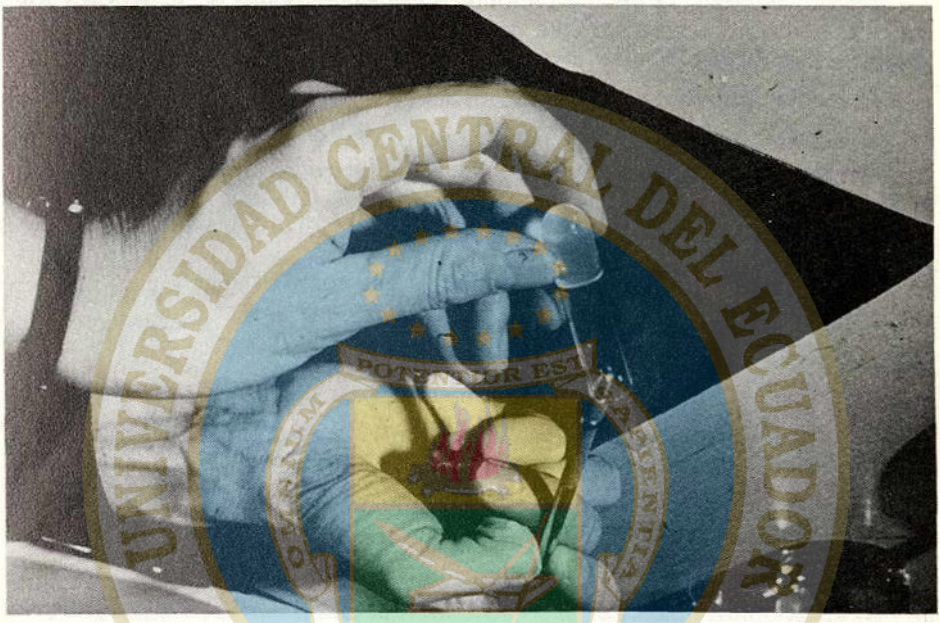


Figura 2.4 Inoculación. Colocación (inoculación) de un meristemo sobre un medio de cultivo sólido. Se realiza con la ayuda de una aguja de siembra.

Intercalar: Entre dos yemas contiguas sobre el tallo, en un entrenudo.

Interespecífico: Se utiliza cuando se cruzan dos especies diferentes.

Intergenérico: Se usa cuando se cruzan dos géneros diferentes.

In vitro: Literalmente "en vidrio", en un tubo de ensayo, matraz, etc.

In vivo: In situ. En la planta intacta tal y como crece en el invernadero, en el campo, etc.

Lateral: De la base de la hoja, bractea o bractea involucral.

Leche de coco: Endospermo líquido del coco.

Libre de enfermedades: Se debería interpretar como libre de enfermedades conocidas, ya que podría contener algún patógeno aún no descubierto.

Libre de patógenos: Planta, meristemo, tejido o célula, que está libre de enfermedades (bacterias, hongos, virus, etc.).

Libre de virus: Planta, célula, tejido o meristemo que no presenta síntomas víricos ni contiene partículas víricas identificables.

Linaje celular: Conjunto de células seleccionadas o clonadas, con propiedades específicas, que se originan de un cultivo primario o línea celular.

Línea celular: Células (originadas a partir de un cultivo primario) y que se cultivan nuevamente con éxito por primera, segunda vez, etc.

Macro-elementos: Grupo de elementos esenciales como N, P, K, Ca y Mg, que son necesitados normalmente en cantidades relativamente altas (nutrición inorgánica de la planta).

Matraz Erlenmeyer: Matraz de forma cónica y fondo plano.

Matraz Steward: Para el crecimiento de células y tejidos en medio líquido, en cuyo seno pueden ser sumergidos de forma periódica por rotación. Ideado por Steward.

Medio: Ver medio nutritivo.

Medio líquido: Medio sin agente solidificante como el agar.

Medio nutritivo: Mezcla de sustancias sobre/en las cuales pueden crecer células, tejidos u órganos, con o sin agar.

Medio sólido: Medio nutritivo solidificado, p.e., con agar.

Mericlón: Un clon en orquídeas, que se origina a partir de un meristemo u otros órganos aislados *in vitro*.

Meristemo: Conjunto de células en división en el ápice de la raíz o vástago (meristemo apical), en el cambium intercalar de las yemas, hojas y flores.

Meristemo apical: Grupo de células meristemáticas situadas en el ápice de la raíz o del vástago, que por división celular originan a las precursoras de los tejidos primarios de la raíz o el vástago.

Meristemoide: Nódulo de tejido indiferenciado, a partir del cual se pueden producir nuevas células y/o estructuras adventicias (como meristemos).

Micorriza: Asociación de un hongo con la raíz de una planta superior.

Micro-elementos: Grupo de elementos como el Fe, B, Zn, Mo, Mn, etc., que son importantes en cantidades relativamente pequeñas para la nutrición inorgánica de las plantas.

Micropropagación: Propagación vegetativa de plantas *in vitro*.

Monocapa: Una única capa de células que crecen sobre una superficie.

Monoploide: Célula o individuo que sólo tiene un genoma (2n = x). Un monoploide se origina a partir de un diploide (2n = 2x) (Hermsen, 1977) y constituye el número más bajo de cromosomas de una serie poliploide (De Fossard, 1976).

Morfogénesis: Origen de la forma, y como consecuencia la diferenciación de características estructurales internas asociadas.

Mutación: Cambio genético.

N: Denominada en el texto como n, es el número de cromosomas en la fase haploide (gametofito).

Número de repicado: El número de veces que las células, etc. han sido repicadas i.e. trasplantadas de un recipiente de cultivo a otro.

Organo: Parte de una planta que tiene una misión específica, por ejemplo raíz, tallo, hoja, flor, fruto, etc.

Partenogénesis: Producción de un embrión a partir de un gameto femenino, sin la participación del gameto masculino (De Fossard, 1976).

pH: Logaritmo de la concentración de iones hidrógeno cambiado de signo.

Planta haploide: Planta con el número de sus cromosomas reducido a la mitad (denominada n), debido a una división reductiva de la diploide (=2n) (de Fossard, 1976).

Poliembrionía: Cuando se forman dos o más embriones después de la fertilización (de Fossard, 1976).

Polihaploide: Individuo que contiene la mitad del número de cromosomas de un poliploide.

Poliploide: Una planta es poliploide cuando 2n = 3x (triploide) 2n = 4x (tetraploide), etc. Es decir, posee múltiplos de la base (el más bajo), número de cromosomas (x) (de Fossard, 1976; Hermsen, 1977).

Potencial osmótico (valor del): Potencial conseguido disolviendo una sustancia en agua; 1 mol de glucosa por litro de agua produce un potencial osmótico de 22,4 atmósferas.

Primordio: Grupo de células que da origen a un órgano.

Primordio de la hoja: Iniciales de una hoja.

Protocormo: Estructura de tipo tuberoso que se forma cuando germinan las semillas de orquídea, o cuando se usa cultivo de meristemos de orquídea.

Protoplasto: Célula vegetal sin pared, que se produce por degeneración enzimática de esta.

Quimera: Una planta que contiene grupos (capas) de células, que son genéticamente diferentes.

Regulador: Sustancia que regula el crecimiento y desarrollo de células vegetales, órganos, etc.

Repicar: Trasplantar células, tejidos u órganos, de un medio nutritivo a otro (Fig. 2.5).

Rejuvenecimiento: Paso del estado adulto a juvenil.

Simbiosis: Dos organismos diferentes que viven juntos con beneficio mutuo.

Termolábil: Que no resiste el calor, p. e. una sustancia que se descompone cuando se calienta.

Testaje de plantas: Se trata de averiguar, utilizando procedimientos tipificados, si en las plantas objeto de estudio existe la presencia de enfermedades conocidas.

Figura 2.5 Para la propagación vegetativa, *in vitro*, de helechos, se repican los brotes sobre un medio de cultivo nuevo (fresco).

Tiempo de duplicación: Término utilizado en cultivo de tejidos y propagación de vástagos, para indicar el tiempo necesario para duplicar, *in vitro*, el número de células o vástagos.

Tiempo de generación celular: Intervalo entre dos divisiones celulares consecutivas.

Totipotencia: Potencialidad de las células o tejidos para formar todo tipo de células y/o regenerar una planta.

Transformación in vitro: Producción, por la razón que sea, de cambios hereditarios, por el crecimiento de protoplastos, células, tejidos, etc.

Tubo de ensayo: Tubo en el cual se cultivan células, tejidos, etc.

Variación epigenética: Variación no hereditaria, que es al mismo tiempo reversible; frecuentemente es el resultado de un cambio en la expresión génica.

Variación somaclonal: Incremento de la variabilidad genética en las plantas superiores, que tiene lugar en el cultivo in vitro.

Vitaminas: Grupo de compuestos orgánicos que a veces se añaden al medio nutritivo (vitamina B_1, vitamina C, etc.).

Vitrificación: Enfermedad fisiológica, que se explica con detalle en el apartado Agar.

X: x, en el texto. Se utiliza frecuentemente en el capítulo 23 sobre haploides. Se refiere al número más pequeño (tanto estructuralmente como en contenido génico), de cromosomas diferentes que constituyen una unidad funcional (Hermsen, 1977).

3
HISTORIA

Introducción

La historia del cultivo *in vitro* se ilustra en la figura 3.1. En 1838 Schwann y Schleiden (cfr. Gautheret, 1983), lanzaron la teoría denominada de la totipotencia, la cual establece que las células son autosuficientes y que en principio son capaces de regenerar una planta completa. Su teoría fue de hecho el núcleo del que nació el cultivo de tejidos y células. Los primeros intentos, hechos por Haberlandt en 1902, sobre cultivo de tejidos fracasaron. Sin embargo, entre 1907 y 1909, Harrison, Burrows y Carrel tuvieron éxito al cultivar *in vitro* tejido animal y humano. Aunque algunos investigadores habían conseguido previamente cultivo *in vitro* de semillas de orquídea (plántulas), embriones y órganos de plantas, fueron, en 1939, Nobécourt, Gautheret y White (cfr. Street, 1973), los que consiguieron el primer cultivo de tejidos auténtico. Después de la Segunda Guerra Mundial el desarrollo en este campo ha sido especialmente rápido, y se han publicado numerosos resultados importantes para la agricultura, silvicultura y horticultura (Pierik, 1979: Bhojwani *et al.*, 1986).

El cultivo de tejidos vegetales quedó algo rezagado con respecto al cultivo de tejidos animales y humanos, debido al tardío descubrimiento de las hormonas (reguladores) vegetales. El primer regulador descubierto, la auxina IAA, produjo grandes oportunidades para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. El descubrimiento en 1955 de la sustancia reguladora kinetina (una citokinina), constituyó un nuevo estímulo. Desde aquel momento han tenido lugar enormes avances, al principio en Francia y EE UU y más tarde en otros países. El aumento sustancial del número de investigadores en el área en los últimos 5 años, queda justificado por la utilidad que el cultivo de tejidos vegetales brinda a los agrónomos, mejoradores, botánicos, biólogos moleculares, bioquímicos, fitopatólogos, etc. Teniendo en cuenta las profundas implicaciones prácticas que el cultivo de tejidos vegetales tiene en la agronomía, la mejora, etc., el número de investigadores se incrementará con toda probabilidad en el futuro.

Para una revisión histórica detallada, se remite al lector a los libros y artícu-

culos de Gautheret (1959, 1964, 1983), Street (1973, 1974) y Gamborg y Wetter (1975). Solamente se mencionan más abajo algunas fechas y hechos importantes:

Figura 3.1 Representación esquemática de la historia del cultivo de tejidos y células vegetales. Tuvieron que pasar más de 100 años, para que la teoría de la totipotencia de Schwann y Schleiden fuese comprobada (Gautheret, 1983).

1892 Las plantas sintetizan sustancias con poder para formar órganos, que son distribuidas de forma polar (Sachs).
1902 Primer intento de cultivo de tejidos vegetales (Haberlandt).
1904 Primer intento de cultivo de embriones de algunas crucíferas (Hannig).
1909 Fusión de protoplastos vegetales, aunque el producto fue incapaz de sobrevivir (Kuster).
1922 Germinación asimbiótica, *in vitro*, de semillas de orquídea (Knudson).
1922 Cultivo *in vitro* de ápices de raíz (Robbins).
1925 Cultivo de embriones aplicado a cruces interespecíficos de *Linum* (Laibach).
1929 Cultivo de embriones de *Linum,* para evitar la incompatibilidad en el cruce (Laibach).
1934 El cultivo *in vitro* del tejido cambial dc algunos árboles y arbustos fue incapaz de prosperar, debido a que la auxina no había sido descubierta aún (Gautheret).

1934 Cultivo con éxito de raíces de tomate (White).
1936 Cultivo de embriones de varias gimnospermas (La Rue).
1939 Crecimiento continuo, con éxito de cultivo de callo (Gautheret, Nobécourt y White).
1940 Cultivo *in vitro* de tejido cambial de *Ulmus*, para estudiar la formación de vástagos adventicios (Gautheret).
1941 Se empleó por primera vez la leche de coco (contiene un factor de la división celular), para el cultivo de embriones de *Datura* (Van Overbeek).
1941 Cultivo *in vitro* de tejidos de agalla del cuello (Braun).
1944 Primeros cultivos *in vitro* de tabaco, empleados para estudiar la formación de vástagos adventicios (Skoog).
1945 Cultivo *in vitro* de ápices de tallo aislados, de *Asparagus* (Loo).
1946 Primeras plantas completas de *Lupinus* y *Tropaeolum* a partir de ápices del vástago (Ball).
1948 Formación de raíces y vástagos adventicios determinados por la relación auxina/adenina (Skoog y Tsui).
1950 Regeneración de órganos a partir de callo de *Sequoia sempervirens* (Ball).
1952 Obtención de dalias libres de virus por cultivo de meristemos (Morel y Martin).
1952 Primera aplicación de microinjerto (Morel y Martin).
1953 Obtención de callo haploide de *Ginkgo biloba* a partir de polen (Tulecke).
1954 Control de cambios cariológicos y de comportamiento cromosómico en cultivos de endospermo de maíz (Strauss).
1954 Obtención de la primera planta a partir de una célula aislada (Muir *et al.*).
1955 Descubrimiento de la kinetina, una hormona de la división celular (Miller *et al.*).
1956 Crecimiento de cultivos en sistemas en suspensión, en recipientes de gran capacidad, para la obtención de productos secundarios por Tulecke y Nickell (Staba, 1985).
1957 Descubrimiento de la regulación de la formación de órganos (raíces y vástagos), variando la proporción citokinina/auxina (Skoog y Miller).
1958 Regeneración *in vitro* de embriones somáticos, a partir de la nucela de óvulos de *Citrus* (Maheswari y Rangaswamy).
1958 Regeneración de proembriones a partir de agregados de callo y suspensiones de células de *Daucus carota* (Reinert, Steward).
1959 Publicación del primer manual extensivo de cultivo de tejidos vegetales (Gautheret).
1960 Primera fertilización con éxito, en tubo de ensayo en *Papaver rhoeas (Kanta)*.
1960 Degradación enzimática de las paredes celulares para obtener grandes cantidades de protoplastos (Cocking).
1960 Propagación vegetativa de orquídeas por cultivo de meristemos (Morel).
1960 Filtración de suspensiones celulares y aislamiento de células por plaqueo (Bergmann).
1962 Desarrollo del famoso medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog).

1964 Se producen las primeras plantas haploides de *Datura,* a partir de granos de polen (Guha y Maheswari).
1964 Regeneración de tallos y vástagos sobre callo de *Populus tremuloides* (Mathes).
1965 Inducción de la floración, *in vitro*, en tejido de tabaco (Aghion-Prat).
1965 Diferenciación de plantas de tabaco a partir de células aisladas en microcultivo (Vasil y Hildebrandt).
1967 Inducción de la floración en *Lunaria annua* por vernalización *in vitro* (Pierik).
1967 Obtención de plantas haploides a partir de granos de polen de tabaco (Bourgin y Nitsch).
1969 Análisis cariológico de plantas regeneradas a partir de cultivos de callo de tabaco (Sacristán y Melchers).
1969 Primer aislamiento de cloroplastos, con éxito, a partir de un cultivo en suspensión de *Haplopappus gracilis* (Eriksson y Jonassen).
1970 Selección de mutantes bioquímicos *in vitro* (Carlson).
1970 Se utilizó el cultivo de embriones en la producción de monoploides en cebada (Kasha y Kao).
1970 Se consiguió la primera fusión de protoplastos (Power *et al.*).
1971 Primeras plantas regeneradas a partir de protoplastos (Takebe *et al.*).
1972 Hibridación interespecífica, por fusión de protoplastos, en dos especies de *Nicotiana* (Carlson *et al.*).
1973 Demostración de la capacidad de la citokinina para romper la dormición de explantos de capítulo de *Gerbera* (Pierik *et al.*).
1974 Inducción de ramificación axilar, por citokinina, en ápices de vástago aislados de *Gerbera* (Murashige *et al.*).
1974 Regeneración de plantas haploides de *Petunia hybrida* a partir de protoplastos (Binding).
1974 Obtención de híbridos por fusión de protoplastos haploides (Melchers y Labib).
1974 Biotransformación en cultivo de tejidos vegetales (Reinhard).
1974 Descubrimiento de que el plásmido-Ti es el principio inductor de tumores de *Agrobacterium* (Zaenen *et al.*; Larebeke *et al.*).
1975 Selección positiva de cultivos de callo de maíz resistentes a *Helminthosporium maydis* (Gengenbach y Green).
1976 Iniciación del vástago a partir de ápices crioconservados, de clavel (Seibert).
1976 Hibridación vegetal interespecífica por fusión de protoplastos de *Petunia hybrida* y *Petunia parodii* (Power *et al.*).
1976 Se descubre que la síntesis y ruptura de la octopina y nopalina está controlada genéticamente por el plásmido-Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (Bomhoff *et al.*).
1977 Integración con éxito, del DNA del plásmido-Ti, de *Agrobacterium tumefaciens,* en plantas (Chilton *et al.*).
1978 Hibridación somática de tomate y patata (Melchers *et al.*).
1979 Se desarrolla un procedimiento de co-cultivo, para transformación de protoplastos de plantas con *Agrobacterium* (Marton *et al.*).
1980 Utilización de células completas inmovilizadas para la biotransformación de la digitoxina en digoxina (Alfermann *et al.*).

1981 Introducción del término variación somaclonal (Larkin and Scowcroft).
1981 Aislamiento de auxótrofos por prospección a gran escala de colonias de células, derivadas de protoplastos haploides de *Nicotiana plumbaginifolia*, tratados con mutagénicos (Siderov *et al.*).
1982 Se consigue la incorporación de DNA desnudo por los protoplastos: en consecuencia se hace posible la transformación con DNA aislado (Krens *et al.*).
1982 Fusión de protoplastos por estímulo eléctrico (Zimmermann).
1983 Hibridación citoplásmica intergenérica entre rábano y colza (Pelletier *et al.*).
1984 Transformación de células vegetales con DNA plasmídico (Paszkowsky *et al.*).
1985 Infección y transformación de discos de hoja con *Agrobacterium tumefaciens*, y regeneración de plantas transformadas (Horsch *et al.*).

Desarrollo en Holanda y otros países

El cultivo *in vitro* de las plantas superiores en Holanda, se expandió rápidamente entre 1964 y 1987, pasando el número de investigadores activos, en ese tiempo, de 10 a 98. Se da una perspectiva, de la investigación *in vitro*, en Holanda, en la siguiente tabla (se incluyen universidades, institutos y estaciones de investigación), que se refiere a la primavera de 1985. Se han tenido en cuenta las disciplinas más relevantes.

Disciplina	*Número de investigadores*
Botánica (anatomía, morfología y fisiología)	23
Fitopatología (micología, bacteriología, virología y nematología)	7
Mejora de plantas, genética y biología molecular	42
Propagación vegetativa	9
Farmacología y metabolitos secundarios	17
Total	98

También se encuentran investigadores sobre cultivo de tejidos en la industria de la mejora y propagación de plantas, donde la propagación vegetativa de plantas *in vitro* es de capital importancia. La tabla siguiente (ver también el capítulo 26) muestra el número de laboratorios comerciales, de cultivo de tejidos, en Holanda, que propagan plantas *in vitro*, también se indica el número de plantas propagadas en los años 1983-1986 (Pierik, 1986; datos no publicados).

Desgraciadamente el número exacto de laboratorios y su producción en otros países no es conocido. Sluis y Walker (1958) estimaron el número de laboratorios comerciales, de cultivo de tejidos en EE UU y Canadá, en 250, entre 5 y 10 laboratorios de esos dos países producen alrededor de 5 millones de plantas por año. Jones (1986) estimó que la producción en 1985, de 18 laboratorios importantes de EE UU, alcanzaba los 55-65 millones de plantas.

SIB-UCE

Durante un congreso en Tenerife en 1985, el autor coincidió con varios investigadores franceses en cultivo de tejidos, que estimaron la producción total *in vitro*, en Francia, de plantas clonadas, en 1985, en 71 millones de unidades.

Número de plantas producidas	*Número de laboratorios comerciales de cultivo de tejidos*				
	1983	*1984*	*1985*	*1986*	*1987*
Menos de 10.000	6	3	12	14	21
10.000-100.000	9	15	14	18	16
100.000-500.000	4	4	6	6	8
500.000-1.000.000	1	2	1	2	3
1.000.000-5.000.000	8	9	7	7	8
Más de 5.000.000	0	0	2	3	4
Total	28	33	42	50	60

Número de plantas multiplicadas	*1983*	*1984*	*1985*	*1986*	*1987*
Plantas de maceta	15.243.327	15.428.130	17.412.586	19.822.274	23.412.576
Flor cortada	3.634.497	10.036.990	11.420.824	12.639.758	16.202.707
Bulbos y cormos	590.392	1.458.019	5.358.740	8.085.920	10.998.407
Orquídeas	1.347.350	1.534.500	1.116.740	1.449.190	1.659.530
Misc. Ornamentales	8.952	242.383	301.865	375.805	564.906
Cultivos agrícolas	279.400	280.000	300.000	311.825	309.200
Hortalizas	27.053	60.040	71.205	68.825	73.233
Total	21.130.771	29.040.062	35.981.960	42.753.600	53.220.559

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM POTENTIAE EST SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

4
TIPOS DE CULTIVO

Una planta se compone de diferentes órganos, cada uno de los cuales contiene diferentes tejidos, los cuales a su vez están constituidos por células individuales. Si se digieren enzimáticamente las paredes celulares se producen los protoplastos. Hay muchos tipos diferentes de cultivo *in vitro*, de la misma forma que se encuentran materiales diferentes en la constitución de las plantas. Estos tipos de cultivo son:

1. Cultivo de plantas intactas: Se siembra la semilla *in vitro*, obteniéndose primero una plántula y finalmente una planta p. e. en orquídeas (Fig. 4.1).

2. Cultivo de embriones: Se cultiva el embrión aislado después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.

3. Se cultiva *in vitro* un órgano aislado. Se pueden distinguir distintos tipos p. e. cultivo de meristemos, cultivo de ápices del vástago, cultivo de raíces, cultivo de anteras, etc. Generalmente una porción (de tejido, o un órgano), aislada de una planta, se denomina explanto, y a su cultivo, cultivo de explanto.

4. Cultivo de callo: Se llama así, cuando una porción de tejido se desdiferencia *in vitro*, originando un callo.

5. Cultivo de células aisladas: Es el crecimiento de células individuales, obtenidas de un tejido, callo o cultivo en suspensión, con la ayuda de enzimas o mecánicamente.

6. Cultivo de protoplastos: Se obtiene a partir de células, por digestión enzimática de la pared celular.

De Fossard (1977) distinguía 3 tipos de cultivo *in vitro* en las plantas superiores:

1. *Organizado*: Se refiere al cultivo de plantas completas o casi completas (embriones, semillas, Fig.4.1), o al cultivo de órganos, donde se mantiene la estructura característica del órgano o de la planta. Se parece mucho a la propagación vegetativa *in vivo*, por esqueje, división, estolones y yemas o vástagos

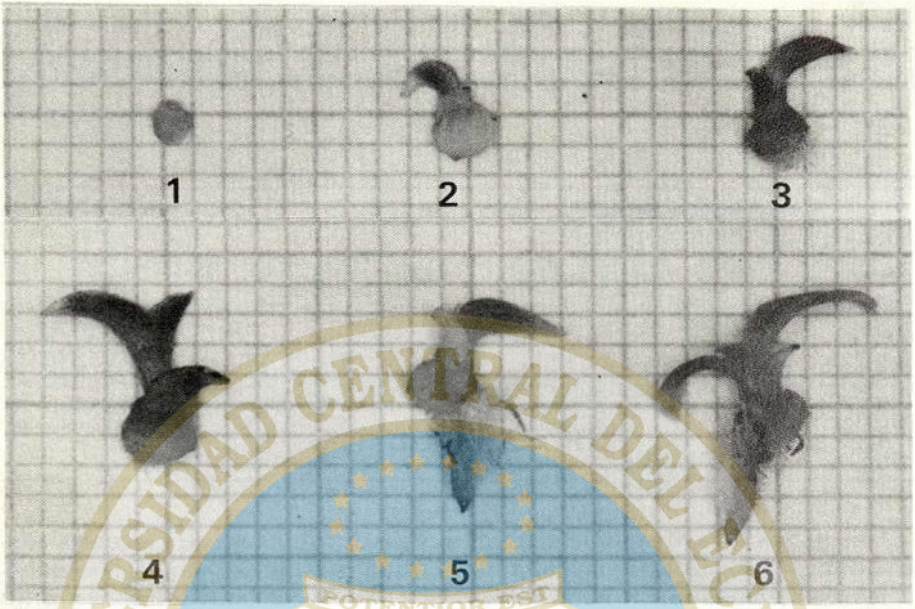


Figura 4.1 El desarrollo de una planta de *Paphiopedilum ciliolare*, a partir de una semilla sembrada *in vitro*, constituye un ejemplo de desarrollo y crecimiento organizado. 1. Formación de un protocormo. 2. El protocormo origina una hoja. 3. Se originan dos hojas y se hacen visibles los rizoides en la base del protocormo. 4. Se origina la tercera hoja. 5 y 6. Aparece la primera raíz (Pierik, datos inéditos). La fotografía de la plántula 6 fue tomada 20 semanas después del aislamiento

axilares. Si la estructura orgánica no se destruye, la descendencia obtenida es idéntica al material vegetal original.

2. *No organizado*: Si las células y/o los tejidos se aislan de una porción organizada de una planta, se desdiferencian y cultivan, se obtiene un crecimiento no organizado (en forma de callo). Si el callo se disgrega, se originan grupos de células (agregados), y/o células aisladas (cultivo en suspensión). El crecimiento no organizado se induce fundamentalmente por el uso de (muy) altas concentraciones de auxina y/o citokinina en el medio nutritivo. La estabilidad genética de los cultivos no organizados es frecuentemente baja.

3. *No organizado/Organizado*: Se trata de un intermedio entre los dos anteriores. Las células de un órgano o tejido aislado, primero se desdiferencian, para posteriormente formar tejidos o una capa de tejido calloso. A partir de estos se desarrollan rápidamente órganos (p. e. raíces y/o vástagos), o incluso individuos completos (pro-embriones o embriones). Se debe tener en cuenta que las estructuras organizadas se pueden desarrollar a partir de cultivos no organizados espontáneamente o por medio de técnicas especiales. En todos estos casos la descendencia no es completamente idéntica con respecto al material original.

5
EQUIPO DE LABORATORIO

Material

Se indican en una lista más abajo los elementos necesarios para montar un laboratorio profesional de cultivo de tejidos. Si se va a trabajar en pequeña escala, se puede utilizar un equipo más reducido, en este caso los elementos marcados con un asterisco no son absolutamente necesarios. Por ejemplo, el lavado se puede hacer a mano en lugar de utilizar un lavaplatos, las mezcladoras son necesarias solamente si se requieren grandes cantidades de medio, el agua destilada puede ser reemplazada en algunas ocasiones por agua desionizada, se puede utilizar una olla doméstica a presión en lugar de un autoclave. Solamente los laboratorios grandes poseen almacenes para material de vidrio, medios nutritivos etc.

Preparación de los medios

— Suministro de gas, agua y electricidad, y posiblemente aire comprimido* y línea de vacío*.
— Calentador de agua.
— Material de vidrio diverso.
— Placa caliente con agitación magnética.
— Manta calefactora o placa apta para grandes recipientes; en la práctica el medio se calienta frecuentemente por medio de inyección de vapor.
— Fuente de vapor para la calefacción de los medios*.
— Granatario, para pesadas en gramos (precisión hasta 0,01 g).
— Balanza de precisión, para pesadas en miligramos (precisión hasta 0,1 mg).
— Espátulas, para utilización durante la pesada.
— Mezcladora, para grandes cantidades de medio*.
— Horno micro-ondas*, para calentamiento rápido de los medios y mezclas de agar (puede sustituir a la manta calefactora); el horno micro-ondas se puede utilizar también para la descongelación rápida de material.
— Sistema de filtrado Millipore*.

— Dosificador automático*.
— pH-metro.
— Aparato de destilación*.
— Desionizador.
— Amplia gama de productos químicos (frecuentemente caros).
— Reloj avisador, para los tiempos de esterilización.
— Gradillas de metal para mantener los tubos de ensayo en el autoclave.
— Cestillos metálicos* para contener las placas de Petri en el autoclave.
— Tubos de ensayo, matraces, recipientes de plástico.
— Material para el cerrado de tubos y matraces (algodón, papel de aluminio, película plástica, tapones metálicos, etc.).
— Autoclave* u olla a presión.
— Almacén* de productos químicos, material de vidrio, etc.
— Almacén estéril* para medios nutritivos, agua estéril, etc.
— Depósito de agua destilada y/o desionizada.
— Escurridores.
— Lavador de pipetas* (resistente al ácido).
— Cámara de flujo laminar (cámara de inoculación estéril).
— Suministro de gas en la cámara de inoculación*.
— Microscopio simple binocular*.
— Mechero Bunsen* para flameado (o lámpara de alcohol).
— Esterilizador seco* para bisturís, escalpelos, pinzas (como alternativa al mechero Bunsen).
— Papel de filtro (o placas de vidrio), para su uso durante el manejo del material estéril.
— Cajas de Petri para repicado.
— Centrífuga* (de baja velocidad).
— Hipoclorito cálcico, para esterilización del material vegetal.
— Alcohol de 96%.
— Almacén para el alcohol, defendido del fuego.
— Material para envolver cajas, gradillas, etc.

Equipo general

— Estufa de secado para vidrio etc., después de la esterilización.
— Lavaplatos*.
— Material de limpieza (escobillas, etc.).
— Detergentes.
— Carrito*.
— Refrigerador para almacenamiento de productos químicos y medios nutritivos.
— Pequeño congelador*.
— Baño resistente al ácido*, conteniendo ácido crómico y sulfúrico para limpieza de material de vidrio muy contaminado.

Cámara de cultivo

— Con temperatura controlada (17-27 °C), con refrigeración y calefacción.
— Estanterías para las gradillas de los cultivos.
— Iluminación fluorescente.

— Reloj para regulación del fotoperíodo.
— Sistema de alarma, por si se produce un fallo en el funcionamiento.
— Gradillas para tubos de ensayo.
— Mesa para realizar observaciones.
— Agitador o agitador rotatorio*.

El equipo que se indica más arriba es suficiente para el trabajo de propagación. Sin embargo, para cultivo de células aisladas y/o trabajo con protoplastos se precisan otros elementos adicionales.

Invernadero

Para el crecimiento del material experimental y para el crecimiento de las plantas producidas *in vitro*.

Teniendo en cuenta lo que se ha dicho más arriba, las necesidades de espacio para un laboratorio de cultivo de tejidos eficaz, son:

1. Invernadero para el cultivo y crecimiento del material vegetal.

2. Laboratorio donde se preparen los medios nutritivos, preferiblemente bien equipado de armarios.

3. Area de lavado, para el lavaplatos y autoclave, si es posible separada del laboratorio de preparación de medios.

4. Almacén para material (vidrio, productos químicos, medios nutritivos, etc.).

5. Habitación de inoculación, con cámaras de flujo de aire laminar, si es posible con aire estéril (filtrado), a presión.

6. Cuarto de balanzas (si es posible, con las balanzas en una zona separada), refrigerador, congelador a baja temperatura, etc.

7. Cámara(s) de cultivo.

8. Sala para laborantes.

El área media (expresada como porcentaje), dedicada a las diferentes funciones, en 8 laboratorios comerciales de cultivo de tejidos, en California es: Preparación de los medios 35%, Sala de inoculación 23%, y cámaras de cultivo 42% (Marshall, 1977).

Cámara de flujo laminar

Aunque la preparación y separación de los explantos y la división (corte) de los callos etc., se realiza sobre placas de vidrio estéril, o entre/sobre papel de filtro estéril, estas labores es necesario llevarlas a cabo en una cámara de flujo laminar (también llamada cámara de inoculación). Cuando estas operaciones se llevan a cabo en una habitación no estéril, el número de infecciones es mucho mayor, y si se realizan sobre o bajo papel de filtro, con aire no estéril (por ejemplo en el caso de clases prácticas, donde el uso de cámaras de flujo laminar sería demasiado caro), se debe contar al menos con un 10% de infecciones. Los laboratorios de cultivo de tejidos, de investigación o comerciales, usan siempre cámaras de flujo laminar para limitar las posibilidades de infección.

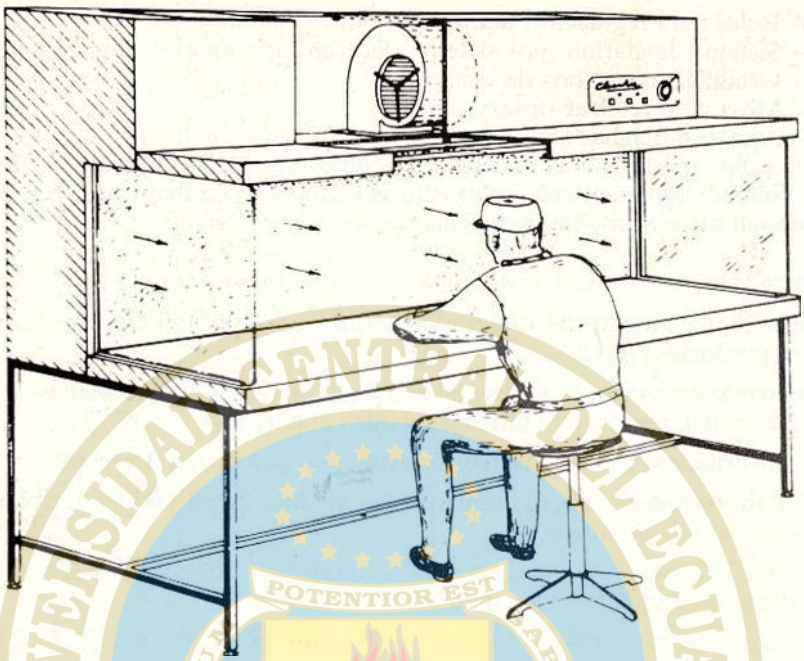


Figura 5.1 Cámara de flujo laminar (cámara de siembra estéril)

En las cámaras de flujo laminar (Fig. 5.1), el aire se toma del exterior, y se hace pasar a través de un filtro de poro muy fino, antes de que llegue a la mesa de la cámara de inoculación. Este sistema de filtrado asegura que el flujo del aire sobre la mesa es completamente estéril (este flujo, al ser laminar, da nombre a la cámara). Teniendo en cuenta que el flujo de aire es continuo, a través de la cámara de inoculación, es prácticamente imposible que ninguna partícula pase desde la habitación en la que se encuentra la cámara, a esta última. Cuando no se usa, la cámara puede ser cubierta con un plástico, quedando resguardada del aire exterior. El flujo de aire puede ser regulado, y en la parte superior de la cámara se disponen tubos fluorescentes para su iluminación. Se sitúa una llave de gas sobre la mesa para el flameado, para este fin también se puede utilizar un mechero de alcohol o un esterilizador seco. En este último proceso, el instrumento que se va a esterilizar se coloca durante un cierto tiempo en un aparato que contiene pequeñas bolas de cristal calientes, también llamado incinerador de bacterias.

Se recomienda que las cámaras de flujo laminar sean revisadas por un servicio técnico, una vez al año, y la mayor parte de los laboratorios prefieren hacer un contrato de mantenimiento con el suministrador.

En los laboratorios modernos las cámaras de flujo laminar se sitúan en una habitación especial (relativamente limpia) y aislada, que se mantiene estéril y libre de polvo por medio de filtros. La habitación se mantiene presurizada de manera que el aire no estéril del exterior no pueda entrar.

Los filtros de las cámaras de flujo laminar deben ser limpiados con aspiradora, de forma regular, y reemplazados anualmente (los filtros gruesos se ensucian de forma especial). El suelo de la habitación en la que se encuentra la cámara, debería ser descontaminado a diario, y se deberían usar en su interior calzas y batas de laboratorio limpias. Los visitantes del exterior son una fuente importante de infección (a través del calzado y del vestido). Otras indicaciones para el uso de una habitación de inoculación son: mantener la habitación tan limpia como sea posible, no introducir ningún material infectado, retirar los tubos u otros recipientes sospechosos de infección, tan pronto como sea posible, retirar de forma periódica la basura en bolsas de plástico, limpiar regularmente las mesas con alcohol de 96% (no utilizar alcohol de 70%, que deja gotas de agua), utilizando un paño de calidad que no deje residuos, retirar los medios infectados con esporas, cambiar de forma regular los instrumentos, no permitir la entrada a objetos o personas innecesarias, no utilizar nunca la cámara como almacén, lavarse de forma regular las manos y brazos con jabón y después con alcohol de 96%, colocar los instrumentos utilizados directamente en alcohol de 96%, o en el esterilizador seco, enchufar la cámara de flujo laminar 15 minutos antes de su uso, evitar la interrupción o inversión del flujo de aire, exponer la parte más vital de la cámara al flujo directo del aire estéril, y finalmente evitar introducir la cabeza (cabello), en el interior de la cámara. En algunos laboratorios se conectan lámparas ultravioleta durante la noche para desinfectar el aire.

Esterilización de los medios nutritivos

Introducción

Antes de que las semillas, porciones de plantas, órganos, tejidos, etc. sean colocados sobre el medio (inoculación), éste debe ser esterilizado, esto es, liberado de todos los micro-organismos. La esterilización se puede realizar de las siguientes formas:

1. Destrucción física de los micro-organismos por medio de aire seco y caliente, vapor o irradiación (luz UV o radiación gamma).

2. Destrucción química de los micro-organismos, utilizando compuestos esterilizantes (óxido de etileno, alcohol, hipoclorito, etc.) o antibióticos.

3. Eliminación física de los micro-organismos por filtración y/o lavado.

La esterilización de los medios nutritivos generalmente tiene lugar en un autoclave (olla a presión de gran tamaño), menos frecuentemente por filtración y rara vez por irradiación. Todos los métodos, así como sus ventajas y desventajas, se describen en el manual de Van Bragt *et al.* (1971).

Los medios nutritivos, así como cualquier otro material esterilizado, deben ser almacenados en armarios o cajas metálicas que hayan sido previamente desinfectadas con alcohol de 96%.

Autoclaveado

La mayor parte de los medios nutritivos se esterilizan en autoclave. Este aparato (literalmente: recipiente que se cierra a sí mismo), esteriliza por medio

de vapor. Siempre que el tiempo de exposición sea suficiente, el vapor a presión puede destruir todos los micro-organismos. Por ejemplo, un medio nutritivo con un volumen de hasta 50 ml se mantiene 20 minutos a 121°C, en vapor saturado a alta presión. El autoclave (Figs. 5.2 y 5.3) es un aparato caro, aunque se puede comprar de diferentes tamaños y estilos. Se puede elegir horizontal (se carga por el frente, Fig. 5.2), y vertical (se carga por arriba, Fig. 5.3). El autoclave horizontal es más simple en su uso, pero relativamente caro.

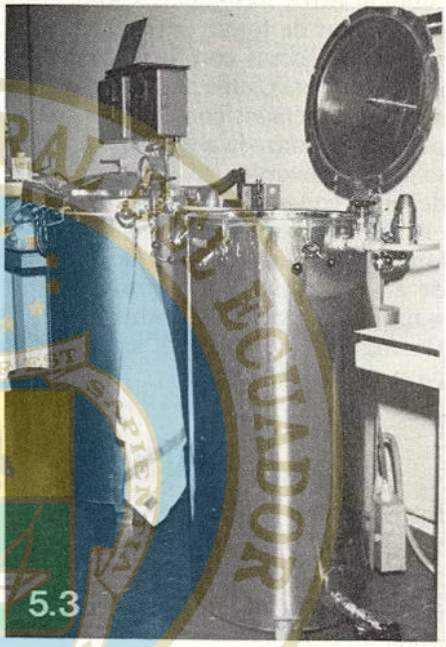


Figura 5.2 Autoclave horizontal (a la izquierda) para esterilización de medios nutritivos

Figura 5.3 Dos autoclaves verticales para esterilización de medios nutritivos

El autoclave tiene un rango de temperaturas entre 115 y 135° C. La esterilización depende de: Tiempo, presión, temperatura y el volumen del objeto que se va a esterilizar. Las ventajas del autoclave son: Velocidad, simplicidad, destrucción adicional de los virus y no adsorción (cosa que ocurre con la esterilización por filtrado). Las desventajas son: Puede producirse un cambio en el pH, algunos componentes se pueden separar, y se pueden producir reacciones químicas, que pueden conducir a una pérdida de actividad de los componentes del medio.

Orientaciones que se deben seguir cuando se usa un autoclave (N. B. el tiempo se empieza a contar cuando se alcanza la temperatura indicada):

1. Tubos de ensayo y matraces, conteniendo entre 20 y 50 ml de medio nutritivo: 20 min. a 121° C.
2. Matraces conteniendo 50-500 ml de medio nutritivo: 25 min. a 121° C.
3. Matraces conteniendo 500-5.000 ml de medio nutritivo: 35 min. a 121° C.
4. Tubos de ensayo vacíos, matraces y papel de filtro: 30 min. a 130° C.

Por seguridad, cuando se autoclavean frascos, no se deben disponer demasiado apretados entre sí, y deben colocarse con los tapones sin apretar.

El material que puede ser esterilizado en seco (tubos de ensayo, matraces y placas de Petri vacías, papel, instrumentos, etc.) requieren 2-3 horas de esterilización seca a 160° C.

Como se ha puesto de manifiesto, los medios nutritivos y los "objetos vacíos", como vidrio, papel, etc., deben ser esterilizados de forma separada. Lo mismo ocurre con los matraces grandes y pequeños. Hay que darse cuenta de que la penetración del calor es muy importante en un autoclave, y los volúmenes grandes deben ser en principio, esterilizados durante períodos de tiempo más largos, ya que el calor tarda más tiempo en llegar que en el caso de volúmenes más pequeños.

El autoclaveado produce la ruptura de las siguientes sustancias (Van Bragt *et al.*, 1971):

— Sacarosa: Se descompone produciendo fructosa y glucosa (un medio autoclaveado que contuviese sacarosa inicialmente, pasa a tener una mezcla de diferentes azúcares).
— Colchicina (Griesbach, 1981).
— Zeatina (ribósido).
— Acido giberélico: Pérdida del 90% en reactividad (Fig. 5.4).
— Vitamina B_1 (se forma pirimidina y tiazol), vitamina B_{12}, ácido pantoténico, vitamina C.
— Antibióticos.
— Extractos vegetales (pérdida de actividad).
— Enzimas.

Los medios utilizados para el cultivo de protoplastos (donde los requerimientos son más elevados que para el cultivo de callos o explantos), se esterilizan frecuentemente por filtración.

Durante y después del autoclaveado se debería tener en cuenta lo siguiente:

1. El pH de los medios baja 0,3-0,5 unidades.

2. El autoclaveado a una temperatura demasiado elevada puede caramelizar los azúcares, pudiéndose producir toxicidad.

3. Un proceso demasiado largo puede conducir a la precipitación de sales y al mismo tiempo despolimerizar el agar.

4. Se debe tener cuidado de utilizar la duración y temperatura correctas (presión eficaz). El *Bacillus stearothermophilis* puede ser utilizado como un indicador biológico (para ver si la esterilización se ha realizado correctamente), ya que muere por 12-15 min. a 121° C.

5. Se debe tener en cuenta que las sustancias volátiles pueden ser destruidas por el uso del autoclave (p. e., ethrel, etileno).

6. Si se requiere que la superficie del medio nutritivo tenga una cierta pendiente (p. e., en cultivo de embriones y cultivo de semillas de orquídea), al sacar del autoclave los tubos de ensayo, se colocan inclinados, hasta que se solidifica el agar (a una temperatura de 45-50° C).

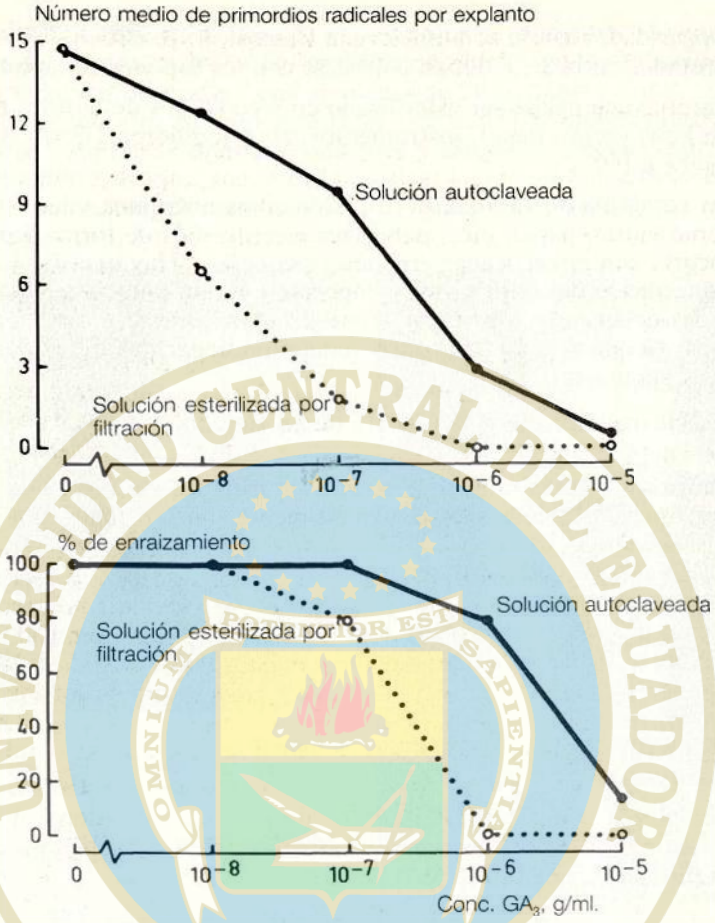


Figura 5.4 Efecto de soluciones de GA_3, esterilizadas por filtración y autoclaveadas, sobre la formación de raíces adventicias, inducidas por un tratamiento con auxina, sobre epicotilos de judía (*Phaseolus vulgaris*), cultivados *in vitro* (Van Bragt *et al.*, 1971)

7. Se recomienda el uso de agua desionizada en el interior del autoclave, ya que el agua corriente generalmente contiene demasiado calcio, que se puede precipitar sobre el fondo del autoclave y sus sistemas de control (control de nivel de agua y de presión).

En los últimos años han aparecido algunos aparatos en los cuales se puede preparar y esterilizar una cantidad específica (0,5-16 litros) de medio nutritivo. El medio es mezclado durante la esterilización, favoreciendo la disolución de sus constituyentes. El proceso de mezclado también facilita el calentamiento al principio, y luego el enfriamiento al terminar la esterilización. Después del autoclaveado, se añaden las sustancias termolábiles, que deben a su vez ser mezcladas con el resto del medio. El medio estéril se dosifica entonces en tubos de ensayo estériles, matraces, etc., en la cámara de flujo laminar. Estas

unidades de preparación y esterilización automática de medios pueden ser suministradas, p. e., por PBI International, Milán, Italia.

Esterilización por irradiación

La esterilización de medios nutritivos por irradiación (con rayos gamma), no se usa casi nunca en cultivo de tejidos, ya que resulta muy cara si se compara con el procedimiento habitual de autoclaveado. También resulta que, aunque la esterilización por rayos gamma es tan eficaz como la realizada en autoclave, el crecimiento vegetal que se obtiene es significativamente menor en los medios esterilizados de esta forma. Para más detalles ver el manual de esterilización de Van Bragt *et al.* (1971).

Cuando se esterilizan tubos, cajas u otros recipientes de plástico, donde la utilización del autoclave es imposible, se emplea casi siempre la esterilización por radiación gamma. Los medios esterilizados en autoclave se distribuyen entonces en los recipientes estériles, en la cámara de flujo laminar.

Esterilización por filtración

En la esterilización por filtración (las soluciones, medios líquidos, etc., pasan a través de un filtro de membrana) son retenidas todas las partículas, micro-organismos y virus que son mayores que el correspondiente poro del filtro. La mayor ventaja de este método es que las sustancias termolábiles (que se descomponen durante el autoclaveado), pueden pasar a través del filtro sin sufrir ninguna modificación. Las desventajas pueden ser: Adsorción de sustancias en el filtro, a veces algunos virus pueden atravesar el filtro y también que el procedimiento consume más tiempo y no es tan sencillo con el autoclaveado. Todas las dificultades sobre la esterilización por filtrado se pueden encontrar en el manual de Van Bragt *et al.* (1971).

La esterilización por filtrado se utiliza generalmente cuando se quiere añadir a un medio nutritivo una sustancia termolábil X. Se recomienda un filtro de nitrato o acetato de celulosa, con un diámetro de poro de 0,22 micras (µm). Primero se autoclavea en un matraz el medio básico sin X; mientras el medio permanece líquido (aproximadamente 45-50° C), se inyecta el líquido que contiene la sustancia X, con la ayuda de una jeringa hipodérmica que se acopla a un filtro de membrana (esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar). Se mezcla bien el medio, que ya contiene la sustancia X, y este medio nutritivo completo se distribuye en tubos de ensayo previamente esterilizados. También es posible filtrar un medio nutritivo completo que ya contenga la sustancia X.

Antes se utilizaba frecuentemente vacío en la esterilización por filtrado. El líquido se filtraba, bajo vacío, a través de una membrana, en un matraz Buchner, y se utilizaban en el proceso bombas de vacío. Hoy en día la solución que va a ser filtrada es ayudada, generalmente, por presión producida por aire o por la misma jeringa. Obviamente los componentes del filtro (soporte, filtro, aguja, etc.) deben ser esterilizados antes de su uso, por medio del autoclave, o con alcohol de 96 °C.

Se pueden presentar problemas en la esterilización por filtración si, por ejemplo, se requiere una concentración final de la sustancia X de 10 mg l^{-1} (a

SIB-UCE

partir de una solución stock con una concentración de 1.000 X), siendo la sustancia X poco soluble en agua. En este caso, 1 ml de la solución esterilizada por filtrado, conteniendo 10.000 mg l^{-1} de sustancia X, debería ser añadida a 1.000 ml de medio. Sin embargo, si esto no es posible (debido a la insolubilidad de X en el agua), entonces, se pueden pesar 10 mg de X, se esterilizan en éter y después de evaporar este último, se añade la sustancia al medio estéril.

Esterilización en la escuela y en el hogar

Un autoclave resulta generalmente demasiado caro para su uso en la escuela o en el hogar, sin embargo, se puede utilizar en su lugar una olla a presión que resulta mucho más barata. Los medios nutritivos se pueden esterilizar durante 30 minutos en una olla a presión (Fig. 5.5), si son volúmenes grandes, como, por ejemplo, matraces con agua o paquetes de papel de filtro, se pueden utilizar tiempos de 60-70 minutos.

Figura 5.5 Ollas a presión, que se pueden utilizar para la esterilización a pequeña escala, por los aficionados, en el hogar y la escuela.

Sala de preparación

Un laboratorio bien equipado necesita una sala de preparación, donde se debería disponer del siguiente material: autoclave, lavaplatos, desionizador y destilador de agua, y área de lavado (con agua corriente, caliente y fría). Resulta muy ventajoso si todos estos procedimientos húmedos pueden quedar localizados en una habitación. Sobre todo se recomienda la utilización del lavaplatos, ya que el lavado del vidrio a mano requiere una gran cantidad de tiempo.

Lavado del vidrio

Una vez que el material ha sido utilizado, debería ponerse en agua caliente, sobre todo si se han utilizado medios nutritivos sólidos, ya que si el agar se deja secar se pega en las paredes de los matraces y vasos, siendo luego mucho más difícil su limpieza. La limpieza debe hacerse tan pronto como sea posible para evitar que los medios se peguen a las paredes de los recipientes, etc. Después del lavado (preferiblemente con agua templada y jabón), con cepillo, el material de vidrio debe ser aclarado, primero con agua corriente y después con agua destilada o desionizada, finalmente se debe hacer un control para comprobar que está completamente limpio. El vidrio debe ser secado tan pronto como sea posible, para reducir las posibilidades de una infección posterior, ya que los micro-organismos necesitan agua para crecer y reproducirse.

Los tubos de ensayo se limpian de la siguiente manera: Primero se quita el tapón y se retira el agar y el material vegetal con un par de pinzas grandes. Después se lavan con agua corriente caliente, utilizando una escobilla que se ajuste bien al interior, limpiando bien las paredes. Obviamente es mucho más fácil utilizar un lavaplatos, el último aclarado se debe hacer con agua desionizada. Es mejor esterilizar el vidrio limpio antes de que se necesite otra vez, secándolo rápidamente y almacenándolo en condiciones estériles (boca abajo, en un armario limpio y libre de polvo).

Los robots en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales

En un reciente artículo de revisión De Bry (1986) ha planteado la pregunta: ¿Por qué no utilizar robots en un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales? El autor describe los robots en general (historia, desarrollo y clasificación), su estructura general y sistemas operativos, tipos de sensores, visión de los robots y también inteligencia de ordenadores e inteligencia artificial. Asimismo describe posibles aplicaciones (usos agrícolas, automatización del laboratorio y utilización en el cultivo de tejidos y células), los efectos potenciales de los robots (comparación de costes, actitudes de los investigadores frente a su uso), y nuevos desafíos. Este artículo contiene mucha información, y su lectura merece la pena para aquellos que estén interesados en las posibilidades de los robots para eliminar el trabajo desagradable, en los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales, en especial para propagación de plantas, y para conseguir una reducción de costes.

Un sistema robótico inteligente para la producción *in vitro* de plántulas ha sido descrito por Deleplanque *et al.* (1985); este sistema localiza las plántulas en su medio, y cogiéndolas las coloca en contenedores.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

6
PREPARACION Y COMPOSICION DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS

Introducción

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos:

1. La constitución génetica de la planta.
2. Nutrientes: Agua, macro y micro-elementos, y azúcares.
3. Factores físicos que influyen sobre el crecimiento: luz, temperatura, pH, concentraciones de O_2 y CO_2.
4. Algunas sustancias orgánicas: Reguladores, vitaminas, etc.

La constitución genética es un factor decisivo en todos los momentos de la vida de la planta, por ejemplo, determina si una planta es monocotiledónea o dicotiledónea, qué forma van a tener las hojas, qué temperatura es la óptima para el crecimiento y la floración, la forma y el color de las flores, si una planta forma frutos partenocárpicos (sin semillas), etc. La expresión de la constitución genética depende también de condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro*.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: Sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir *in vitro* o *in vivo*. También se deben añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones.

Los factores físicos ambientales tienen tanta importancia en el crecimiento y desarrollo *in vivo* como *in vitro*. Estos factores influyen prácticamente en todo tipo de procesos: Absorción de agua, evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, cuajado del fruto, etcétera.

El cuarto tipo de factor importante es el grupo de las sustancias orgánicas al que pertenecen los reguladores. Los reguladores, que se necesitan en míni-

mas concentraciones, regulan, por ejemplo, la distribución de todo tipo de sustancias en el interior de la planta y, por consiguiente, son responsables de la división celular, el crecimiento de las células, etc. Los reguladores, en particular las auxinas y citokininas, regulan el desarrollo de los órganos (regeneración) sobre partes de plantas (explantos), cultivados *in vitro*. También son muy importantes en el desarrollo de proembriones en cultivos en suspensión.

Es, por consiguiente, obvio que la regulación del crecimiento y desarrollo de una planta es un proceso complicado, que depende del genotipo y también del medio ambiente. Cuando se prepara un medio nutritivo, se deberían tener en cuenta, por tanto, las siguientes "interacciones":

1. Regulador-temperatura. La organogénesis puede estar basada en la disponibilidad (endógena o exógena) de auxinas y/o citokininas. Las concentraciones endógenas de auxinas y/o citokininas están a veces fuertemente influidas por la temperatura.

2. Luz/oscuridad-auxina. El ácido indolacético (IAA) se descompone más en la luz que en la oscuridad.

3. Genotipo-regulador. Mientras que unos genotipos requieren para su crecimiento y desarrollo altas concentraciones de reguladores, otros, en cambio, requieren bajas concentraciones. El potencial para la biosíntesis de una hormona en concreto está con frecuencia controlado genéticamente.

4. Azúcar-luz. A veces la luz y el azúcar pueden (de forma temporal) sustituirse entre sí. Esta sustitución también depende de la capacidad fotosintética *in vitro*.

Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales				
Agua				↑ pH ↓
Sustancias orgánicas	Macro elementos		Micro	
Azúcares Aminoácidos Vitaminas Reguladores: Auxinas Citokininas Giberelinas Acido abscísico Etileno	N P K Ca Mg S	Fe Zn B Mn Cu	Co Ni Al Mo I	
Mezclas de sustancias poco definidas	Extracto de levadura Leche de coco Extractos vegetales Hidrolizado de caseína Peptona y triptona			

Figura 6.1 Conjunto de sustancias, que se añaden con frecuencia a los medios nutritivos, para inducir el crecimiento y el desarrollo. Se trata de: agua, compuestos orgánicos (a la izquierda), compuestos inorgánicos (a la derecha), y un grupo de sustancias complejas de composición poco definida (abajo).

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
Facultad de Ciencias Agrícolas
BIBLIOTECA
Pct. 25 29

Un explanto, aislado *in vitro* y que crece y se desarrolla, necesita muchas sustancias que se representan esquemáticamente en la figura 6.1. Se puede observar que algunas de estas sustancias son también necesarias para el desarrollo *in vivo* (agua, macro y micro-elementos). Las sustancias orgánicas, y mezclas poco definidas y extrañas de sustancias que las plantas necesitan *in vitro,* no son necesarias en el cultivo *in vivo,* en otras palabras, una planta *in vitro* es heterotrofa. En cualquier caso se puede decir que para el cultivo *in vitro* se necesitan: agua, macro y micro-elementos, azúcar como fuente de carbono, y frecuentemente dos grupos de reguladores (auxinas y citokininas). Si falta alguno de estos componentes, lo normal es que no se produzca crecimiento y desarrollo, y que el tejido u órgano aislado muera. A veces el tejido aislado es capaz de biosintetizar un compuesto concreto, y así autoabastecerse de él. Si una planta *in vitro,* por ejemplo, no precisa auxinas, decimos de ella que es autotrofa para este tipo de sustancias.

Como se muestra en la figura 6.1, a veces se añaden a los medios mezclas poco definidas de sustancias, para inducir el crecimiento. Estas mezclas se usan cuando el investigador no conoce de forma precisa las necesidades nutricionales y hormonales. En la actualidad los medios nutritivos se hacen casi siempre a partir de una mezcla de sustancias sintéticas. Es evidente que encontrar un medio nutritivo equilibrado, apto para el crecimiento de los tejidos de una planta concreta (que no se haya descrito en la literatura), requiere una gran cantidad de tiempo. Si se necesita una mezcla de unos 20 compuestos diferentes, el encontrar las proporciones adecuadas es frecuentemente una cuestión de intento y error. Hay por supuesto, una gran cantidad de artículos (Gautheret, 1959; Gamborg *et al.*, 1976), sobre la composición general de los medios nutritivos, que pueden ser de una gran utilidad.

Si no se añade al medio ningún agente gelificante como el agar, se denomina medio líquido, en lugar de sólido. El uso del agar se trata en la Sección Agar.

Para las personas con poca experiencia es a menudo difícil elegir un medio nutritivo. ¿Qué medio elegir si no se dispone de referencias bibliográficas? De Fossard (1976) ha sugerido que se realice lo que se puede llamar un experimento de amplio espectro. En este caso llegó a la conclusión de que 4 grupos de componentes eran frecuentemente vitales en el medio nutritivo: Azúcares, macro-sales, auxinas y citokininas. Como las necesidades del vegetal con el que se experimenta no se conocen de antemano, estos cuatro grupos de sustancias se varían en 3 concentraciones (baja, media y alta):

1. Azúcar (sacarosa): 1-2-4%.
2. Macro-sales (de acuerdo con Murashige y Skoog, 1962): Diluida 1/4-1/2-1/1.
3. Auxina (p.e., IBA): 0,01-0,5-5,0 mg l^{-1}.
4. Citokinina (p.e., BA): 0,01-0,5-5,0 mg l^{-1}.

Como cada uno de los cuatro compuestos se prueba en tres concentraciones, finalmente se obtienen 3^4=81 combinaciones, de las que se elige la óptima. Después es necesario realizar un experimento más importante; si, por ejemplo, en el primer experimento la concentración de auxina óptima fue de 0,5 mg l^{-1}, la siguien-

te serie de auxina que se deberá probar será: 0,05-0,1-0,3-0,5-0,8-1,0-1,5 mg l^{-1}.

Otra aproximación experimental al ensayo en gran escala de medios de cultivo, es la técnica llamada MDA (múltiple-drop-assay, ensayo de gota múltiple). Esta técnica se aplica particularmente a protoplastos de *Nicotiana* y *Petunia*, y a protoplastos de mesófilo de cereales (Harms, 1984). Esta técnica utiliza pequeñas gotas de 40 µl como unidad experimental.

Material de vidrio y plástico

El cultivo *in vitro* se puede llevar a cabo, en principio, en recipientes de variadas formas y tamaños, de vidrio o de plástico. El vidrio tiene la ventaja de que es más duradero y puede ser autoclaveado. El plástico tiene normalmente una vida limitada (hay plásticos baratos que se utilizan una sola vez), y no siempre se puede usar en el autoclave. El plástico que puede ser autoclaveado es mucho más caro. Su duración depende de su resistencia al calor (autoclave, lavaplatos), y a los detergentes. El plástico tiene también la desventaja de que produce etileno, que puede producir efectos perjudiciales si se acumula.

Existe un amplio rango de tipos de vidrio, que pueden producir importantes efectos fisiológicos. En investigación es aconsejable utilizar vidrio Pyrex o un vidrio similar de borosilicato. El vidrio barato, de poca calidad, puede liberar al medio cationes tóxicos, como por ejemplo sodio, plomo y arsénico. El vidrio Pyrex se recomienda expresamente para el trabajo con protoplastos, cultivo de células aisladas y cultivo de meristemos.

En la horticultura práctica, se ha demostrado que no es necesario el uso de material caro, de vidrio Pyrex. Generalmente se puede utilizar material de vidrio barato, sin que se produzca ningún daño. Este hecho tiene importantes repercusiones económicas. También se utiliza en esos casos gran cantidad de plástico. Teniendo en cuenta que los recipientes de plástico pueden quedar herméticamente cerrados, se debe tener cuidado de que no se produzca una excesiva acumulación de CO_2 o etileno.

Para el cultivo de tejidos se utiliza el siguiente material de vidrio:

1. Tubos de ensayo (a veces con tapón de rosca).
2. Placas de Petri.
3. Matraces Erlenmeyer (para medios sólidos y líquidos).
4. Los llamados "matraces Steward" (ver Fig. 6.2).
5. En la horticultura práctica se llegan a utilizar botellas de leche o de zumos, frascos de conservas, etc.

En los laboratorios comerciales de cultivo de tejidos, se usa, especialmente para propagación, todo tipo de recipientes de plástico, como tubos, cajas, etc. Cuando el plástico no es susceptible de ser autoclaveado, se empaqueta en bolsas de plástico (sin medio), se cierra herméticamente y se esteriliza por radiación gamma. Un medio previamente esterilizado puede ser distribuido en estos recipientes, en una cámara de flujo laminar.

La forma y el tamaño del material de vidrio (plástico) pueden tener importantes consecuencias. Como un ejemplo extremo se pueden comparar un tubo de ensayo, con una caja de Petri. El tubo de ensayo contiene un volumen

Figura 6.2 Frascos de Steward con "pezones". Las células y agregados celulares quedan sumergidos de forma periódica, al producirse la rotación.

relativamente grande y poca superficie, resultando una aireación y secado escasos, y, por tanto, una baja probabilidad de contaminación. Por otro lado, la placa de Petri tiene relativamente un pequeño volumen y una gran superficie, con lo que se seca antes y tiene más probabilidades de contaminación. Es, por consiguiente, más importante sellar las placas de Petri (con parafilm, etc.), que los tubos de ensayo.

En general, se puede decir que los cultivos en matraces grandes crecen y se desarrollan mejor (se propagan) que en matraces pequeños. Esto se debe probablemente a:

1. Al ser mayor el volumen, los gases tóxicos producidos (CO_2, etileno, etc.) quedan más diluidos.

2. Se dispone de mayor cantidad de medio nutritivo.

Pierik y Bouter (datos no publicados) han llegado a la conclusión, recientemente, que las plántulas de *Phalaenopsis* crecen mucho mejor en tarros de vidrio que en tubos de ensayo.

Preparación

Un gran número de sustancias o mezclas de sustancias se añaden a los medios nutritivos. Es aconsejable utilizar una espátula por cada sustancia, para evitar la contaminación. Los compuestos que no llegan a utilizarse, no deben nunca ser devueltos a sus envases. La concentración de una determinada sustancia puede expresarse de diferentes formas. Las siguientes expresiones son generales:

— Porcentaje en volumen: Se usa para la leche de coco, jugo de tomate, etc.; 5% de leche de coco, quiere decir 50 ml añadidos a 950 ml de agua.
— Porcentaje en peso: Se utiliza para el agar y azúcares; 2% quiere decir 20 g del aditivo por cada 1.000 g (un litro), de medio nutritivo.
— Molar: 0,01 M significa 1/100 de mol por litro (1 mol es el peso molecular expresado en gramos). Se utiliza frecuentemente con reguladores.
— Microgramo por litro: 1 µg l^{-1} es equivalente: a 0,001 mg l^{-1}.
— Partes por millón (ppm): 1 parte por millón equivale a 1 mg l^{-1}.

En relación con lo anterior, la concentración de una sustancia particular en un medio, se puede considerar en principio de dos formas:

1. *Unidades de peso:* p.e., mg l^{-1} o g l^{-1}. En la bibliografía una concentración de 1 g l^{-1} puede venir como 10^{-3}, y una concentración de 1 mg l^{-1} como 10^{-6}. Esta puede también ser dada como ppm: 1 parte por millón equivale a 10^{-6} o 1 mg l^{-1}.

Los fisiólogos piensan que las unidades de peso no son aceptables, ya que resulta incorrecto comparar la actividad fisiológica de 1 mg l^{-1} de IAA y 1 mg l^{-1} de IBA. La comparación correcta sería entre 1 µM de IAA y 1 µM IBA, ya que un 1 µM IAA contiene el mismo número de moléculas que 1 µM de IBA, cosa que no ocurre con 1 mg l^{-1} de IAA y 1 mg l^{-1} de IBA. Esto se debe a que el peso molecular del IAA no es el mismo que el del IBA, por tanto, con la mayor parte de las sustancias, y desde luego con los reguladores, la concentración debería darse en principio como concentración molar.

2. *Concentración molar* (M), milimolar (mM) o micromolar (µM): Una solución molar (M) contiene por litro el número de gramos de sustancia que indica su peso molecular; 1 milimolar (mM) es 10^{-3} M y 1 micromolar (µM) es 10^{-6} M o 10^{-3} mM.

Ya que la concentración Molar está siendo cada vez más usada en cultivo de tejidos vegetales, se dan a continuación algunos ejemplos.

El peso molecular de la auxina IAA es de 175,18.
Una solución 1 M de IAA contiene 175,18 g por litro.
Una solución 1 mM de IAA contiene 0,17518 g por litro = 175,18 mg l^{-1}.
Una solución 1 µ de IAA contiene 0,00017518 g por litro = 0,17518 mg l^{-1}.

La conversión de mg l^{-1} a (mili) molar, y al revés se hace de la siguiente forma para el $CaCl_2.2H_2O$. El peso molecular de esta sustancia es: 40,08 +

2 x 35,453 + 4 x 1,008+2 x 16,00 = 147,018 (ya que los pesos atómicos del Ca, Cl, H y Oxígeno son: 40,08; 35,453; 1,008 y 16,000 respectivamente). El número de mmol de $CaCl_2.2H_2O$ por litro, se halla dividiendo el número de miligramos de la sustancia por litro, por el peso molecular de la misma (incluyendo el agua de cristalización), p. e. 440 mg l^{-1} $CaCl_2.2H_2O$ = 440/147,018 = 2,99 mM $CaCl_2.2H_2O$. Y al revés: 2,99 mM $CaCl_2.2H_2O$ = 2,99 x 147,018 = 440 mg l^{-1} de $CaCl_2.2H_2O$. De estos cálculos se desprende que no es necesario conocer el número de moléculas de agua de cristalización, cuando se utilizan concentraciones molares o milimolares.

Para comparar dos medios diferentes, de una forma correcta, es necesario pasar de miligramos por litro a milimoles por litro; esto se realiza de la siguiente forma:

El medio X contiene	*El medio Y contiene*
1650 mg l^{-1} NH_4NO_3	500 mg l^{-1} NH_4NO_3
1900 mg l^{-1} KNO_3	500 mg l^{-1} KNO_3
440 mg l^{-1} $CaCl_2.2H_2O$	347 mg l^{-1} $Ca(NO_3)_2$
Si lo calculamos como mmoles, cada litro tendrá:	
20,6 mM NH_4NO_3	6,25 mM NH_4NO_3
18,8 mM KNO_3	4,95 mM KNO_3
2,99 mM $CaCl_2.2H_2O$	2,11 mM $Ca(NO_3)_2$
Calculado para los diferentes iones:	
20,6 mM NH_4^+	6,25 mM NH_4^+
39,4 mM NO_3^-	15,42 mM NO_3^-
18,8 mM K^+	4,95 mM K^+
2,99 mM Ca^{2+}	2,11 mM Ca^{2+}
5,98 mM Cl^-	0 mM Cl^-
60,0 mM N total	21,67 mM N total

Por los cálculos indicados más arriba, se ve que el medio X tiene aproximadamente 3 veces la cantidad de nitrógeno (NO_3^- y NH_4^+), que tiene el medio Y.

Los medios nutritivos se deben preparar como se indica a continuación: Se coloca un matraz sobre la unidad calefactora. Aproximadamente se deben calentar 550 ml de agua, si se quieren preparar 600 ml de medio nutritivo. Se añade la cantidad de azúcar necesaria (mientras se realiza esta operación, se debe retirar el matraz de la manta calefactora). Añadir las macro y micro-sales y luego las auxinas y/o citokininas u otros componentes. Mezclar las sustancias bien, hasta su completa disolución y hacer hervir el medio. Añadir el agar necesario, utilizando un embudo, teniendo cuidado de que después de cada adición no se formen grumos o espuma. También se puede mezclar previamente en un vaso, el agar con agua fría, y posteriormente añadir esta mezcla al medio. El agar no se debe añadir al agua, cuando ésta está hirviendo, ya que, en este caso, se puede producir un recocido del medio de efectos negativos. Finalmente se añade agua hasta 600 ml. El pH se mide con papel de tornasol, o un pH-metro y se ajusta si es necesario. El pH debería ser 6,0 una vez que se han añadido todos los componentes y se lleva a su volumen definitivo. Con

este medio se pueden llenar tubos de ensayo, matraces etc. Los tubos de ensayo y los matraces Erlenmeyer se llenan generalmente hasta un tercio de su capacidad. Se utiliza un matraz de Büchner para distribuir el medio nutritivo en los tubos de ensayo, evitando el contacto con las paredes y el exterior. Los puntos que se indican a continuación son importantes para la preparación de los medios:

1. Siempre que sea posible utilizar reactivos analíticos, pesarlos utilizando una espátula limpia y una balanza suficientemente sensible.

2. Algunas veces puede ser interesante, por razones económicas, utilizar medios preparados por casas comerciales (ver Sección Medios preparados comerciales).

3. El agar y el azúcar se pueden pesar en el momento de ser utilizados, pero los micro- y macro-nutrientes deben tomarse a partir de soluciones madre. Las soluciones madre de reguladores y vitaminas generalmente se preparan cada vez que se van a utilizar.

4. Las soluciones madre que se almacenan a bajas temperaturas presentan a veces un precipitado. Esto puede producir problemas, ya que si se redisuelve por ebullición, parte del agua se pierde.

5. Si se produce un fuerte crecimiento durante algunas semanas, ciertos nutrientes pueden agotarse y por tanto se debe llevar a cabo un repicado.

6. Calentar un medio con la ayuda de vapor (en lugar de hervirlo), para disolver el agar, es más seguro y produce menos descomposición química.

7. Las sustancias termolábiles (soluciones) deben ser añadidas a través de filtros de esterilización, una vez que el medio básico ha sido autoclaveado y posteriormente enfriado a 45-50°C.

Resulta difícil recomendar un medio, ya que su elección depende de muchos factores:

1. La especie con la que se trabaja. Algunas son muy sensibles a la sal, mientras que otras pueden tolerar altas concentraciones. Algunas especies reaccionan a la adición de vitamina B_1 y otras no. La necesidad de reguladores, especialmente auxinas y citokininas es muy variable, etc.

2. La edad de la planta: Los tejidos juveniles pueden regenerar raíces sin auxinas, mientras que los tejidos adultos precisan de este regulador.

3. La edad del órgano. Los órganos jóvenes (con división celular activa) tienen diferentes necesidades hormonales que otros tejidos.

4. El tipo de órgano que se cultiva: En el caso de las raíces la vitamina B_1 es imprescindible.

5. La necesidad de reguladores para un cultivo en suspensión, es más pequeña si el callo se ha desarrollado durante un período largo de tiempo.

6. Cada proceso *in vitro* tiene sus necesidades específicas. Por ejemplo: Las raíces adventicias por lo general sólo se producen en la presencia de auxina, mientras que los vástagos adventicios aparecen por la adición de citokinina.

Cuando las necesidades nutritivas de una planta no son conocidas, se puede utilizar la mezcla de macro- y micro-nutrientes de Murashige y Skoog (1962), siempre que la planta no sea sensible a una alta concentración salina. Si las plantas son ligeramente sensibles a la salinidad, se puede elegir la solución de macro- y micro-elementos de Heller (1953). Si la especie con la que se trabaja es muy sensible a la salinidad, se puede utilizar la solución Knop (1884). El azúcar que se utiliza más generalmente es la sacarosa en la proporción de 2-3%. Si se utiliza medio sólido, se añade Bacto agar Difco, al 0,7%, como agente gelificante. No es fácil dar unas normas generales en cuanto a la adición de auxinas y citokininas, de todas maneras este aspecto se trata en el apartado Reguladores. El uso de vitaminas y otras sustancias se trata respectivamente en los apartados Vitaminas y Otros compuestos

Composición

Agua

Se debe prestar una gran atención a la calidad del agua, ya que constituye el 95% del medio nutritivo. Para los trabajos de investigación se recomienda que el agua haya sido destilada en vidrio Pyrex, y en el caso de trabajar con protoplastos, células o meristemos, se debe utilizar agua bidestilada. Para asegurarse de que se produce un agua destilada de buena calidad, y de forma eficaz, se debe limpiar el aparato de destilación de forma periódica, para evitar los depósitos sobre las paredes, antes de su uso el destilador debe aclararse con agua desionizada. Para evitar el paso de partículas desde el desionizador al destilador, se puede intercalar un filtro.

En los últimos años se ha utilizado también agua purificada por ósmosis inversa; este sistema se combina con otros métodos como desionización, destilación y filtración.

El mejor lugar para almacenar el agua son recipientes de polietileno, ya que el vidrio contiene frecuentemente trazas de plomo, sodio y arsénico que pueden pasar al agua. Si se utiliza vidrio para almacenar el agua, debe ser de tipo Pyrex. Los recipientes para almacenar el agua, deben ser limpiados de forma especialmente escrupulosa.

El agua corriente no debe ser utilizada ni siquiera por los aficionados o en el trabajo escolar. Cuando no se puede utilizar agua destilada, se debe sustituir por desionizada, aunque teniendo en cuenta que ésta puede tener contaminantes orgánicos, o incluso micro-organismos. Sin embargo, el agua desionizada se utiliza frecuentemente en prácticas elementales, en las que se cultivan *in vitro* grandes explantos.

Agar

El agar es un derivado de un alga marina, que se obtiene en forma de píldora, y que se usa como agente gelificante en la mayor parte de los medios nutritivos. Aunque se trata de un producto natural, se lava y purifica durante su elaboración, de manera que prácticamente no contiene materiales tóxicos. El agar es un polisacárido con una elevada masa molecular, que tiene capaci-

dad para gelificar los medios. Resulta, con facilidad, el componente más caro de los medios nutritivos sólidos.

El agar disuelto forma un gel que es capaz de retener el agua (cuanto mayor es la concentración de agar, mayor es la fuerza con la que el agua es retenida), y adsorber compuestos. Si la concentración de agar se incrementa, cada vez resulta más difícil para los explantos establecer contacto con el medio, con lo que se limita la absorción de los compuestos.

Generalmente se utiliza Bacto agar Difco, a una concentración de 0,6-0,8%, otras formas de agar (como Gibco Phytagar, Flow agar, etc.) se van haciendo cada vez más populares. A veces se utiliza el agar Noble Difco o el agar Difco purificado, aunque en la mayor parte de los casos no es necesario. Cuando se cultivan protoplastos o células aisladas se utiliza un tipo de agar, caro y de gran pureza como la agarosa (Sea Prep o Sea Plaque de Marine Colloids).

Se encuentran pocas diferencias cuando se comparan distintos tipos de agar (distintos fabricantes). Roberts *et al.* (1984), compararon el efecto de seis tipos diferentes de agar, en la diferenciación de los elementos traqueales de explantos de *Lactuca*. No se encontraron diferencias significativas en el número de elementos traqueales, utilizando Bacto agar Difco, Phytagar Gibco y Flow agar; sin embargo se produjeron más elementos traqueales al usar agar KC-TC. En presencia de las dos agarosas FMC (Sea Prep y Sea Plaque), se diferenció un número de elementos traqueales significativamente más bajo, que cuando se utilizaron otros tipos de agar.

Hay que tener en cuenta que el agar contiene contaminantes orgánicos e inorgánicos (Romberger y Tabor, 1971), como se muestra en la siguiente tabla para agar Difco (datos de Difco, 1984).

	Bacto-Agar	*Agar Noble*	*Agar Purif.*
Cenizas	4,50%	2,60%	1,75%
Calcio	0,13%	0,23%	0,27%
Bario	0,01%	0,01%	0,01%
Sílice	0,19%	0,26%	0,09%
Cloruro	0,43%	0,18%	0,13%
Sulfato	2,54%	1,90%	1,32%
Nitrógeno	0,17%	0,10%	0,14%

Un análisis del fabricante muestra que el Bacto agar Difco también contiene 0,0-0,5 de cadmio; 0,0-0,1 de cromo; 0,5-1,5 de cobre; 1,5-5,0 de hierro; 0,0-0,5 de plomo; 210,0-430 de magnesio; 0,1-0,5 de manganeso y 5,0-10,0 de zinc (lo anterior en ppm).

La concentración usual para el agar es 0,6-0,8%. Si se utiliza una concentración más baja (0,4%), el medio nutritivo permanece sin cuajar, sobre todo cuando el pH es bajo. Si la concentración es muy alta (1,0%), el medio nutritivo queda muy sólido, haciendo difícil la inoculación. Si se utiliza una concentración del 0,6%, y el medio no adquiere rigidez, debe corregirse el pH; si el

pH es más bajo que 4,5-4,8, un medio con 0,6% de agar no gelifica adecuadamente.

El crecimiento *in vitro* puede ser afectado de forma negativa si la concentración de agar es demasiado elevada (Stolz, 1967). El tipo de agar también afecta al crecimiento y desarrollo (Debergh, 1983). Cuanto mayor es la calidad y la pureza del agar, mejor gelifica. Existen las siguientes alternativas al agar:

1. Polímeros sintéticos (Gas *et al.*, 1971), como el biogel P200 (píldoras de poliacrilamida).

2. Alginatos, para el cultivo de protoplastos vegetales (Mbanaso y Roscoe, 1982).

Figura 6.3 Cultivo *in vitro* de explantos del tallo de *Rhododendron* "Catawbiense album", sobre un medio líquido. Los explantos han sido colocados de forma apolar (con sus porciones basales hacia arriba), sobre un hueco practicado en un bloque de espuma de plástico. Se apreció la formación de callo y raíces adventicias, sobre las porciones basales de los explantos. Fotografía tomada ocho semanas después del aislamiento.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
FUNDADA EN 1620
QUITO

3. Un estabilizador de sustrato derivado de agregados cristalíticos de celulosa (CCA), ha sido descrito por George *et al.* (1983), y es particularmente útil en la fase de enraizamiento de cultivos de coliflor.

4. Gelrite (nombre comercial de Merck, EE UU, una división de Kelco), que es un agente gelificante altamente purificado.

Se trata de un heteropolisacárido aniónico, natural, que forma geles semejantes al agar, quebradizos y rígidos, en presencia de sales solubles. El gelrite es un polisacárido compuesto de ácido glucurónico, ramnosa, glucosa y residuos O-acetil. La rigidez del gel de gelrite depende en gran medida del tipo de sal añadida; los cationes divalentes como el magnesio (0,1% $MgSO_4.7H_2O$), o el calcio, producen mucho más efecto en la rigidez del gel, que los iones monovalentes como el sodio o el potasio. El gelrite requiere el concurso del calor y la presencia de cationes para que tenga lugar la gelificación.

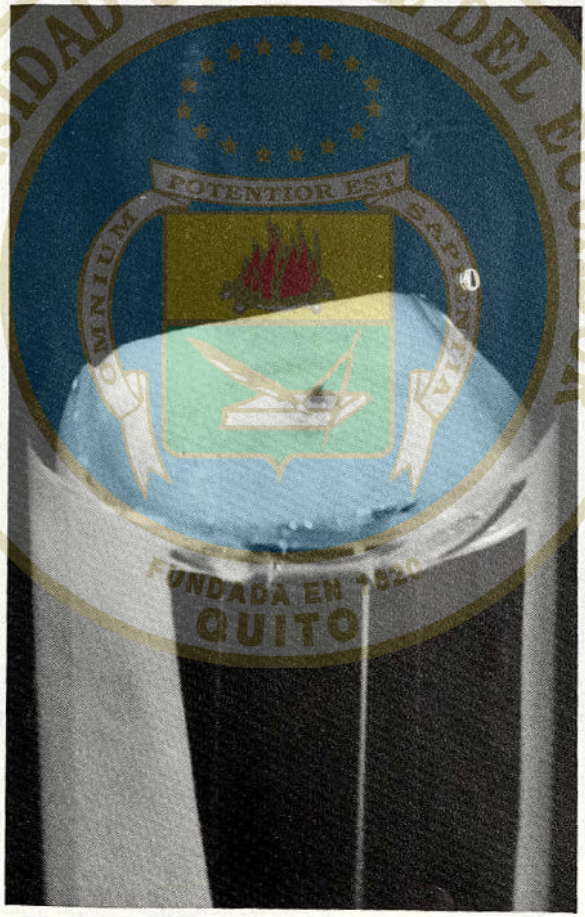


Figura 6.4 Cultivo de un protocormo de la orquídea *Cattleya aurantiaca*, sobre un puente de papel de filtro, que está humedecido por el líquido contenido en el tubo de ensayo. La parte superior del papel de filtro se mantiene justo por encima del nivel del medio líquido.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1826
QUITO

El gelrite se puede usar a una concentración aproximadamente mitad de la que se usa para el agar; para el cultivo de tejidos vegetales se recomienda una concentración del 0,2%. Los geles de gelrite son notablemente más claros que los de agar, y también cuajan más rápidamente. Según el fabricante el gelrite no contiene contaminantes (p. e. compuestos fenólicos), que pueden ser tóxicos. Para más detalles consultar Halquist *et al.* (1983).

5. Cooke (1977a), también usó un sustituto del agar (polímero del almidón), para el cultivo de ápices del vástago de *Nephrolepis exaltata*. Este sustituto del agar (concentración 12 g l^{-1}), se puede disolver en el agua sin necesidad de calentar.

6. También se puede usar un medio líquido sin agar, utilizando como soporte espuma de plástico limpia (Fig. 6.3), o lana de vidrio o mineral.

7. También se puede producir el crecimiento sobre un puente de papel de filtro, cuya superficie superior queda suspendida sobre un medio líquido (Fig. 6.4). Este sistema fue desarrollado por Heller (1953).

8. También se puede utilizar medio líquido y pequeñas bolas de vidrio como soporte de los explantos.

9. En lugar del agar se puede usar una esponja de viscosa, situada debajo de papel de filtro y medio líquido. Las ventajas de la viscosa son, de acuerdo con Wersuhn y Fritze (1985):

— Se puede usar varias veces.
— Facilita una prospección amplia.
— El repicado se puede realizar sin cambiar el recipiente.
— Las plantas se pueden transferir más fácilmente al suelo.
— Se necesitan cantidades más pequeñas de productos químicos.

10. Cuando se utiliza un medio sin soporte para el anclaje del material, las células, tejidos, etc., quedan sumergidos y entonces se precisa una buena aireación, la cual se consigue con un agitador, cuyo uso se describe con más detalle en el Capítulo 12.

En los últimos años el uso de los medios llamados de 2-fases, se ha hecho bastante habitual, se trata de una fase sólida y otra líquida, en las cuales se combina una alta tasa de multiplicación con una más baja sensibilidad a la vitrificación. Un medio de 2-fases se hace de la siguiente manera: Primero se hace un medio sólido en el que se inoculan los explantos, y posteriormente se añade una capa de medio líquido. Los explantos quedan así, en parte en el agar sólido, en parte en el medio líquido, y en parte en el aire. La composición de la fase líquida del medio puede ser cambiada con facilidad, por ejemplo para inducir elongación del vástago.

La decisión de elegir un medio sólido o líquido depende de lo siguiente:

1. ¿Es la planta con la que experimentamos capaz de crecer en un medio líquido? Mientras que algunas especies crecen mal en medio líquido, otras lo prefieren (por ejemplo Bromeliáceas).

2. Si resulta posible el cultivo en medio líquido, se debe considerar a continuación el problema de la aireación. La mayor parte de las plantas, especial-

mente si crecen sumergidas, necesitan una buena aireación. Esto se hace posible cultivando el explanto parcialmente sumergido, y si se necesita una inmersión total utilizando un agitador. Si se utiliza este último aparato para el crecimiento de células, tejidos, etc., se debe tener en cuenta el daño que esta agitación puede producir. Por otra lado, el crecimiento y desarrollo en un medio líquido resulta frecuentemente muy bueno, ya que las plantas sumergidas pueden absorber los nutrientes, reguladores, etc., por toda su superficie, mientras que en el agar sólo existe un contacto basal. El crecimiento sobre medio líquido también implica que cualquier exudado de la planta se diluye con más facilidad que en el agar, donde pueden producirse acumulaciones locales.

3. El crecimiento y la diferenciación de órganos pueden ser completamente distintos, según que el medio sea líquido o sólido. Si el callo de *Anthurium andreanum* se cultiva en medio líquido, apenas se forman raíces adventicias, en contraste con su formación en medio sólido. Si se cultivan vástagos de bromeliáceas o *Nepenthes in vitro*, el desarrollo de vástagos axilares es mucho mejor si se utiliza un medio líquido.

4. Tanto los medios líquidos como los sólidos pueden producir una condición fisiológica que se llama vitrificación (Anónimo, 1978a; Debergh, 1983; Ziv y Halevy, 1983; Ziv, 1986).

En la literatura la vitrificación se denomina también: Translucidez, hiperhidratación, transformación hiperhídrica, glaucosidad, encharcamiento, vitrosidad. La vitrificación aparece especialmente en las plantas que disponen de una gran cantidad de agua, como ocurre en los medios líquidos o con baja concentración de agar. Se ha descrito en *Malus* y *Prunus* (Anónimo, 1978a), en clavel (Ziv y Halevy, 1983), y en alcachofa (Debergh *et al.*, 1981).

La presencia y grado de vitrificación está influida por muchos factores complejos:

1. Aumentando la concentración de agar y/o azúcar generalmente disminuye la vitrificación en clavel y alcachofa.

2. Se puede evitar en algunos casos, con un mejor intercambio gaseoso en los recipientes de cultivo.

3. Está asociada con altos niveles de citokininas (Hussey, 1986).

4. Es promovida por una baja irradiancia lumínica y por altas temperaturas.

5. Puede ser promovida por una esterilización demasiado intensiva.

6. Algunos tipos de agar son más susceptibles a la vitrificación, se debería evitar el uso de estos productos.

7. Se puede disminuir la vitrificación en algunos casos, cambiando la mezcla de macro-sales. El cambio del medio MS al medio Lepoivre resuelve los problemas de vitrificación con *Malus* y *Prunus*.

8. El material joven y tierno es más susceptible a la vitrificación.

9. La utilización de medios con 2 fases, a veces disminuye o impide completamente la vitrificación.

En general se puede concluir, a partir de los trabajos de Debergh (1983) y Ziv y Halevy (1983), que la vitrificación es fundamentalmente el resultado de un exceso de humedad en el tubo de crecimiento, escasa concentración de agar en el medio sólido, o crecimiento en medio líquido. Debergh (1983) prestó una gran atención al fenómeno de la vitrificación y llegó a la conclusión de que si se eleva la concentración de agar (para evitar aquel fenómeno):

1. La vitrificación disminuye como consecuencia de una menor absorción de agua.

2. Se dificulta la multiplicación de vástagos axilares.

3. Se cambia el potencial matricial del medio (la absorción de agua se hace más difícil).

4. El explanto tiene un contacto con el medio menos eficiente (dificultando la absorción de agua).

5. La disponibilidad de los macro- y micro-elementos (del medio) cambia dependiendo de la concentración del agar.

Azúcar

El azúcar es un componente muy importante en cualquier medio nutritivo, y es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en oscuridad. Los tejidos verdes no son suficientemente autotróficos *in vitro*. También la concentración del CO_2 en el tubo de ensayo puede ser un factor limitante para la fotosíntesis (Gibson, 1967) y en la práctica es muy difícil y caro suministrar el anhídrido carbónico. A veces, como resultado de un intercambio gaseoso pobre, la concentración de CO_2 en los tubos o recipientes puede llegar a ser demasiado alta y hacerse tóxica.

Generalmente se usa una concentración de 1-5% de sacarosa (un disacárido), ya que este azúcar se sintetiza y se transporta de forma natural por las plantas. También se pueden utilizar glucosa y fructosa. La concentración de azúcar depende mucho del tipo y edad del material vegetal; por ejemplo, los embriones muy jóvenes requieren concentraciones de azúcar relativamente altas. Generalmente el crecimiento y desarrollo aumentan con la concentración de azúcar, hasta que se alcanza un óptimo, disminuyendo después para muy altas concentraciones (Fig. 6.5). El crecimiento de plantas completas, como las plántulas de orquídea, es también fuertemente influido por la concentración de azúcar (Fig. 6.6).

La sacarosa que se vende en los supermercados resulta generalmente adecuada. Se trata de un producto purificado, y de acuerdo con los análisis de los fabricantes se compone de 99,94% de sacarosa, 0,02% de agua y 0,04% de otras sustancias (elementos inorgánicos, y también rafinosa, fructosa y glucosa). No existe ninguna indicación de que estos últimos constituyentes puedan causar toxicidad *in vitro*.

Como se vio en el apartado autoclaveado, los azúcares pueden sufrir cambios cuando son autoclaveados, el pH puede jugar un importante papel (ver apartado pH). Es importante además tener en cuenta, que durante el cultivo

Figura 6.5 Efecto de la concentración de glucosa sobre la formación de vástagos adventicios, en callo de *Begonia venosa* (Pierik y Tetteroo, 1986). Fotografía tomada 12 semanas después del aislamiento.

de tejidos (por ejemplo en el cultivo de raíces), los azúcares pueden cambiar en el medio: por hidrólisis de la sacarosa por la acción de la invertasa (de las paredes celulares), o por la acción de enzimas extracelulares (Burstrom, 1957; Weston y Street, 1968). También en los cultivos de callos se puede producir una alteración en la composición de los azúcares del medio (George y Sherrington, 1984). En estas circunstancias, la existencia o inexistencia de IAA en el medio resulta de gran importancia. Algunos azúcares pueden ser hidrolizados por los tejidos de las plantas. Maretzki *et al.* (1971) demostraron que la hidrólisis extracelular del almidón puede tener lugar durante el crecimiento de suspensiones celulares de azúcar de caña.

Es difícil saber si el autoclaveado de los azúcares es aconsejable o no en el cultivo *in vitro*. Las referencias bibliográficas son contradictorias en este senti-

Figura 6.6 La concentración de sacarosa tiene gran influencia sobre el crecimiento *in vitro* de las plántulas de híbridos de *Phalaenopsis* (Pierik y Van Nieuwkerk, datos no publicados). Fotografía tomada 14 semanas después del aislamiento.

do, en algunos casos resulta aconsejable (Ball, 1953), mientras que en otros casos no lo es (Stehsel y Caplin, 1969).

Nutrición mineral

Después de los azúcares, los minerales constituyen el grupo más importante de sustancias nutritivas en el cultivo *in vitro*. Existe una gran cantidad de posibilidades para las mezclas de macro- y micro-nutrientes. Las mezclas más importantes se indican en la Tabla 1. Chaussat *et al.* (1986) desarrollaron un programa de ordenador, para calcular las cantidades de sales necesarias, para hacer una solución nutritiva, cuyas principales características son conocidas (proporciones iónicas, concentración iónica total, pH). O al revés, a partir de una solución nutritiva en la que se conocen las cantidades de sales, el programa

puede dar las características de la solución. Generalmente se utilizan soluciones madre concentradas, para la preparación de los medios nutritivos, aunque a veces se puede disponer de soluciones preparadas para su uso inmediato. Las soluciones madre se deben almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad. A veces pueden surgir problemas con las soluciones madre (precipitación), por lo que es aconsejable seguir las indicaciones que se dan para su uso. En los últimos años, se ha utilizado como fuente de hierro al compuesto NaFeEDTA (25-38 mg l^{-1}).

Tabla 1. Contenido en macro sales de los medios más importantes (en mg l^{-1})

Componentes	Knop (1884)	Knudson C (1946)	Heller (1953)	Nitsch (1972)	Gamborg *et al.* B5 (1976)	Schenk y Hildebrandt SH(1972)	Murashige y Skoog (1962)
KNO_3	250	—	—	950	2.500	2.500	1.900
$NaNO_3$	—	—	600	—	—	—	—
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1.000	1.000	—	—	—	—	—
NH_4NO_3	—	—	—	720	—	—	1.650
$(NH_4)_2SO_4$	—	500	—	—	134	—	—
$NH_4H_2PO_4$	—	—	—	—	—	300	—
$NaH_2PO_4.H_2O$	—	—	125	—	150	—	—
KH_2PO_4	250	250	—	68	—	—	170
KCl	—	—	750	—	—	—	—
$CaCl_2.2H_2O$	—	—	75	220	150	200	440
$MgSO_4.7H_2O$	250	250	250	185	250	400	370
Contenido en iones de los medios más importantes (en mmol l^{-1})							
N-total	10,942	16,036	7,058	27,385	26,756	27,336	60,017
NH_4^+	—	7,567	—	8,994	2,028	2,608	20,612
NO_3^-	10,492	8,469	7,058	18,391	24,728	24,728	39,405
$H_2PO_4^-$	1,837	1,837	0,906	0,500	1,087	2,608	1,249
K^+	4,310	1,837	10,060	9,897	25,815	24,728	20,042
Ca^{2+}	4,234	4,234	0,510	1,496	1,163	1,360	2,993
Mg^{2+}	1,014	1,014	1,014	0,751	1,014	1,623	1,501
SO_4^{2-}	1,014	4,798	1,014	0,751	2,028	1,623	1,501
Na^+	—	—	7,964	—	—	—	—
Cl^-	—	—	11,080	2,991	2,325	2,721	5,986
Total	23,351	29,756	39,606	43,771	60,188	61,999	93,289
Contenido en micro-sales de los medios más importantes (en mg l^{-1})							
$FeCl_3.6H_2O$	—	—	1,0	—	—	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	—	25	—	27,8	27,8	15	27,8
$MnSO_4.4H_2O$	—	7,5	0,1	25	13,2	13,2	22,3
$ZnSO_4.7H_2O$	—	—	1,0	10	2,0	1,0	8,6
H_3BO_3	—	—	1,0	10	3,0	5,0	6,2
KI	—	—	0,01	—	0,75	1,0	0,83
$CuSO_4.5H_2O$	—	—	0,03	0,025	0,025	0,2	0,025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	—	—	—	0,25	0,25	0,1	0,25
$CoCl_2.6H_2O$	—	—	—	—	0,025	0,1	0,025
$NiCl_2.6H_2O$	—	—	0,03	—	—	—	—
$AlCl_3$	—	—	0,03	—	—	—	—
Na_2EDTA	—	—	—	37,3	37,3	20	37,3

La mezcla de macro y micro-sales que se debe elegir, depende mucho de la planta con la que se trabaja. El medio Murashige y Skoog (1962), se utiliza

mucho, porque la mayor parte de las plantas reaccionan en él de forma positiva. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta solución nutritiva no tiene por qué ser siempre la mejor para el crecimiento y desarrollo, ya que su contenido en sales es muy elevado. Por ejemplo *Gerbera* es sensible a la salinidad *in vitro* (Pierik y Segers, 1973), como también lo son *Rhododendron* y *Kalmia* (Pennell, 1985). Para algunas especies leñosas sensibles a la salinidad, Lloyd y McCown (1980) desarrollaron un medio denominado WPM (woody plant medium, esto es, medio para plantas leñosas).

Cuando se elige una mezcla de macro- y micro-sales, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

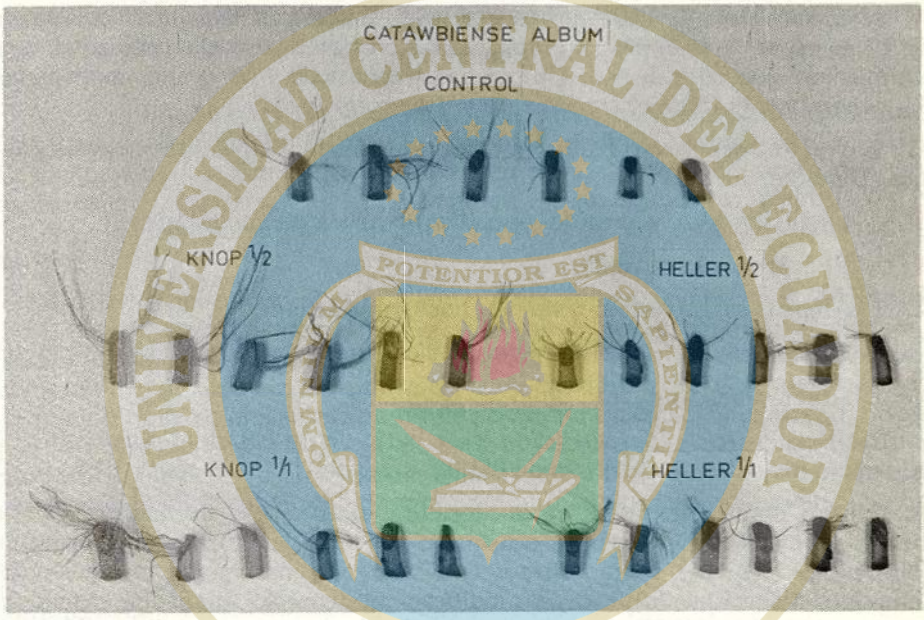


Figura 6.7 **Influencia de dos soluciones de macro-sales (Knop, 1884; o Heller, 1953), a dos concentraciones (concentración normal, o rebajada a la mitad), sobre la formación de raíces adventicias, en explantos de tallo de *Rhododendron* "Catawbiense album". Las plantas control no dispusieron de macro-sales. La formación óptima de raíces se produce con las macro-sales de Knop (1884), a concentración mitad de la normal. Fotografía tomada ocho semanas después del aislamiento**

1. La concentración total puede ser un factor importante (Fig. 6.7). La segunda parte de la Tabla 1, donde las concentraciones iónicas se dan en mmol l^{-1}, claramente muestra que la solución de Knop (1884), es "pobre" en sales, mientras que la de Murashige y Skoog (1962), constituye un medio "rico".

2. Aunque el nitrógeno (N) se suministra a veces en forma orgánica (Apartado Otros compuestos), lo normal es añadirlo en forma de iones NH_4^+ y NO_3^-. Las necesidades totales de N, varían entre 12-60 mmol l^{-1}, de los cuales al NH_4^+ le corresponden 6-20 y al NO_3^- 6-40 mmol l^{-1}. La mayor parte de las plantas prefieren el NO_3^- al NH_4^+, aunque en algunos casos puede ocurrir lo

contrario. Es necesario encontrar la mejor proporción NO_3^-/NH_4^+, para conseguir un crecimiento y desarrollo óptimos *in vitro*.

3. Si la planta absorbe iones NH_4^+, el pH disminuye, y el agar puede licuarse. Como resultado de este pH más bajo disminuye la absorción de iones NH_4^+, absorbiéndose entonces los iones NO_3^-.

4. La Tabla 1, que muestra las concentraciones de los iones en mmol l^{-1} indica que las necesidades de K^+ se encuentran entre 2 y 26 mmol l^{-1}, mientras que las de $H_2PO_4^-$, Ca^{2+}, Mg^{2+} y SO^{2-}_4 son más pequeñas (1-5 mmol l^{-1}).

pH

Se conoce poco la influencia del pH del medio nutritivo en el cultivo *in vitro*. Se supone que el pH en el rango 5,0-6,5 es apto para el crecimiento, con un máximo alrededor de 6,0. Un pH bajo (menor de 4,5), o alto (mayor que 7), generalmente frena el crecimiento y desarrollo *in vitro*.

Si el pH es demasiado bajo, pueden presentarse las siguientes complicaciones (Butenko, 1968).

1. La auxina IAA y el ácido giberélico se hacen menos estables.
2. El agar pierde su rigidez.
3. Algunas sales (fosfato o hierro) pueden precipitar.
4. La vitamina B_1 y el ácido pantoténico se hacen menos estables.
5. Se retarda la absorción de iones amonio.

El pH varía con el autoclaveado, si se parte de un pH en el rango 5,0-7,0, generalmente sufre un descenso de 0,3-0,5 unidades (Skirvin *et al.*, 1986).

Existen pocas referencias en la literatura sobre el uso de tampones para controlar el pH. En algunas ocasiones, el tampón fosfato de Sörenson ($Na_2HPO_4+KH_2PO_4$), se ha utilizado con éxito. Sin embargo, la utilización de tampones fosfato puede producir modificaciones cuando se añaden al medio: Englis y Hanahan (1945) demostraron que la glucosa en un medio a pH 6, se convertía parcialmente en fructosa, después del proceso de autoclave; también la conversión de la sacarosa en glucosa y fructosa, durante el autoclaveado, parece ser dependiente del pH.

Los tampones Mes [(ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico] y Tris [Tris (hidroximetil) metilamina], también se utilizan a veces en el cultivo de tejidos vegetales (Bonga y Durzan, 1982). Se han probado muchos otros tampones, que generalmente presentan toxicidad, especialmente aquellos que son asimilados por las plantas.

Si el pH disminuye de forma apreciable durante el cultivo de tejidos (licuándose el medio), se deberá hacer un nuevo preparado al pH requerido. Generalmente los cultivos de tejidos son capaces de auto-tamponado: ajustándose los pHs demasiado altos o bajos a los valores requeridos. Si se parte de un pH 6, éste puede caer con facilidad hasta 5,5 o incluso más bajo, durante el crecimiento (Skirvin *et al.*, 1986).

Si durante la preparación del medio, el pH queda demasiado bajo o demasiado alto puede ser corregido con NaOH o HCl (0,1-1,OM) respectivamente.

Potencial osmótico

El potencial osmótico de un medio nutritivo resulta de sumar los potenciales osmóticos del agar y del resto de sus constituyentes (minerales, azúcares, etc.). El cálculo del potencial osmótico de un medio resulta complicado, ya que influyen no sólo los pesos, sino además el grado de disociación, de las sales que lo componen. En la práctica, el potencial osmótico final debe ser determinado por medida directa. Los azúcares tienen, sin ninguna duda, una mayor influencia sobre el potencial osmótico que las macro-sales. Con respecto a los azúcares, es preciso tener en cuenta que un disacárido como la sacarosa se convierte (por hidrólisis), durante el autoclaveado, en dos monosacáridos, lo que supone un cambio en su potencial osmótico.

La contribución que los distintos azúcares y macro-sales prestan al potencial osmótico, es muy diferente para los distintos medios (Yoshida *et al.*, 1983). Los valores de los potenciales osmóticos en bar (1 bar = 10^5 Pascal), para las macro-sales y azúcares, en algunos medios son los siguientes: White (−0,43; −1,46), Hildebrandt (−0,67; −1,46), Heller (−0,96; −4,05), Murashige y Skoog (−2,27; −2,20).

Si el potencial osmótico es más bajo de aproximadamente -3×10^5 Pascal (= −3 bar), el crecimiento y organogénesis son detenidos (Pierik y Steegmans, 1975a), como consecuencia de la imposibilidad de absorción de agua. El potencial osmótico de un medio se puede bajar de una forma sencilla, por la adición de manitol, que es una sustancia fisiológicamente inactiva (Greenwood y Berlyn, 1973). La adición de 1 mol l^{-1}, de manitol al medio, debería, en teoría, producir un descenso del potencial osmótico de −22,4 bar. También se puede añadir polietilen glicol al medio, para disminuir su potencial osmótico.

Reguladores

Introducción

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. Aparte de estos productos naturales, se han desarrollado también otros de tipo sintético, que pueden tener una actividad semejante a la de los primeros. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denomina reguladores, y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta.

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores, especialmente las auxinas y citokininas, juegan un papel muy importante. Se puede decir que el cultivo *in vitro* es generalmente imposible sin reguladores. Si a un medio nutritivo se le debe añadir una auxina o una citokinina, para conseguir la extensión y/o la división celular, es algo que depende del tipo de explanto y de la

especie vegetal. Por ejemplo, explantos que producen suficiente cantidad de auxina, no necesitan una cantidad adicional para conseguir la extensión y/o la división. Otros explantos producen suficiente cantidad de citokinina, no precisando de ninguna adición exógena. Se puede hacer la siguiente división, en relación con el crecimiento de células, tejidos, órganos, etc.:

1. Cultivos que no necesitan ni auxina ni citokinina.
2. Cultivos que necesitan sólo auxina.
3. Cultivos que necesitan sólo citokinina.
4. Cultivos que necesitan auxina y citokinina.

En el caso de especies con las que no se haya trabajado previamente, se debe plantear si sus tejidos u órganos necesitarán reguladores exógenos, para su crecimiento y desarrollo *in vitro*. Se deberán, por tanto, determinar las cantidades absolutas y relativas, de auxinas y/o citokininas que deban añadirse. Otros reguladores como giberelinas y etileno, pueden también ser necesarios.

Los reguladores se añaden por medio de soluciones madre. Por ejemplo, una solución madre de 100 mg l^{-1} contiene 10^{-4} g ml^{-1}; se pueden obtener concentraciones más bajas por dilución (1 ml de esta solución madre por litro, produce una concentración final de 10^{-7} g ml^{-1}). En el caso de que se requieran cantidades de regulador, entre 5 y 100 mg por litro de medio nutritivo, se añaden directamente, prescindiendo de las soluciones madre.

A veces se pueden presentar problemas para disolver los reguladores en agua. Se recomienda utilizar el IAA, IBA y NAA, como sales potásicas, que son más solubles. También es posible disolver esas tres auxinas en la forma de ácidos, con la ayuda de KOH o NaOH 0,1 M. Las citokininas se disuelven también generalmente, en KOH o NaOH 0,1 M; las giberelinas se disuelven en agua con la ayuda de un sonicador.

Las soluciones madre de IAA y kinetina deben almacenarse en la oscuridad, debido a su inestabilidad en la luz, y por esta razón estos reguladores se descomponen en la luz, cuando forman parte del medio nutritivo. Por lo que se conoce hasta ahora, el IBA, NAA y 2,4-D (auxinas) y la BA (citokinina), son más estables en la luz. Un almacenaje prolongado de los reguladores trae problemas adicionales, por ejemplo, el IAA en solución acuosa se vuelve poco a poco inactivo; el IAA se descompone también poco a poco por la acción de algunas enzimas (IAA oxidasa y peroxidasas).

Los nombres y fórmulas de los principales reguladores se dan en la Figura 6.8, y en este apartado se da, simplemente, una breve descripción de sus efectos más importantes.

Si se utilizan reguladores, especialmente auxinas y citokininas, se puede producir habituación. Se trata de un fenómeno por el cual, cultivos *in vitro* que inicialmente necesitaban reguladores, para su crecimiento y/o formación de órganos, después de algunos repicados necesitan menores aportaciones de reguladores, o pueden prescindir por completo de ellos. Esto ocurre frecuentemente en cultivos de callos, y también cuando se forman vástagos axilares por la acción de las citokininas (*Vriesea "Poelmanii"*). La habituación generalmente no constituye un cambio permanente, ya que si, a partir de plantas formadas

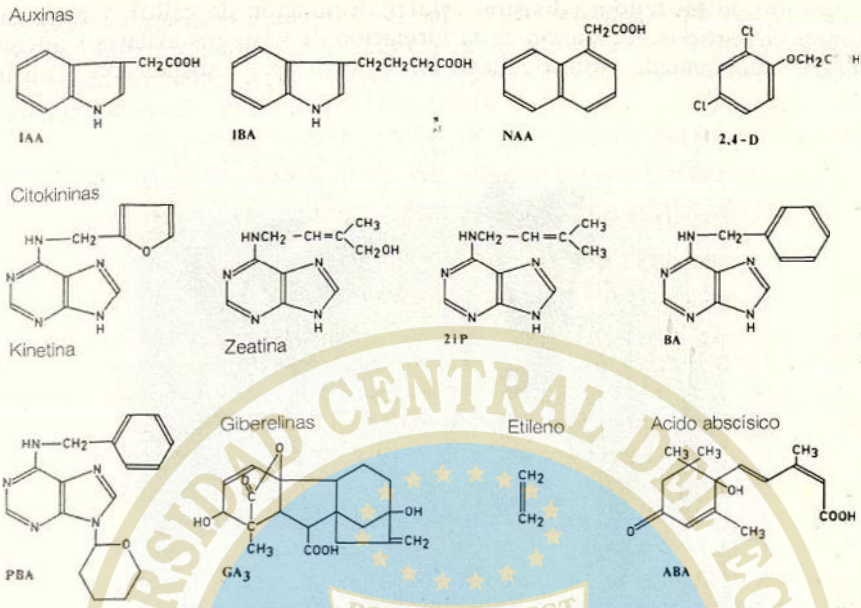


Figura 6.8 Fórmulas estructurales de los reguladores utilizados habitualmente: Auxinas, citokininas, giberelinas (sólo se muestra la GA_3), etileno y ácido abscísico

de tejidos habituados, se aislan nuevos explantos, éstos precisan de reguladores. En otras palabras, la habituación constituye un cambio de naturaleza epigenética (la actividad génica queda alterada en algún estadio de desarrollo de la planta). A pesar de todo, Horgan (1986) ha propuesto una teoría según la cual, la habituación es en algunos casos hereditaria y no de naturaleza epigenética.

En algunos casos (como en la formación de vástagos axilares en las Bromeliaceas), si se aisla un ápice de vástago de una planta madura, después de unos cuantos repiques, se produce un efecto de rejuvenecimiento. Este consiste en una disminución considerable de las necesidades de reguladores, las cuales, sin embargo, vuelven a aumentar conforme el cultivo se hace más viejo. Como se puede observar, el fenómeno de rejuvenecimiento tiene algunas similitudes con con el de la habituación.

Auxinas

Las auxinas (IAA, IBA, NAA o 2,4-D) se añaden frecuentemente a los medios nutritivos. El IAA, que se produce de forma natural en las plantas, se añade en concentraciones de 0,01-10 mg l^{-1}. Las auxinas sintéticas, y relativamente más activas (IBA, NAA, y 2,4-D), se utilizan en concentraciones de 0,001-10 mg l^{-1}. En la figura 6.9 se muestra la influencia de altas concentraciones de una auxina débil (IAA), comparada con bajas concentraciones de una auxina fuerte (NAA). Las auxinas generalmente producen: elongación celular

y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Con una

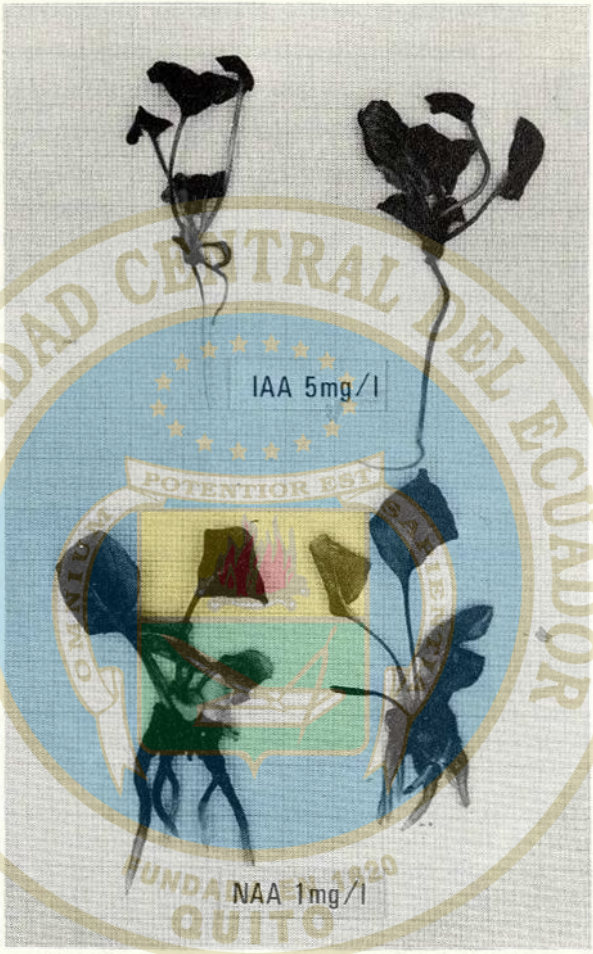


Figura 6.9 Efecto de una auxina "débil" (IAA) a alta concentración, y de una auxina "fuerte" (NAA) a baja concentración, sobre la formación de raíces adventicias, en esquejes *in vitro*, del vástago de *Gerbera jamesonii* (Pierik y Sprenkels, 1984). Fotografía tomada seis semanas después del aislamiento

baja concentración de auxina predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxina no se producen raíces, y tiene lugar, en cambio, la formación de callo. La utilización del 2,4-D se debería limitar al máximo, ya que puede inducir mutaciones. También el 2,4-D puede inhibir la fotosíntesis, cosa que no ocurre con otras auxinas como NAA, IBA e IAA.

A veces la adición de auxinas estimula el crecimiento de plántulas. Pierik *et al.* (1984) mostraron cómo el NAA promueve la formación de raíces en plántulas de algunas Bromeliáceas, lo que se traduce en estimulación del crecimiento de las plantas recién germinadas (Fig. 6.10).

Figura 6.10 Efecto de la concentración de NAA, en g ml^{-1}, sobre el crecimiento de plántulas *in vitro* de *Vriesea splendens*. El NAA estimula la formación de raíces, que a su vez estimulan el crecimiento de las plántulas (Pierik *et al*, 1984). Fotografía tomada 20 semanas después del aislamiento

Citokininas

Las citokininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo; siendo las más comunes: Kinetina, BA, 2iP, y PBA. Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina (Fig. 6.11). En concentraciones elevadas (1-10 mg l^{-1}) pueden inducir la formación de vástagos adventicios, sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces. Las citokininas promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical (Fig. 6.12); también retardan el envejecimiento.

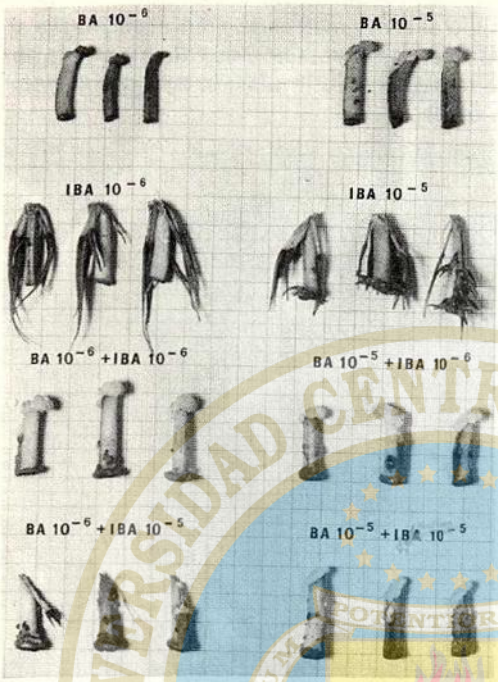


Figura 6.11 Efecto de la BA y del IBA (concentración en g ml^{-1}), sobre explantos de peciolo, de *Gerbera jamesonii*, situados de forma apolar (Pierik y Segers, 1973). La BA sola induce la formación de callo, mientras que el IBA solo induce la formación de raíces adventicias. Cuando se aplican BA e IBA, al mismo tiempo, la formación de callo se ve estimulada, si la concentración de BA es elevada (tercera línea por arriba). Fotografía tomada 8 semanas después del aislamiento

Figura 6.12 Crecimiento y desarrollo de vástagos excisos de *Vriesea* "Poelmanii". Arriba: testigo, sin citokinina en el medio. Abajo: con 0,08 mg l^{-1} de BA en el medio. La BA rompe la dominancia apical, y como consecuencia los vástagos axilares se desarrollan con abundancia. Fotografía tomada 8 semanas después del aislamiento

Giberelinas

Este grupo de compuestos no se utiliza generalmente en el cultivo *in vitro* de las plantas superiores. En la mayor parte de los casos son sustancias no esenciales en el cultivo *in vitro*. GA_3 es la más usada, pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor: Se pierde el 90% de su actividad biológica después del autoclaveado (Van Bragt *et al.*, 1971). En general las giberelinas inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*. También pueden romper la dormición de embriones aislados o yemas. Las giberelinas generalmente inhiben la formación de raíces adventicias (Fig. 6.13; Pierik y Steegmans, 1975a), y también la formación de vástagos adventicios.

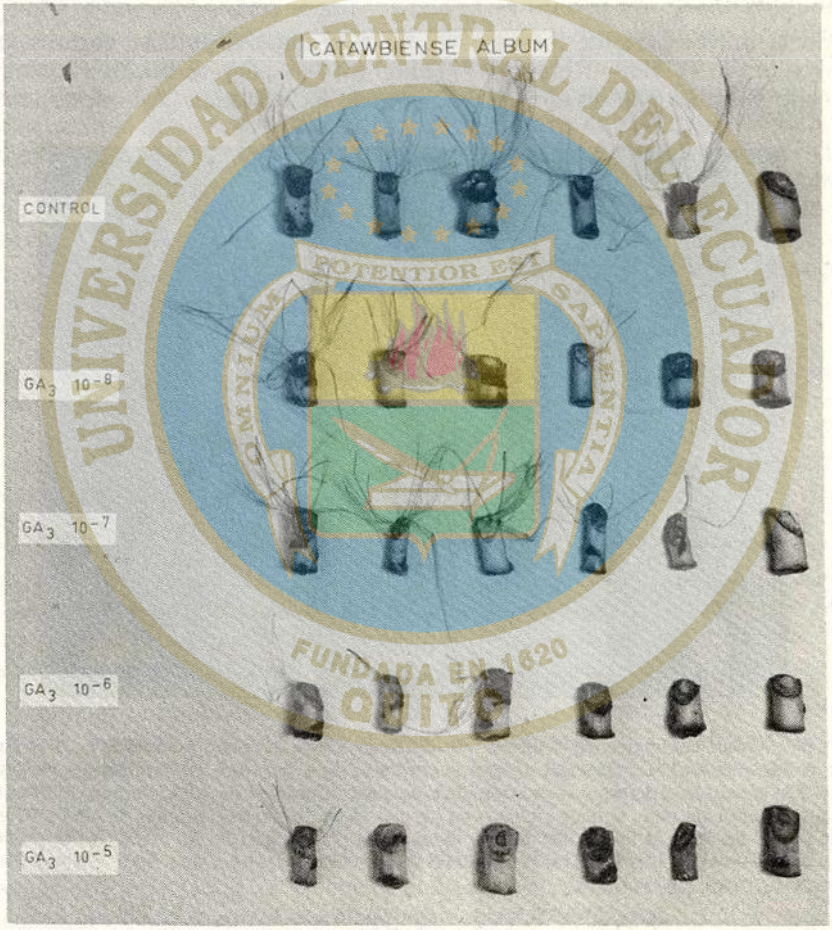


Figura 6.13 Explantos del tallo de *Rhododendron* "Catawbiense album", que han producido raíces adventicias, por tratamiento con IAA. Cuando además se añade GA_3, la formación de raíces adventicias disminuye, conforme aumentan las concentraciones de GA_3. En la fila de más abajo, con una concentración de 10^{-5} g ml^{-1} de GA_3, la formación de raíces adventicias ha quedado casi completamente inhibida (Pierik y Steegmans, 1975a). Fotografía tomada 8 semanas después del asilamiento

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FUNDADA EN 1620
QUITO

Otros reguladores

Oligosacarinas

Hace poco tiempo se descubrió (Albersheim y Darvill, 1985; Albersheim *et al.*, 1986), que las oligosacarinas (definidas estructuralmente como fragmentos de los polisacáridos de la pared celular), son mensajeros químicos, con propiedades reguladoras específicas. Las oligosacarinas se desprenden de la pared celular por la acción enzimática. Las oligosacarinas pueden actuar como reguladores, no sólo disparando los mecanismos de defensa de las plantas, contra los patógenos u otros tipos de estrés, sino también regulando la tasa de crecimiento y diferenciación, para producir raíces, flores y yemas vegetativas.

Acido abscísico

En la mayor parte de los casos el ABA produce un efecto negativo en los cultivos *in vitro* (Pilet y Roland, 1971; Fig. 6.14), y las referencias a crecimiento del callo y embriogénesis son probablemente incidentales (Ammirato, 1983).

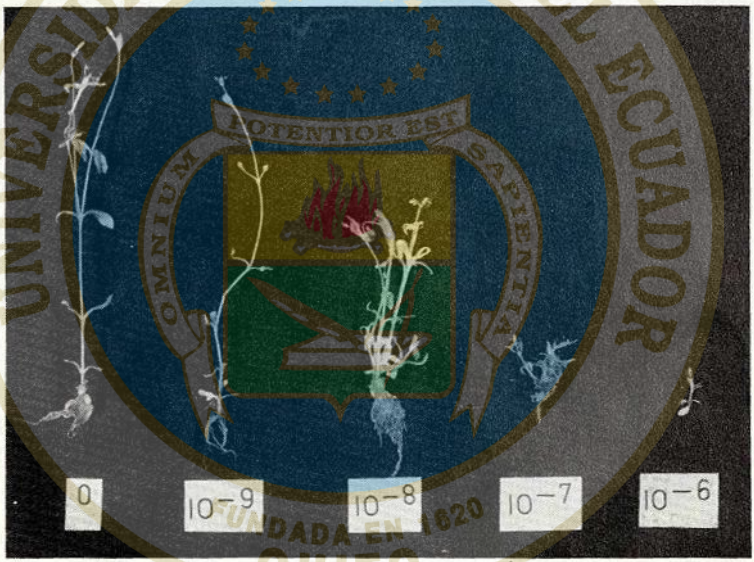


Fig. 6.14 Apices caulinares de la planta de día largo *Silene armeria*, cultivados en día largo (16 horas de luz por día). Después del alargamiento de tallo, se produce la floración en los tubos de ensayo. De izquierda a derecha: si se aumentan las concentraciones de ABA, se frena el crecimiento y el alargamiento del tallo, aunque incluso con las más elevadas concentraciones de ABA (10^{-6} g ml^{-1}), aún se puede apreciar la formación de una yema floral. El testigo (0), sin ABA, fue el primero en florecer. Fotografía tomada 8 semanas después del aislamiento

Etileno

Se sabe que tanto el cultivo de órganos como el de callos pueden producir etileno, una hormona gaseosa (Mele *et al.*, 1982). Teniendo en cuenta que los tubos, matraces y otros recipientes de plástico están a veces herméticamente cerrados, se debe tener cuidado para evitar la acumulación de etileno, sobre

todo en caso de utilizar recipientes de plástico, ya que ellos mismos pueden generar este gas. El flameado también genera etileno (Hughes, 1981), por otro lado no es aconsejable esta práctica en cámaras de flujo laminar (ya que carece de sentido).

Mele *et al.*, (1982) investigaron cómo influyen distintos métodos de cerrado sobre el crecimiento de ápices de vástago de clavel, y llegaron a la conclusión de que se puede producir una acumulación de etileno debida a la hermeticidad, que se traduce en inhibición del crecimiento. Si se añade $KMnO_4$ (en un tubo separado), el 70% del etileno puede ser eliminado.

No existe unanimidad de criterios, en las referencias bibliográficas, en lo que se refiere al papel jugado por el etileno en la organogénesis *in vitro* (Huxter, 1981). Hay referencias según las cuales el etileno no ejerce ninguna influencia en la organogénesis, y otras en las que se indica un efecto positivo. Se ha demostrado, cultivando callo de tabaco a la luz (Huxter *et al.*, 1981), que la producción de etileno es mayor cuando se forman vástagos adventicios. Estos mismos autores han demostrado que la formación de etileno depende del tiempo transcurrido después del repicado (se produce más etileno en los primeros 5 días, que en el período subsiguiente de 6-10 días), también depende del régimen día /noche (se produce más etileno en la oscuridad que en la luz). El mismo equipo investigador ha propuesto que el etileno disminuye la organogénesis durante los primeros 5 días de cultivo, mientras que la diferenciación (visible) del vástago se produce en los 6-10 días subsiguientes después de la inoculación.

Van Aartrijk (1984) y Van Aartrijk *et al.*, (1986) demostraron con explantos de bractea de azucena, que la producción de etileno y etano depende tanto de la fase en la que se lleva a cabo la regeneración, como de las condiciones de crecimiento: El número de bulbos adventicios que se forman es mayor para las producciones de etileno más altas, durante las dos primeras semanas de cultivo. La biosíntesis de etileno, por consiguiente, parece jugar un importante papel en la formación de bulbos adventicios. Si se bloquea la síntesis de etileno en la azucena por AVG (amino-etoxivinil glicina), la formación de bulbos adventicios se para también; la adición de etileno (1-10 ppm) durante los días 3-7 del período de crecimiento, promueve la formación adventicia de bulbos, como también lo hace el ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carbónico).

El etileno también influye en la embriogénesis y formación de órganos de las gimnospermas. Verhagen *et al.* (1986) indicaron que el callo no-embriogénico de *Picea abies* producía 10 veces más etileno que un callo formado a partir de un embrión. Kumar *et al.* (1986) mostraron que el incremento en la concentración de etileno y CO_2, durante la primera semana de cultivo, en matraz Erlenmeyer, de cotiledones excisos de *Pinus radiata*, induce la formación de vástagos adventicios. Si el etileno y el CO_2 son retirados de los matraces, la regeneración de vástagos y el crecimiento quedan inhibidos.

Algunas veces el crecimiento *in vitro* puede ser estimulado por el etileno (Stoutemeyer y Britt, 1970; Palmer y Barker, 1973; Mackenzie y Street, 1970; Bouriquet, 1972). Parece que una cierta concentración de etileno es necesaria para la inducción de la división celular esto fue demostrado por Mackenzie y

Street (1970), para cultivos de células en suspensión de *Acer*. Es importante tener en cuenta que el 2,4-D induce la formación de etileno.

Vitaminas

Una o varias de las siguientes vitaminas se utilizan algunas veces en el cultivo *in vitro* (los nombres alternativos y las concentraciones utilizadas en mg l^{-1} se indican entre paréntesis): inositol (mio-inositol, meso-inositol; 100-200), vitamina B_1 (tiamina, aneurina; 0,1-5,0), pantotenato de calcio o ácido pantoténico (0,5-2,5), ácido fólico (vitamina M; 0,1-0,5), riboflavina (lactoflavina, vitamina B_2; 0,1-10), ácido ascórbico (vitamina C; 1-100), ácido nicotínico (vitamina PP, niacina; 0,1-5), piridoxina (adermina, vitamina B_6; 0,1-1,0), biotina (vitamina H; 0,01-1,00), ácido para −aminobenzoico (0,5-1,0), tocoferol (vitamina E; 1-50).

A veces se utilizan altas concentraciones de ácido ascórbico, lo que no quiere decir exactamente que la planta tenga unas necesidades elevadas. La vitamina C se utiliza en estas concentraciones elevadas como antioxidante.

La mayor parte de las plantas son capaces de sintetizar vitaminas *in vitro*, y quizá debiéramos preguntarnos, si la adición frecuente de mezclas de vitaminas en el cultivo *in vitro*, es siempre necesaria.

Otros compuestos

Poliaminas

Se ha demostrado que las poliaminas están relacionadas con la diferenciación celular y el desarrollo durante la embriogénesis. Los niveles endógenos de poliaminas, especialmente putresceína y espermidina, se incrementan de forma sustancial durante la formación del embrión en zanahoria. La embriogénesis es inhibida por la adición de inhibidores de la síntesis de poliaminas, y se restablece con la putresceína, espermidina y espermina. Se han descrito efectos similares en *Medicago sativa* (Schneider y McKenzie, 1986). Rugini y Wang (1986) encontraron que las poliaminas son cofactores en la formación de raíces adventicias. Otro aspecto interesante, es que la putresceína es capaz de sincronizar el proceso embriogénico de *Daucus carota* (Bradley *et al.*, 1985). Las poliaminas son, por tanto, junto con sus enzimas asociados, piezas importantes en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas. La L-arginina es un precursor de la putresceína, y las poliaminas pueden bloquear la conversión de metionina en etileno. Esto sugiere un sistema de control, en el cual el etileno, la arginina y las poliaminas juegan un papel inter-relacionado en el control de la embriogénesis somática.

Fenilurea y sus derivados

Desde que se descubrió que el DPU (N,N'-difenilurea) presentaba actividad tipo citokinina, se ha visto que muchas otras ureas di-sustituidas tienen la misma característica, en diferentes bio-ensayos (Mok *et al.*, 1986). En contraste con esto, Horgan (1986) hizo la hipótesis de que el DPU inhibía la citokinina oxidasa, produciendo aparentemente un incremento de la actividad citokinina. En cualquier caso, es cierto que los compuestos indicados tienen sus propias

características bien definidas y que su papel quedará esclarecido con futuras investigaciones.

Los compuestos más activos son las piridil ureas y las diazol ureas (tidiazurón y derivados), que son hasta 10.000 veces más activas que el DPU, y más activas que las citokininas naturales, tipo adenina como la zeatina. El tidiazurón estimula la proliferación de los vástagos en algunas especies leñosas, mientras que la N-2-cloro-4-piridil-N-fenilurea (CPPU), produce un incremento elevado en el número de vástagos de azaleas resistentes a la dehiscencia (Read *et al.*, 1986). Meyer y Kernsh (1986) han encontrado también que el tidiazurón produce un importante incremento, en la proliferación de vástagos en *Celtis occidentalis*. Una concentración de 0,05-0,1 µM de tidiazurón resulta más activa que otra 4-10 µM de BA.

Un caso particularmente interesante es el del chopo; Russell y McCown (1986) demostraron que el tidiazurón (en una concentración inferior a 0,1 µM), es capaz de inducir vástagos adventicios en callos de chopo, en los cuales sólo aparecieron vástagos de forma esporádica cuando se utilizó BA. Sin embargo, curiosamente, la formación de vástagos axilares en el chopo, es inhibida fuertemente con todos los tratamientos de tidiazurón, y es necesario transferir los cultivos regeneradores de vástagos a un medio libre de tidiazurón para que se produzca el desarrollo del vástago.

Mezclas de compuestos de origen vegetal

Estas sustancias son: leche de coco (el endospermo líquido del coco), zumos de tomate, naranja, uva y piña, savia de abedul, puré de plátano, etc. Estas mezclas deberían ser evitadas en el trabajo de investigación, ya que:

1. Su composición es casi completamente desconocida.

2. Su composición es muy variable. Por ejemplo, la leche de coco (utilizada a una dilución de 50-150 ml l^{-1}), no sólo es diferente entre cocos jóvenes y viejos, sino que también puede serlo para cocos diferentes dentro de una misma edad.

El trabajo con leche de coco ha producido resultados sorprendentes. Si se utiliza junto con auxinas produce una fuerte división celular en los tejidos (Steward, 1958). Kovoor (1962) vio que la leche de coco tenía un compuesto análogo a la kinetina (una citokinina). Letham (1974) propuso la hipótesis de que los frutos de coco maduros contenían 9-β-D-ribofuranosilzeatina (una citokinina) y Van Staden y Drewis (1975) demostraron que contenía tanto zeatina como su ribósido. En principio las citokininas se pueden utilizar en lugar de la leche de coco, y esto es lo que generalmente se hace.

La preparación de la leche de coco se hace de la siguiente forma: Un fruto de coco (comprado en el mercado) se abre utilizando un taladro eléctrico (haciendo tres agujeros). La leche de cada coco se recoge en un matraz independiente, comprobando que esté en buenas condiciones. La leche de los cocos sanos se mezcla y se filtra a través de una gasa. El filtrado se esteriliza (en autoclave, durante 15 minutos a 120°C), se deja enfriar y reposar durante toda una noche. Se filtra a la mañana siguiente y se almacena en recipientes de tapón plástico de rosca, a −20°C.

Mezclas de compuestos como fuente de nitrógeno y vitaminas

Se utilizan los siguientes compuestos, así como aminoácidos, como fuentes de nitrógeno orgánico: Hidrolizado de caseína (0,1-1,0 g l^{-1}), peptona (0,25-3,0 g l^{-1}), triptona (0,25-2,0 g l^{-1}), y extracto de malta (0,5-1,0 g l^{-1}). Estas mezclas son muy complejas y contienen vitaminas y aminoácidos. El extracto de levadura se usa (0,25-2,0 g l^{-1}) por la alta calidad de sus vitaminas (B). La figura 6.15 muestra el estímulo del crecimiento en plántulas de orquídea por efecto de la peptona y de la triptona.

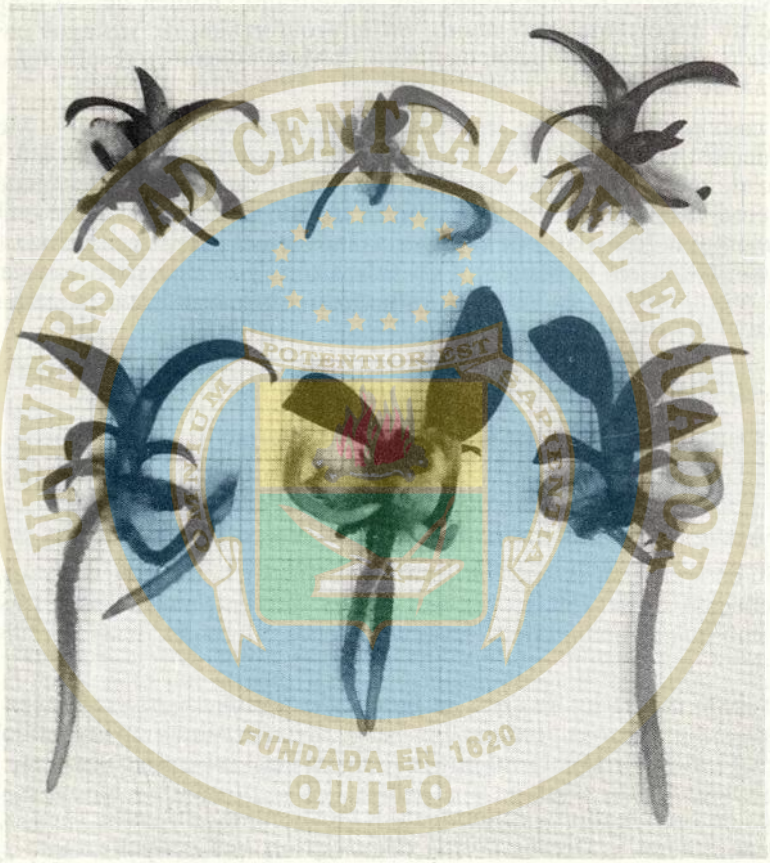


Figura 6.15 Efecto promotor del crecimiento de la triptona, sobre plantas cultivadas *in vitro*, de *Paphiopedilum callosum*. Arriba: sin triptona. Abajo: triptona a 1,5 g l^{-1} (Pierik, resultados sin publicar). Fotografía tomada 20 semanas después de la siembra

Los aminoácidos como fuente de nitrógeno

En los medios modernos no se suelen usar los aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico, ya que una proporción adecuada entre los iones NO_3^- y NH_4^+ garantiza las necesidades en nitrógeno. Antiguamente se añadían aminoácidos o mezclas de ellos debido a que la relación entre los anteriores iones

no era la adecuada. L-glutamina es el aminoácido usado más comúnmente como fuente de nitrógeno; también se pueden utilizar la adenina y la asparagina.

Adenina (sulfato)

La adenina fue utilizada por primera vez por Skoog y Tsui (1948), para el crecimiento de explantos de tallo de tabaco, donde estimula la formación de vástagos adventicios. Nitsch *et al.* (1967) también utilizaron la adenina para estimular la formación de vástagos adventicios. Se añade frecuentemente en los medios preparados para su uso en propagación vegetativa (utilizados en concentraciones de 2-120 mg l^{-1}). Se puede utilizar sulfato de adenina, en lugar de adenina, ya que el primero es más soluble en agua.

Carbón activo

El carbón activo (se usa a concentraciones de 0,2-3,0% p/v), se produce por carbonización de la madera, a alta temperatura, en presencia de vapor. Posee una red muy fina de poros, con una gran superficie interna, en la cual pueden ser adsorbidas todo tipo de sustancias (sólidos y gases). El carbón activo (se utiliza frecuentemente producto Merck nº 2.186) se purifica para eliminar cualquier impureza. Se recomienda la utilización de carbón vegetal, ya que este contiene un porcentaje más elevado de carbón activo (95-99%), que el obtenido a partir de residuos animales.

Los aspectos más importantes del carbón activo son:

1. Adsorción de pigmentos tóxicos, marrones y negros (compuestos de tipo fenólico y melanina), y de otros compuestos tóxicos incoloros. El carbón activo es capaz también de adsorber el material tóxico en el plátano (Fig. 6.16).

2. Adsorción de otros compuestos orgánicos (auxinas, citokininas, etileno, vitaminas, quelatos de Zn y Fe, etc.), como se indica en un artículo de revisión de Misson *et al.* (1983). Johansson (1983) propuso que el carbón activo podía adsorber el ABA.

3. El "clima luminoso" del cultivo cambia (el medio se oscurece), y como resultado de ello la formación de raíces y el crecimiento pueden ser modificados (Klein y Bopp, 1971).

4. El carbón activo puede promover la embriogénesis somática (Ammirato, 1983), y la embriogénesis en cultivos de anteras de *Anemone* y *Nicotiana* (Johansson, 1983). Evers (1984) y muchos otros investigadores han demostrado que la adición de carbón activo frecuentemente tiene un efecto estimulador del crecimiento y la organogénesis de las especies leñosas. También se apreciaron efectos positivos del carbón activo en la producción de bulbillos de *Muscari armeniacum* (Peck y Cumming, 1986).

5. El carbón activo estabiliza el pH (Misson *et al.*, 1983).

6. Es posible que el carbón activo elimine sustancias que pueden promover el crecimiento, pero esto está aún por demostrar.

Algunas plantas tienen la característica poco atractiva de producir exudados de color marrón/negro cuando sufren heridas (generalmente compuestos de

Figura 6.16 La adición de un homogeneizado de plátano sin carbón activado (0,0%) produce un efecto inhibidor, sobre el crecimiento de plántulas *in vitro* de híbridos de *Phalaenopsis*. Si al homogeneizado de plátano se le añade carbón activo, el efecto inhibidor del primero desaparece; esto se debe a que el carbón activo adsorbe una o varias sustancias inhibidoras, presentes en el plátano. Las concentraciones elevadas de carbón activo (0,6-1,0%) producen un efecto inhibidor (Pierik, Van Nieuwkerk y Hendriks, datos sin publicar). Fotografía tomada 14 semanas después de la siembra

tipo polifenol oxidados y taninos), y que generalmente hacen imposible el crecimiento y el desarrollo. Esta situación puede ser salvada por (Anónimo, 1978a; Compton y Preece, 1986):

1. Adición de carbón activo al medio (concentración de 0,2-3,0% p/v).

2. Adición de PVP al medio (concentración de 250-1.000 mg l^{-1}). El PVP es un polímero que adsorbe las sustancias de tipo fenólico (Johansson, 1983).

3. Adición de los llamados antioxidantes como el ácido cítrico, ácido ascórbico, tiourea o L-cistina. Estos compuestos impiden la oxidación de los fenoles.

4. Adición de dietil-ditiocarbonato (Dieca) en los aclarados, después de la esterilización, a una concentración de 2 g l^{-1}, su adición como gotas, al realizar el micro-injerto, puede también bloquear los fenómenos de oxidación (Jonard, 1986).

5. Adición de tres aminoácidos (glutamina, arginina y asparagina).

6. El repicado frecuente a un medio reciente, a veces frena lentamente la formación de pigmentos.

7. La utilización de medios líquidos en los cuales es más fácil y rápido diluir los productos tóxicos.

8. El color marrón causado por foto-activación, en la base de los vástagos, puede a veces ser eliminado, manteniendo las bases de los vástagos en la oscuridad durante el cultivo; se puede impedir la penetración de la luz pintando las paredes exteriores de los tarros o tubos de ensayo en negro, hasta el nivel en que se encuentra el medio, o forrando las bases de los tubos con papel de aluminio, también aplicando una fina capa de carbón inactivado y agar sobre la superficie del medio (Rugini *et al.* 1986).

9. Una reducción de tejido herido puede dar como resultado una disminución de la exudación.

10. La reducción de la concentración en sales del medio de cultivo puede reducir la exudación.

11. Los reguladores juegan un papel importante en el oscurecimiento del medio al oxidar a los fenoles. La eliminación de los reguladores puede reducir la oxidación.

12. Mojar los explantos en agua antes de situarlos en el cultivo constituye un método eficaz de reducir la oxidación.

Floroglucinol

A veces se añade el compuesto fenólico floroglucinol, el cual inhibe a la IAA-oxidasa (responsable de la degradación del IAA). Jones (1979), Hunter (1979) y Jones y Hopgood (1979) indicaron que el floroglucinol puede inducir la formación de vástagos axilares, y que aplicado junto con auxinas, actúa de forma sinérgica, induciendo la formación de raíces adventicias. Los efectos positivos del floroglucinol no son completamente seguros, ya que investigaciones recientes indican que puede no tener efecto, o que este sea negativo sobre la formación de vástagos axilares o raíces adventicias.

Medios preparados comerciales

Estos medios se encuentran en el mercado desde 1975, facilitando su uso en laboratorios, escuelas, industrias y en el hogar. Los fabricantes son:

KC Biological Inc.,
EEUU

Flow Laboratories,
Escocia

Gibco,
EEUU

Almacenado de los medios nutritivos

Los medios nutritivos que deben ser almacenados durante largos períodos de tiempo, deberían mantenerse para estar en óptimas condiciones, a baja temperatura (5° C), en la oscuridad. Si el período de almacenaje es prolongado se deben tomar las medidas para impedir un exceso de evaporación del medio; por ello se recomienda que los medios autoclaveados se almacenen en bolsas de plástico muy limpias y pre-esterilizadas. Un almacenaje largo de los medios debe ser evitado, ya que hay sustancias inestables en el agua, por ejemplo el IAA.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

7
CERRADO DE LOS TUBOS DE ENSAYO Y MATRACES

Los tubos de ensayo y los matraces necesitan, por un lado ser cerrados, para impedir su deshidratación e infección, pero por otro lado tiene que ser posible el intercambio gaseoso con el exterior para evitar una falta de oxígeno, o el exceso de gases producidos, como el dióxido de carbono y el etileno. Por ello cada tipo de cierre es un equilibrio entre estas dos necesidades. El cierre se puede conseguir de las siguientes maneras:

1. Tapones de algodón en rama (Fig. 7.1). Estos tapones, que se utilizaban antes mucho, se hacen a mano, consumiendo mucho trabajo. En la actualidad existen máquinas para hacer este tipo de tapones, adaptados a matraces o tubos concretos. Antes los tapones de algodón se flameaban después de la inoculación, sin embargo, esta práctica está en desuso, ya que la lana sintética puede producir gases, al ser flameada, que pueden ser tóxicos (Fig. 7.2).

2. Tapones estériles (steristops, Fig. 7.1). Se trata de tapones de celulosa porosos, que pueden introducirse en los tubos, como si se tratase de corchos.

3. Tapones de aluminio (Fig. 7.1). Quedan fijados en las paredes de los tubos por medio de un resorte.

4. Tapones de vidrio transparente o sintético, que pueden ser autoclaveados.

5. Tubos o matraces con tapón de rosca. Es importante no apretar esta última demasiado, para permitir el intercambio gaseoso entre el recipiente y el exterior.

6. Papel de aluminio. Se utiliza sobre todo en matraces Erlenmeyer de gran tamaño.

7. Tapones de plástico (espuma).

Se han indicado más arriba siete formas diferentes de cerrar los recipientes, sin embargo, excepto en las soluciones 5 y 6, es necesario añadir un sellado extra de seguridad, para impedir una excesiva evaporación, e infecciones. El

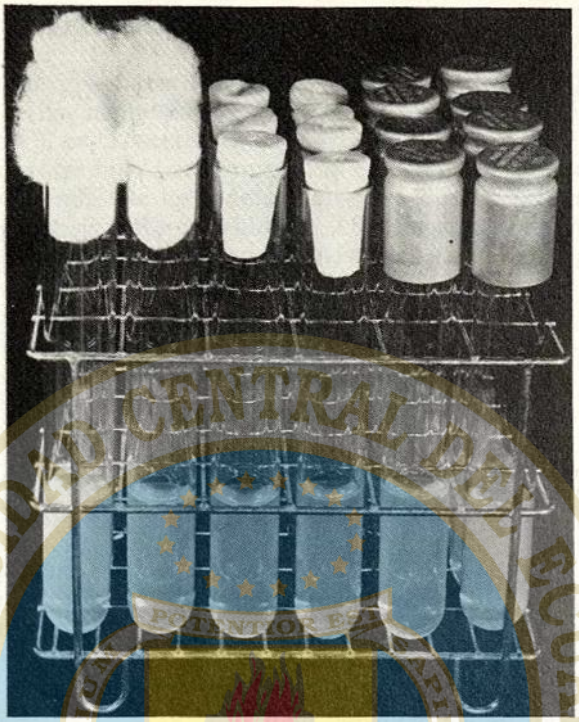


Figura 7.1 Tubos de ensayo cerrados de diferentes formas (de izquierda a derecha): Tapones de algodón, steristops, y tapones de aluminio

Figura 7.2 Crecimiento *in vitro* de plántulas de *Vriesea splendens*. Arriba: tapón de algodón quemado. Abajo: tapón sin quemar (Pierik, datos no publicados). Fotografía tomada 28 semanas después del aislamiento

Vitafilm (Goodyear) y el papel de aluminio se utilizan como cierre adicional en Europa Occidental, aunque también se pueden utilizar otros tipos de películas: Parafilm, película plástica de PVC o película de propileno. En principio, cualquier película utilizada debería permitir el intercambio de CO_2, O_2, etileno, etc, pero no de vapor de agua.

El cierre de los tubos o matraces puede tener importantes consecuencias que se indican más abajo:

1. Si el cierre es demasiado hermético, el intercambio gaseoso de CO_2, O_2, etileno, etc, es dificultado, o se hace completamente nulo. La acumulación de CO_2 y/o etileno puede ser perniciosa. El papel de aluminio y el propileno tienen la desventaja, de que cierran los recipientes casi completamente. La casa Kimble produce unos tapones de polipropileno, que se comportan como una membrana a cuyo través pueden difundir los gases (a excepción del vapor de agua).

2. Los tubos, cajas y tapones sintéticos pueden liberar etileno, que puede producir un efecto dañino, si el recipiente es demasiado hermético.

3. Si el tubo está casi completamente cerrado, la evaporación queda muy reducida, sin embargo, la humedad en el tubo es elevada. Las plantas susceptibles de vitrificación (Apartado Agar) precisan una humedad más baja.

4. El tipo de cerrado influye sobre la disponibilidad de luz por el cultivo. Los tapones sintéticos o de vidrio permiten el paso de la luz, no haciéndolo los tapones de algodón o de papel de aluminio.

Recientemente han sido medidas, durante 3 meses y medio, las pérdidas de agua en cultivos en tubos de ensayo, cerrados por diferentes métodos, en luz fluorescente continua (10 W m^{-2}), a 25°C (Pierik, resultados inéditos). Se indican las pérdidas de agua como mg cm^{-2} (la superficie se refiere a la del tubo de ensayo).

Tapón de algodón + papel de aluminio + Vitafilm	124
Tapón de algodón + papel de aluminio	253
Tapón de algodón + Vitafilm	852
Tapón metálico + Vitafilm	710
Tapón metálico	930
Vitafilm	1.105

La investigación reciente ha demostrado de forma concluyente, que un cierre total de los tubos puede tener serios efectos. De Proft *et al.* (1986) demostraron que matraces Schott, cerrados herméticamente, conteniendo explantos de *Magnolia soulangiana*, tenían elevadas concentraciones de CO_2 y etileno, en consecuencia se redujo el crecimiento del material vegetal y se produjeron plantas cloróticas. Woltering (1986), cultivando plántulas de *Gerbera*, en unidades de polipropileno, llegó también a la conclusión de que un sistema cerrado (sellado), sin un absorbente de etileno (Ethy-sorb), produce una concentración elevada de etileno y CO_2, y, por tanto, condiciones negativas para el crecimiento.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

8
CUIDADO DEL MATERIAL VEGETAL

Se pueden utilizar dos tipos de material vegetal para su aislamiento *in vitro*: Plantas cultivadas bajo condiciones controladas; en invernadero o cámara de ambiente controlado, o plantas cultivadas en el campo. En la práctica, si un explanto es aislado de una planta cultivada en el exterior, existen muchas más posibilidades de que se produzca una infección. Son excepciones los tejidos aislados del interior del vegetal: por ejemplo de la zona cambial de un arbusto o árbol, o de los órganos de reserva como bulbos, tubérculos, rizomas, etc. (Gautheret, 1959). Si, a pesar de los inconvenientes, se tiene que utilizar material cultivado en el campo, se debe tener en cuenta lo siguiente:

1. Las yemas deben usarse con sus catafilos o brácteas, una vez que no estén durmientes, aunque no hayan empezado a abrirse.

2. Se pueden utilizar ramas que hayan permanecido almacenadas, y luego brotadas en agua en el interior.

3. Las ramas que se hayan desarrollado en el exterior, se pueden envolver en plástico, y sólo deben usarse para su aislamiento las partes que se desarrollan a partir de ese momento.

4. Si se utiliza material desarrollado en el exterior, se deben emplear los vástagos más jóvenes.

El elevado porcentaje de infección que se produce, cuando se utiliza material cultivado en el exterior, hace generalmente necesario utilizar material producido en el invernadero o cámara de cultivo. Si se tiene que utilizar material exterior es aconsejable, siempre que sea posible, pasar la planta al interior, donde se continúa su cultivo en algún recipiente y, por tanto, el crecimiento; sobre estas partes recién formadas se toman los explantos para el cultivo *in vitro*.

Finalmente para limitar las infecciones cuando se utiliza material de invernadero o cámara de crecimiento, se deben seguir las siguientes directrices:

1. Impedir las infecciones de insectos (áfidos, araña roja, ácaros, mosca blanca, etc.), ya que éstos frecuentemente son portadores de enfermedades.

2. Evitar hongos y bacterias, utilizando cuando sea posible fungicidas o bactericidas (sistémicos).

3. No mojar nunca las plantas al regar, añadiendo directamente el agua al tiesto. El agua es frecuentemente un elemento importante para la reproducción y propagación de los microorganismos. Esto es especialmente importante para las plantas en estado de roseta.

4. Mantener la humedad en el invernadero tan baja como sea posible. Las infecciones fúngicas y bacterianas son más probables con una humedad alta.

5. Permitir a las plantas secarse parcialmente antes de iniciar la esterilización y el aislamiento.

Bourne (1977) ha ilustrado convenientemente las diferencias en contaminación entre plantas, que han sido cultivadas en condiciones diferentes. Este autor determinó el número medio de micro-organismos por flor de tomate, llegando a las siguientes conclusiones:

Fuente de la flor	*No desinfectadas*	*Desinfectadas*	*Contaminación en el cultivo después de la desinfección %*
Campo	1.300.000	92.000	100
Invernadero	85.520	1.600	60
Fitotrón	90	43	30

Es especialmente importante encontrar los procedimientos correctos, si el material vegetal procede de árboles o arbustos. En estos casos se dispone sólo de un corto período de tiempo para realizar el trabajo de investigación (inmediatamente antes del engrosamiento de las yemas). Es conveniente utilizar un plástico para evitar la deshidratación del material, durante su almacenado a baja temperatura. Más información sobre este tema se puede encontrar en Bonga y Durzan (1982).

En principio sólo se deberían utilizar plantas vigorosas para los experimentos, ya que las plantas débiles son más susceptibles a la enfermedad. También es importante utilizar material vegetal sano (libre de virus, bacterias, hongos, ácaros, etc.). Para la producción en gran escala, se debe tener especial cuidado en la elección del genotipo adecuado; se deben tener en cuenta criterios como: Tasa de crecimiento, precocidad, producción de flores, color y forma de la flor, conservación de sus características, etc.

Por estas razones el trabajo de investigación se hace frecuentemente utilizando un material vegetal extraordinariamente homogéneo (en el mismo estado de desarrollo). También se recomienda que sea cultivado en el invernadero o cámara, donde es más fácil controlar el crecimiento y desarrollo. La importancia del material inicial en el crecimiento y desarrollo *in vitro* se trata con más detalle en el Capítulo 13.

9
ESTERILIZACION DEL MATERIAL VEGETAL

Introducción

En principio existen cuatro fuentes de infección: la planta (su exterior o su interior), el medio nutritivo (insuficientemente esterilizado), el aire y el operador (trabajo poco preciso). La más importante de estas condiciones es la planta misma, el material vegetal debería ser bien esterilizado antes de su aislamiento *in vitro*.

Antes de empezar el proceso de esterilización, se debe retirar cualquier porción de suelo, porciones muertas, etc, que aún pudiesen quedar, en las plantas o porciones de plantas con las que se trabaje. A continuación se debe realizar un lavado con agua, si la contaminación externa es fuerte (por ejemplo en patatas o rizomas cultivados en el suelo). Luego el pelado elimina la capa más exterior (piel en el caso de la patata, o los catafilos exteriores secos y sucios en el caso de los bulbos). Después de estos pasos, se inicia la esterilización, generalmente de la siguiente forma: Se sumerge el órgano en alcohol de 70% durante algunos segundos, para eliminar las burbujas de aire (el alcohol de 96% resulta demasiado fuerte, produciendo una excesiva deshidratación). Luego se realiza una esterilización durante 10-30 minutos en NaClO al 1%, conteniendo algunas gotas de Tween 20 u 80, después se aclara en agua corriente estéril (para eliminar el hipoclorito), generalmente se hacen tres aclarados, durante 2, 5 y 15 minutos respectivamente. Después se puede comenzar a trocear el material vegetal, en condiciones estériles (cámaras de flujo laminar), utilizando instrumentos estériles (bañados en alcohol de 96% y después flameados).

Si, a pesar de una "buena" esterilización química del material vegetal, después se producen infecciones, esto se puede deber a las siguientes causas:

1. A las llamadas infecciones internas, que se tratan en el apartado Infecciones Internas.

2. Trabajo poco escrupuloso (falta de lavado de las manos; superficie de la mesa no esterilizada con alcohol de 96%; pinzas o bisturís no esterilizados;

insuficiente esterilización de las placas de Petri, papel y/o medio nutritivo; batas de laboratorio sucias, etc.). La utilización de máscaras, cubrirse el pelo, y el empleo de guantes estériles pueden contribuir a disminuir el número de infecciones.

3. Una cámara de flujo laminar defectuosa. Las cámaras deben revisarse cada año en fábrica, con un contador de partículas. Además los filtros frontales deben ser renovados periódicamente.

4. El alcohol en el que se sitúan los instrumentos antes de su flameado está contaminado. Es aconsejable renovar este alcohol de forma periódica.

5. Los tubos, etc., que contienen los medios nutritivos no están estériles en su exterior. Después de esterilizar los medios nutritivos los recipientes deben colocarse en condiciones estériles.

6. Los suelos no se limpian y desinfectan de forma regular. Cuando se entra en la habitación de inoculación se deben usar calzas de plástico sobre los zapatos, o mojar las suelas de los zapatos con un líquido esterilizante.

7. La habitación que contiene la cámara de flujo laminar no está estéril. Se puede evitar haciendo pasar a su través aire estéril, y también irradiando con luz UV durante la noche.

8. Se permite el paso a la habitación de inoculación a más personas de las necesarias, produciéndose la infección del suelo y del aire.

9. Generalmente se producen infecciones cuando se aislan ápices del vástago de plantas en roseta, ya que estos son difíciles de esterilizar. Para evitar esto, los vástagos se esterilizan frecuentemente por etapas: Se lava el vástago, se esteriliza, se retiran algunas hojas, se esteriliza una vez más, etc. Por regla general, se puede decir que las probabilidades de infección son menores, si los ápices del vástago son aislados cuando son pequeños. Se debería aislar con preferencia un meristemo con sólo unos pocos primordios foliares; la desventaja de esto es que sus posibilidades de crecimiento *in vitro* son menores.

10. Si las cámaras de crecimiento no se mantienen limpias (limpieza y desinfección regular de los suelos), pueden producirse infecciones, en algunos casos debidas a la presencia de ácaros, los cuales pueden ser portadores de infecciones fúngicas. Debido a que los ácaros pueden atravesar fácilmente los tapones de algodón y las películas de plástico, este tipo de infección no debe ser infravalorada. La erradicación de los ácaros se produce utilizando durante algunas semanas tiras de insecticida Vapona (diclorvos), de Shell (Bonga y Durzan, 1982).

Esterilización química

La esterilización química (erradicación de los micro-organismos por medio de sustancias químicas), se puede realizar con:

1. Alcohol (etanol); para material vegetal se utiliza alcohol del 70%, ya que el de 96% deshidrata demasiado. Cuando se esterilizan mesas o instrumentos se debe utilizar alcohol de 96%, ya que el de 70% deja una lámina de agua después de la evaporación. Cuando se esterilizan plantas, el sumergirlas en

alcohol durante unos cuantos segundos no es suficiente para matar todos los micro-organismos, y después de esto (utilizado sobre todo para eliminar el aire; el alcohol disuelve también la capa epicuticular), los tejidos son tratados generalmente con hipoclorito. Los frutos pueden ser esterilizados externamente, bañándolos en alcohol de 96%, y después flaméandolos; así se hace cuando se siembran orquídeas.

2. Lejía o hipoclorito sódico. Se puede adquirir en los supermercados, y frecuentemente contiene un 10% de materia activa (=NaClO). Generalmente se utiliza una solución de 1% de NaClO, la cual se obtiene añadiendo una parte de lejía (con el 10% de materia activa) y 9 partes de agua del grifo, aunque también pueden utilizarse concentraciones más altas como, por ejemplo, 1,5-2,0% NaClO. Si las plantas son especialmente sensibles a la lejía, es aconsejable utilizar hipoclorito cálcico para la esterilización.

3. Hipoclorito cálcico ($Ca(ClO)_2$). Se encuentra en forma de polvo, que se mezcla bien con el agua corriente; una vez dejado reposar, se utiliza el líquido clarificado (frecuentemente filtrado), para la esterilización. Se utiliza durante 5-30 minutos (concentración 35-100 g l^{-1}). El hipoclorito cálcico penetra en los tejidos vegetales con más lentitud que el hipoclorito sódico, y sólo puede ser almacenado durante un tiempo limitado, ya que es delicuescente (absorbe agua).

4. Sublimado o cloruro mercúrico ($HgCl_2$) disuelto en agua corriente. Se trata de un producto enormemente tóxico, tanto para las plantas como para los animales y el hombre. Se utiliza en concentraciones de 0,01-0,05% (p/v) durante 2-12 minutos, el aclarado debe ser exhaustivo, y, debido a su extremada toxicidad, el agua del aclarado no debe eliminarse por los desagües normales.

La esterilización química puede hacerse más eficaz:

1. Lavando el material vegetal de forma intensiva, con agua muy limpia, antes de comenzar la esterilización, y cambiando el agua de forma regular. Hughes (1981) demostró que este tipo de pre-aclarado, disminuía drásticamente las infecciones en las Gesneriáceas.

2. Colocando el material vegetal en alcohol de 70% durante algunos segundos, antes de la esterilización química, con lo que se eliminan las burbujas de aire, permitiendo al líquido esterilizante un mejor contacto con el material vegetal.

3. La adición de Tween 20 u 80 (un agente mojante), al líquido esterilizante (concentración 0,08-0,12%). Los agentes mojantes disminuyen la tensión superficial, permitiendo un mejor contacto superficial.

4. Agitando durante la utilización de la lejía (con un agitador magnético).

5. Realizando la esterilización con lejía bajo vacío: De este modo se eliminan burbujas de aire, y el proceso de esterilización se lleva a cabo de forma más eficaz.

La elección del tiempo de esterilización y la concentración de la lejía se pueden hacer en función de las circunstancias particulares de cada caso. Depende en gran parte de si la superficie del explanto que se esteriliza se va a conservar (esterilización suave) o se va a cortar antes de la inoculación (esterilización

vigorosa). A veces la esterilización puede llevarse a cabo en 5 minutos de tratamiento con NaClO 1%, en otros casos pueden ser necesarios hasta 30 minutos. Una esterilización prolongada puede producir efectos negativos sobre el explanto, el tiempo y la concentración adecuada de lejía deben elegirse cada vez, en función del material experimental. Para dar una idea de algunas concentraciones y tiempos, se dan los siguientes ejemplos:

Anthurium andreanum (hojas): 30 min. NaClO 1%.

Hyacinthus (brácteas): 15 min. NaClO 1%.

Rhododendron (tallos): 20 min. NaClO 1%.

Gerbera (pecíolos): 15 min. NaClO 1%.

Freesia (yemas florales): 20 min. NaClO 1%.

Strelitzia (hojas): 45 min. NaClO 1%.

Tulipa (semillas): 30 min. NaClO 2%.

Phaseolus (tallos): 10 min. NaClO 1%.

Nephrolepis (ápices del vástago): 5 min. NaClO 1% (Soede, 1979).

A veces la superficie de las heridas puede ser cubierta con parafina, para impedir la penetración del líquido esterilizante en el tallo y/o impedir el sangrado (por ejemplo, en las Euforbiáceas).

Cultivos aparentemente estériles

Hay que tener en cuenta que cultivos aparentemente estériles, no son de hecho siempre estériles. Si el origen de la infección está en los tejidos interiores de la planta, la infección sólo se hace visible cuando el centro infeccioso es cortado (durante el repicado), y se pone en contacto con el medio. La contaminación generalmente sólo se pone de manifiesto después de unos cuantos repicados. Un crecimiento pobre y/o clorosis pueden ser indicadores de una infección interna, por ejemplo, por bacterias como *Erwinia carotovora* (Knauss y Miller, 1978). Se pueden producir también cultivos aparentemente estériles, debido a que el crecimiento del cultivo puede tener lugar en un medio relativamente pobre, en el cual los micro-organismos es difícil que se desarrollen. Entonces las infecciones sólo se hacen visibles, si se hace una inoculación en un medio más rico, o si tiene lugar una mutación del micro-organismo, que le permita desarrollarse en un medio más pobre.

Para asegurarse de que un cultivo es estéril, se corta el ápice de un vástago de forma longitudinal, y se coloca la superficie cortada en un medio rico. Este se puede preparar añadiéndole 2-3% de triptona o peptona (una mezcla de aminoácidos y vitaminas), si el cultivo no es estéril, se produce en el espacio de unos pocos días una explosión de crecimiento bacteriano (Knauss, 1976). Esta técnica no siempre es suficiente, ya que no existe un buen medio de detección para muchas bacterias endógenas.

La contaminación interna en las plantas (Ver apartado Infecciones internas), se debe frecuentemente a bacilos (especialmente *Bacillus licheniformis*

y/o *Bacillus subtilis),* los cuales han recibido el nombre de fantasmas blancos en EE.UU. Estas bacterias saprofitas se encuentran también a menudo en laboratorios microbiológicos. Se caracterizan porque sus esporas son capaces de tolerar períodos desfavorables (calor, sequía, frío, radiación-UV, líquidos esterilizantes). Puede ser necesaria la esterilización del aire, el suelo y el mismo material vegetal para liberar a las plantas y al laboratorio del fantasma blanco.

Infecciones internas

Las infecciones internas, que pueden constituir un problema importante, son causadas por micro-organismos que se encuentran presentes en el interior de la misma planta, y no pueden ser eliminados por esterilización externa. En principio hay dos formas de combatir este problema: El cultivo de meristemos (ya que la mayor parte de los micro-organismos no están presentes en los meristemos), o la adición de antibióticos al medio nutritivo. Teniendo en cuenta que el cultivo de meristemos es muy complicado, y que la adición de antibióticos al medio es muy poco efectiva, la mejor solución ciertamente es utilizar plantas que estén estériles en su interior.

La adición de antibióticos generalmente conduce a fenómenos fitotóxicos: Se necesitan unas concentraciones tan altas de antibióticos que inhiben también el crecimiento y desarrollo de la planta superior. La utilización de antibióticos puede también conducir a la selección de micro-organismos resistentes.

La mayor parte de los antibióticos se añaden al medio por medio de una esterilización de filtrado. Sitchel (1959) y Montant (1957) describieron el uso de la penicilina y la acromicina, otros investigadores han utilizado la tetraciclina y 8-hidroxiquinolina. Staritsky *et al.* (1983) compararon los efectos de diferentes antibióticos (oxitetraciclina, estreptomicina, cloromicetina, penicilina-G, rifampmicina, y gentamicina) sobre el cultivo de *Cryptocoryne* y *Cinchona,* las cuales estaban infectadas internamente con bacterias. Llegaron a la conclusión de que sólo en el tratamiento con rifampmicina se inhibía a las bacterias, consiguiendo al mismo tiempo que no se produjese efecto del antibiótico en el crecimiento y desarrollo de los explantos. Young *et al.* (1984) vieron que ningún antibiótico aislado era eficaz contra contaminantes bacterianos, en el cultivo de vástagos de plantas leñosas, y que una combinación de diferentes antibióticos era más eficaz que cualquiera de ellos suministrado de forma aislada. Se puede encontrar más información, en relación con el uso de los antibióticos para vencer las infecciones internas en George y Sherrington (1984). Estos autores indicaron que en algunos casos los antibióticos son capaces de promover (a veces de forma muy pronunciada) la tasa de crecimiento de los cultivos de tejidos.

En términos generales, se puede decir que la adición de antibióticos a los cultivos *in vitro* de las plantas superiores, no es esperanzadora. Debergh ha llegado a la conclusión (comunicación personal), de que la inhibición del crecimiento de los micro-organismos, por la adición de antibióticos, no resulta ciertamente práctica, en el caso de propagación *in vitro* comercial de plantas. El método más eficaz de superar las infecciones internas es todavía el cultivo de meristemos como lo describió Tramier (1965), para los gladiolos.

Cultivos simbióticos

Aunque el cultivo *in vitro* de las plantas superiores se realiza, por definición, en condiciones estériles, en determinadas circunstancias se pueden introducir micro-organismos. Si la germinación y el subsiguiente desarrollo de las semillas de orquídea no se pueden realizar de forma asimbiótica, se puede llevar a cabo lo que se denomina como germinación simbiótica, añadiendo el hongo con el que la orquídea vive simbióticamente en las condiciones naturales. También se puede utilizar el cultivo simbiótico, para estudiar la simbiosis entre miembros de la familia de las Papilionáceas y bacterias fijadoras de nitrógeno, como el *Rhizobium* en condiciones controladas.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

10
AISLAMIENTO, INOCULACION Y REPICADO

Introducción

Resulta obvio que la inoculación y el repicado deberían llevarse a cabo en las mismas condiciones de esterilidad que el aislamiento. En un laboratorio profesional, estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar, pero si en algún momento no existe disponibilidad de este tipo de recurso (por ejemplo, durante cursos prácticos), algunas operaciones como el cortado, etc., pueden realizarse entre papel de filtro estéril.

Es aconsejable llevar una bata de laboratorio limpia, durante estas operaciones, y lavarse las manos y la superficie de la mesa de trabajo con alcohol de 96%. Los instrumentos, como bisturís, pinzas, agujas de inoculación, etc., deben haber sido previamente esterilizados, por inmersión en alcohol de 96% y posterior flameado. También pueden esterilizarse manteniéndolos en un vaso que contenga pequeñas bolas de cristal a 250° C. Este método (fabricante: S. Keller, Lyssachstrasse 83, CH 3400, Burgdorf, Suiza), tiene la gran ventaja de no necesitar el flameado, que implica riesgo de que se produzca fuego. La esterilización de los instrumentos sin necesidad de alcohol se puede conseguir también, con el aparato denominado Bacti-Cinerator, que ha sido desarrollado en los EEUU. Este aparato se calienta eléctricamente a alta temperatura, y simplemente manteniendo los instrumentos en su interior durante 5 segundos, se obtiene la esterilización. Se debe permitir que se enfríen los instrumentos antes de su uso.

Si se utiliza el alcohol para la esterilización de los instrumentos, éste debe ser renovado de forma regular, ya que las bacterias son capaces a veces de sobrevivir a la inmersión en alcohol, y además este último se contamina con material vegetal, agar, etcétera.

Los explantos, en principio, pueden cortarse de dos formas diferentes (Fig. 10.1): Sobre una placa de cristal esterilizado con alcohol de 96% (tiene el inconveniente de que los instrumentos cortantes pierden enseguida su filo), o también sobre (o entre) papel de filtro estéril (el filo de los instrumentos dura

más tiempo). Resulta cómodo trabajar con dos montones de papel estéril: Uno para el corte de los explantos (se repone regularmente), y otro para dejar los instrumentos estériles, sobre la superficie, o entre los papeles. Para realizar un trabajo eficaz conviene disponer de suficiente número de bisturís, pinzas, etcétera.

Figura 10.1 Preparación de explantos de catafilos de bulbo de jacinto. Los catafilos se esterilizan primero (abajo a la izquierda), antes de que los explantos (abajo a la derecha) sean cortados en la cámara de flujo laminar

Aislamiento

Después de la esterilización y el aclarado, se deja el explanto sobre el papel de filtro estéril, o la placa de vidrio, utilizando unas pinzas. Si las superficies cortadas han estado en contacto con lejía, las partes afectadas se retiran utilizando un bisturí estéril. Las semillas esterilizadas (si no es preciso aislar los embriones) pueden ser sembradas directamente, sin necesidad de más tratamiento.

Frecuentemente es necesario cortar cantidades o volúmenes estándares de tejido, y para realizar esta labor con más facilidad se puede utilizar papel milimetrado (plastificado). Otro material necesario es un taladra-tapones, el aparato de corte ideado por Bouriquet (1952), y balanzas para el pesado estéril en papel de aluminio. Cuando se cortan los explantos es necesario tener en cuenta que el volumen de la pieza puede tener importantes consecuencias (ver también

Capítulo 12): por ejemplo, la cantidad de reservas alimenticias, el área de la superficie cortada (producción de etileno), etcétera.

La preparación de los meristemos se hace utilizando un microscopio binocular, y con la ayuda de una cuchilla de afeitar, convenientemente fijada sobre el mango de una aguja de inoculación. Se pueden producir porciones de cuchilla de afeitar, con forma de punta, pegando cinta adhesiva sobre la hoja y cortando la pieza en punta con unas tijeras muy afiladas o partiéndola con unas tenazas. Se retira entonces la cinta adhesiva y se monta la pieza sobre el mango correspondiente.

Inoculación

Durante la inoculación, el tubo de ensayo o matraz, que contiene el medio sólido, debería estar, en principio, en posición horizontal. Esto reduce fuertemente el número de infecciones, sobre todo cuando no se trabaja en una cámara de flujo laminar. El flameado del cuello del tubo de ensayo o matraz (espe-

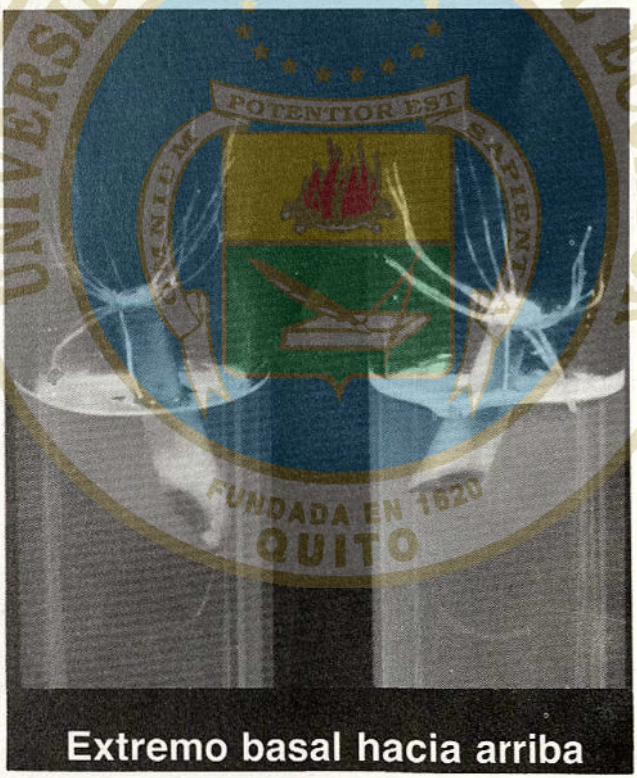


Figura 10.2 La formación de raíces adventicias, sobre explantos de tallo de *Rhododendron* "Catawbiense album", resulta fuertemente estimulada cuando se sitúan los explantos invertidos (de forma apolar) en la oscuridad, sobre un medio que contenga auxina y azúcar. Las raíces adventicias se forman siempre en las zonas basales de los explantos (Pierik y Steegmans, 1975a). Fotografía tomada 8 semanas después del aislamiento

cialmente en cámaras de flujo laminar), es desaconsejable, ya que se puede producir una entrada de etileno en el recipiente (Hughes, 1981).

El método de inoculación sobre medios sólidos depende en gran medida del tipo de material con el que se trabaja. Las semillas se colocan sobre el medio, en lugar de hacerlo en su interior; esto último produciría una deficiencia de oxígeno. Esto es aplicable también a los meristemos que se inoculan sobre el medio, utilizando una aguja de siembra (humedecida con agar estéril), o una porción de una cuchilla de afeitar montada sobre el mango de una aguja de inoculación. Los explantos (por ejemplo, una porción de médula) son generalmente introducidos ligeramente en el agar. Se debe tener cuidado de no introducir demasiado en el agar los ápices del vástago, ya que se produciría una deficiencia en oxígeno. Los explantos mantienen su polaridad después de la siembra: la parte superior, desde un punto de vista fisiológico, mantiene sus características de parte superior, etc. Es muy importante cuando se regeneran

Figura 10.3 Poco tiempo después de su aislamiento, un vástago de un híbrido de *Pelargonium* ha excretado al medio de cultivo un halo de sustancias negras

órganos, saber cómo se ha llevado a cabo la inoculación: polar (derecho, con el lado basal del explanto sobre el medio), o apolar (invertido, con el lado apical sobre el medio). Las raíces adventicias se forman principalmente en el lado basal de los explantos (Fig. 10.2), produciéndose una mejor formación de raíces adventicias cuando la inoculación es apolar, lo que se debe a la mejor disponibilidad de oxígeno. Si el material vegetal original es ortotrópico o plagiotrópico mantiene las mismas características *in vitro*. Para la formación de vástagos axilares, sobre ápices del vástago aislados, a veces es conveniente depositar los vástagos horizontalmente sobre el medio, con lo que se promueve la formación de vástagos laterales (Frett y Smagula, 1983).

Como ya se ha mencionado antes, poco tiempo después del aislamiento *in vitro*, se puede producir un exudado sobre el agar, como un halo pigmentado de marrón/negro (Fig. 10.3). Las maneras de resolver este problema se encuentran en el apartado *Otros compuestos*.

Repicado

El repicado puede ser necesario por diversas razones:

1. El medio nutritivo está agotado (síntomas de deficiencia).
2. El medio nutritivo se seca (haciéndose demasiado elevadas las concentraciones de sal y de azúcar).
3. El tejido u órgano ha crecido, de manera que ocupa todo el tubo o matraz.
4. Se necesita el material para la consiguiente propagación.
5. Aparece sobre el agar un color marrón y/o negro: Los tejidos vegetales producen a veces sustancias tóxicas, durante las semanas iniciales, que son capaces de difundir al agar o medio líquido.
6. Es necesario proporcionar al material aislado un nuevo patrón de crecimiento y desarrollo, sobre un medio nutritivo conocido.
7. El medio se ha hecho líquido, debido a la disminución del pH por la acción de la planta.

El repicado se realiza como a continuación se indica:

1. El tubo o matraz se esteriliza externamente, con un algodón empapado de alcohol de 96%.
2. Se retira del tubo o matraz, en la cámara de flujo laminar, el papel de aluminio o película que recubre el tapón de algodón, después se retira éste (o el steristop).
3. Se extrae el explanto o callo, y se coloca sobre una placa de Petri estéril, o sobre (entre) papel de filtro estéril.
4. Después de trocear el material, en la forma que convenga, se vuelve a inocular sobre un medio nutritivo reciente. Cuando se obtienen diferentes porciones, se selecciona material vigoroso, homogéneo, no necrótico, etcétera.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

11
MECANIZACION

Si se utilizan máquinas en el cultivo *in vitro*, es señal de que se está trabajando con un medio líquido. Esto tiene las siguientes consecuencias (Bonga y Durzan, 1982):

1. No se producen las desventajas propias del agar (un producto natural con una composición química compleja y variable), en consecuencia se obtienen cultivos más uniformes.

2. La división, crecimiento, y propagación vegetativa se hacen más rápidas en un medio líquido que en agar. Ya se están utilizando agitadores y fermentadores en la propagación vegetativa de las azucenas (Takayama y Misawa, 1982).

3. En comparación con los medios sobre agar, la división celular en los medios líquidos es mucho más fácil de sincronizar, haciendo la investigación bioquímica mucho más fácil.

Las máquinas rotatorias y agitadoras se utilizan generalmente cuando se cultivan células, suspensiones celulares, tejidos, protocormos, meristemos y ápices del vástago en medio líquido. Si las células, etc., se cultivan sumergidas en un medio líquido, es generalmente vital mantenerlas en movimiento, por medio de alguna máquina de este tipo. Así se promueve el intercambio gaseoso (oxígeno, dióxido de carbono, etileno), se eliminan los efectos de la gravedad, y se impide la formación de gradientes de nutrientes y hormonales (Street, 1973), también se obtiene crecimiento y/o propagación, y división celular mucho más vigorosa. Estas máquinas suelen instalarse en salas especiales.

Se pueden elegir máquinas con características diferentes:

1. Lentas o rápidas. Ejemplos de máquinas lentas son las llamadas ruedas de orquídeas (Fig. 11.2), y la máquina de Steward; en cambio la mayor parte de los agitadores rotatorios son más rápidos (Fig. 11.1).

2. Algunas máquinas producen la inmersión periódica de las células, tejidos, etc. (como la máquina de Steward), mientras que otras las mantienen continuamente en el medio líquido.

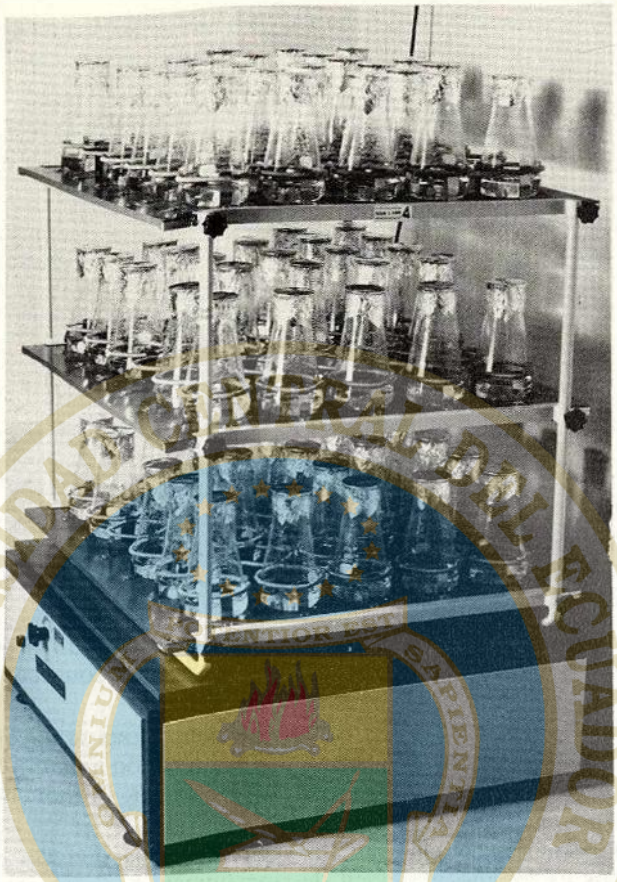


Figura 11.1 Agitador de plataforma rotatoria. Esta máquina rotatoria posee tres estantes, cada uno con 30 matraces Erlenmeyer de 300 ml (conteniendo cada uno 100 ml de medio de cultivo líquido). Los matraces cubiertos de papel de aluminio quedan fijados a los estantes por medio de unos resortes metálicos y abrazaderas

3. Combinaciones de 1 y 2. La rueda de orquídeas (Fig. 11.2), por ejemplo, es una máquina lenta que permite a los meristemos y protocormos de orquídeas permanecer de forma continua en un medio líquido.

Las máquinas lentas tienen generalmente una velocidad de rotación de 2-4 rpm. La rueda de orquídeas tiene una inclinación de 45°, y el aparato de Steward de 12-15°. Se pueden utilizar dos tipos de recipientes con el aparato de Steward: Matraces de fondo grande redondeado, con protuberancias en forma de pezón (Fig. 6.2), y vasos. En la rueda de orquídeas se utilizan tubos de ensayo (colocados en cestillas, Fig. 11.2), o matraces Erlenmeyer de 100 ml (sujetos con abrazaderas o elásticos, Fig. 11.3). La rueda de orquídeas se utiliza también con pequeños matraces para propagar vástagos; en la Fig. 11.3 se puede ver una rueda con matraces Erlenmeyer, en los que, por ejemplo, se

pueden propagar vegetativamente las Bromiliáceas, por formación de vástagos axilares.

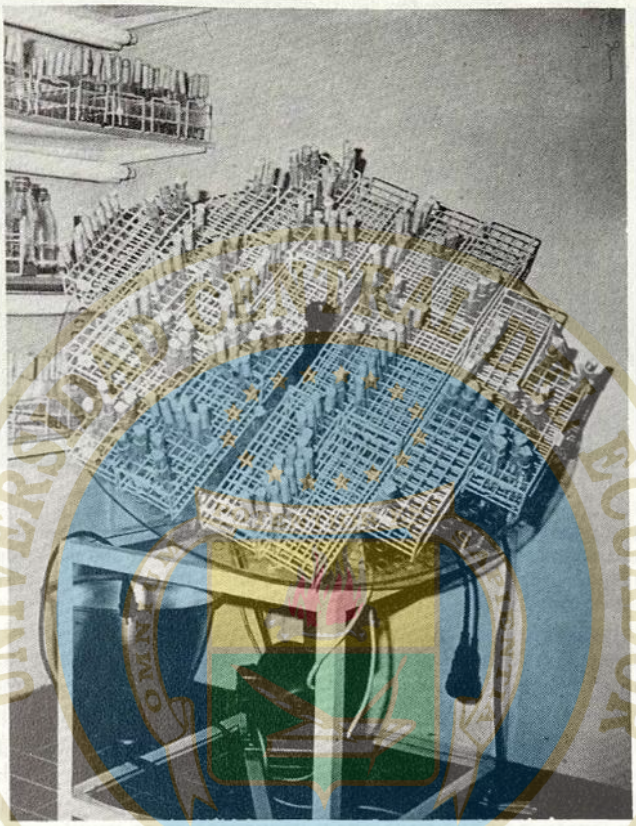


Figura 11.2 Rueda de rotación lenta, utilizada en la industria productora de orquídeas, para su propagación, por medio del cultivo de protocormos y meristemos. Los tubos de ensayo, conteniendo un medio líquido, se sitúan en gradillas, que se adaptan sobre esta mesa rotatoria inclinada

Los llamados agitadores rotatorios suelen girar mucho más rápidamente (30-150 rpm). Este tipo de aparato (con velocidad variable), tiene generalmente tres pisos (Fig. 11.1), con abrazaderas o resortes en cada uno de los pisos para sujetar matraces Erlenmeyer de boca ancha. Los matraces Erlenmeyer (con una capacidad generalmente de 300 ml, conteniendo 100 ml de medio nutritivo), se tapan con papel de aluminio. Los agitadores rotatorios se utilizan principalmente para el crecimiento de células, suspensiones celulares o callos, y prácticamente nunca para meristemos, ápices del vástago o protocormos. La velocidad de rotación de estos aparatos depende del material vegetal que se utilice, ya que una rotación demasiado rápida puede causar daño a las células y agregados celulares.

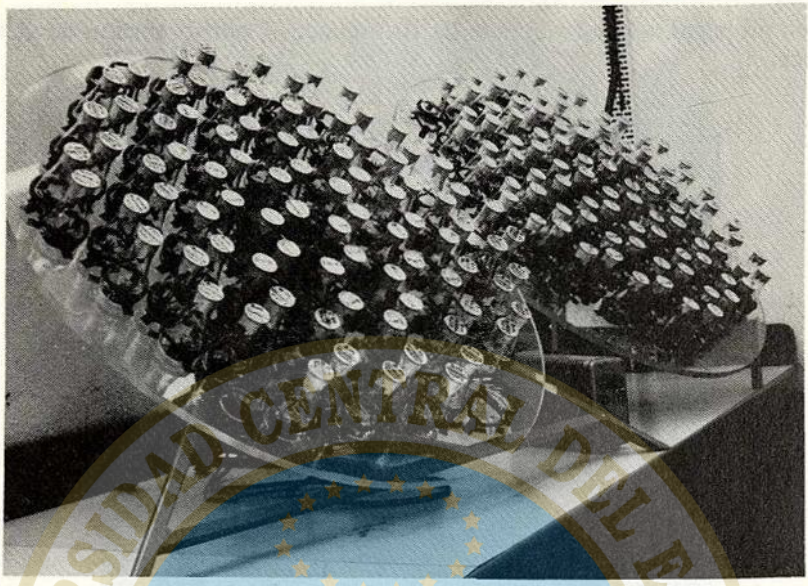


Figura 11.3 Mesas rotatorias lentas, a las que se adaptan matraces Erlenmeyer (sujetos por medio de un resorte y una abrazadera). Cada matraz tiene una capacidad de 100 ml (y contiene 30 ml de medio de cultivo líquido). Este tipo de mesa rotatoria se utiliza para la multiplicación de Bromeliáceas y otras plantas

Hay muchos otros tipos de aparatos aparte de los que se han descrito. Para aplicaciones de biotecnología, las células de las plantas superiores se cultivan en los llamados fermentadores, en los que se lleva a cabo una aireación con aire estéril. Styer (1985), ha publicado recientemente una revisión sobre los aparatos que se pueden utilizar en la multiplicación vegetativa de plantas (especialmente por embriogénesis somática). Una descripción de los tipos de aparatos disponibles, junto con sus ventajas y desventajas, se puede encontrar en el manual de Street (1973), el cual también nos muestra algunos de los diferentes tipos de curvas de crecimiento de células y suspensiones celulares.

Más abajo se indican algunos de los términos técnicos que se utilizan cuando el crecimiento tiene lugar en medio líquido, con la ayuda de un aparato (en King y Street, 1973):

Cultivo discontinuo

Las células crecen en un sistema abierto, que contiene una cantidad definida de medio nutritivo, que no se renueva; el crecimiento se para cuando uno o más de los componentes del medio se agota. En este sistema de cultivo no se da un crecimiento equilibrado.

Cultivo continuo

Las células crecen en un sistema abierto, sobre un volumen de medio nutritivo constante, que se renueva constantemente, siendo la cantidad de medio que entra exactamente igual que la que sale.

Cultivo continuo abierto

Se trata de un cultivo continuo, en el cual la entrada de medio fresco es igual a la cantidad de medio saliente con células incluidas. En este tipo de cultivo se pierden parte de las células con el medio envejecido. Se consigue un "estado estable" cuando el número de células que se pierden es el mismo que el de las que se forman de nuevo.

Cultivo continuo cerrado

Es un cultivo continuo, donde la cantidad de efluente de medio viejo es igual a la cantidad de medio fresco entrante, pero no se produce pérdida de células con el medio envejecido.

Quimostato

Es un aparato donde se desarrolla un cultivo continuo, manteniéndose la tasa de crecimiento y densidad celular constante, fijando la tasa de entrada de un nutriente limitante del crecimiento.

Turbidostato

Aparato donde se lleva a cabo un cultivo continuo. El medio fresco se añade cuando se alcanza una determinada densidad celular. La biomasa es pre-fijada, y se mantiene constante por la eliminación de células junto con el medio envejecido.

Recientemente, Tisserat y Vandercook (1985), han descrito un nuevo sistema automático de cultivo para tejidos, órganos, y plántulas completas, en condiciones estériles. El sistema es válido tanto para un cultivo independiente como para varios cultivos al mismo tiempo. El sistema de cultivo de plantas automatizado (APCS) consta de una tubería de silicona, 2 bombas impelentes, 2 botellas de vidrio para almacenamiento de medio, una válvula de acero inoxidable de 3 vías, una cámara para el cultivo de las plantas y un módulo de interfase con conexiones de tipo relé. El control del APCS se realiza por medio de una micro-computadora, que controla la producción de medio, su reposición y evacuación en un ambiente estéril. El APCS es relativamente barato de construir, ahorra trabajo y constituye un método para períodos prolongados de cultivo *in vitro*. En un artículo posterior de Tisserat y Vandercook (1966), se describe la aplicación del APCS, en cultivos prolongados de la orquídea *Potinara*.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

12

INFLUENCIA DEL MATERIAL VEGETAL SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO

El material experimental por sí mismo, así como el medio nutritivo y los factores fisiológicos de crecimiento, pueden influir en el crecimiento y desarrollo *in vitro*. La influencia del material vegetal se puede resumir de la siguiente forma:

1. *Genotipo.* La capacidad de regeneración en el reino vegetal es muy variada. Las dicotiledóneas generalmente se regeneran mejor que las monocotiledóneas, teniendo las gimnospermas una capacidad muy limitada de regeneración (excepto cuando están en su estado juvenil). Entre las dicotiledóneas se regeneran fácilmente las Solanáceas, Begoniáceas, Crasuláceas, Gesneriáceas y Crucíferas.

Existen grandes diferencias, en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración, entre plantas de una misma especie (Fig. 12.1).

Si una especie regenera órganos fácilmente *in vivo (Saintpaulia ionantha, Begonia rex,* híbridos de *Streptocarpus),* cabe esperar que tenga casi el mismo comportamiento *in vitro*. Sin embargo, a veces existen profundas diferencias, entre la capacidad regenerativa *in vivo* e *in vitro*: por ejemplo, es casi imposible conseguir la formación de vástagos adventicios, *in vivo,* a partir de esquejes de hojas de *Kalanchöe farinacea,* mientras que se pueden obtener con facilidad *in vitro,* quizá debido a una mejor absorción de los reguladores.

2. *Edad de la planta.* Los tejidos embrionarios generalmente tienen una alta capacidad regenerativa, y por ejemplo en el caso de los cereales, los embriones y las semillas se utilizan frecuentemente como material experimental para el cultivo de tejidos. Conforme una planta envejece, su capacidad regenerativa suele disminuir, y por eso se tiende a utilizar material procedente de plantas juveniles, mejor que de plantas adultas, especialmente en el caso de árboles y arbustos.

Algunos ejemplos notables de diferencias en capacidad para división celular y regeneración, *in vitro,* entre plantas juveniles y adultas se encuentran en:

Hedera helix (Stoutmeyer y Britt, 1956), *Lunaria annua* (Pierik, 1967), y *Anthurium andreanum* (Pierik *et al.*, 1974a).

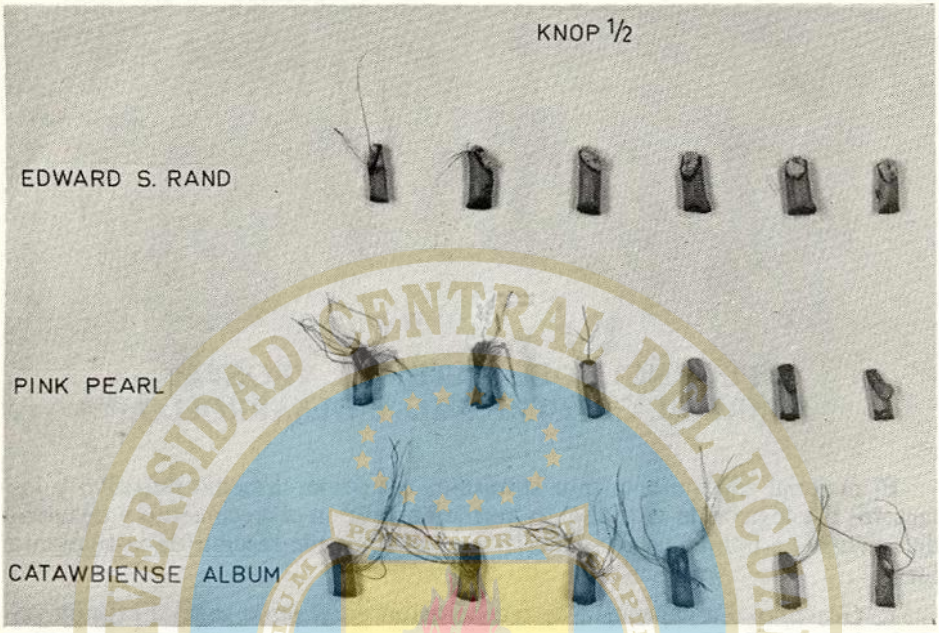


Figura 12.1 Regeneración de raíces adventicias, a partir de explantos de tallo, situados de forma apolar, de tres cultivares de *Rhododendron*. Como medio mineral (macro-elementos) se utilizó la solución de Knop (1884), diluida a la mitad. De arriba abajo: cultivares con formación de raíces adventicias; pobre, moderada y razonable, respectivamente (Pierik y Steegmans, 1975a). Fotografía tomada 8 semanas después del aislamiento

Cuando se aislan meristemos y ápices del vástago (iniciales del vástago), se debe tener en cuenta que los ápices del vástago juveniles permanecen como juveniles *in vitro*, mientras que los ápices del vástago adultos se comportan como tales. A veces a través de repicados repetidos de ápices del vástago o especialmente meristemos, un meristemo adulto, de forma gradual (paso a paso), adquiere caracteres juveniles. Este rejuvenecimiento se traduce en un incremento de la división celular y la regeneración, como ha sido demostrado por Hackett (1985), para *Pinus pinaster, Sequoia sempervirens, Vitis vinifera, Malus sylvestris,* híbridos de *Rhododendron, Thuja occidentalis* y *Cryptomeria japonica*. El rejuvenecimiento se puede conseguir también por la formación de vástagos adventicios, y el cómo se consiguen éstos, así como otros métodos de rejuvenecimiento se pueden encontrar en el Apartado Regeneración de explantos.

3. *Edad del órgano* o *tejido*. Los tejidos jóvenes, no lignificados, por lo general son más apropiados para el cultivo que los tejidos viejos y leñosos, aunque se puede encontrar un gran número de excepciones en la bibliografía.

Cuando se aislan fragmentos de un peciolo, se ve que un peciolo muy joven frecuentemente produce una regeneración mejor que un peciolo joven (Fig.

12.2), y el joven a su vez se comporta mejor que uno viejo. Conforme envejece el órgano, a partir del que se toma el explanto, el número de divisiones celulares y la capacidad de regeneración disminuyen.

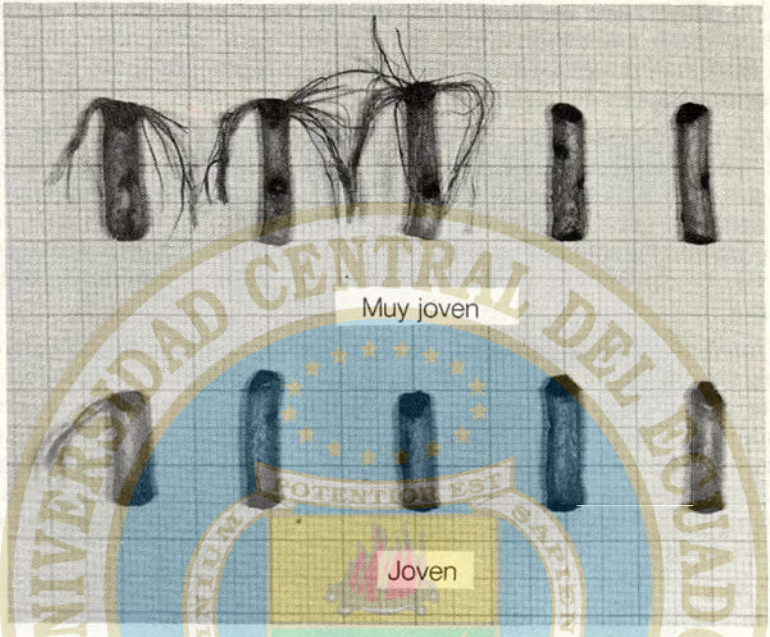


Figura 12.2 La formación de raíces adventicias *in vitro*, sobre explantos de tallo de *Rhododendron* "Van Weerden Poelman" colocados apolarmente, es estimulada utilizando peciolos muy jóvenes (tiernos). Los peciolos jóvenes son 5 días más viejos que los peciolos muy jóvenes (Pierik y Steegmans, 1975a). Fotografía tomada 8 semanas después del aislamiento

Es notable el hecho de que la capacidad regenerativa de algunas especies (independientemente de su edad), aumenta durante la floración: fragmentos de inflorescencias jóvenes presentan a veces una extraordinaria capacidad de regeneración, como se ha demostrado con *Freesia* (Bajaj y Pierik, 1974), *Lunaria annua* (Pierik, 1967), *Ranunculus sceleratus* (Konar y Nataraja, 1969), algunas Amarilidáceas (Pierik *et al.*, 1985; Pierik y Steegmans, 1986a), *Primula obconica* (Coumans *et al.*, 1979) y *Rhododendron* (Meyer, 1983).

4. *Estado fisiológico.* Este tiene un fuerte efecto sobre la división celular y la regeneración *in vitro*. En general los fragmentos de plantas en estado vegetativo, regeneran *in vitro* con más facilidad que los fragmentos de plantas en estado generativo, aunque se pueden encontrar algunas excepciones como las que se indican en el apartado inmediatamente anterior. Explantos de catafilos de azucena en estado vegetativo regeneran mejor, que los correspondientes de plantas en estado generativo (Robb, 1957). Los fragmentos de plantas juveniles regeneran con más facilidad que los procedentes de plantas adultas. Las yemas (especialmente de árboles y arbustos), que se encuentran todavía en estado de reposo (final de otoño o principio del invierno), son más difíciles de cultivar *in*

vitro que las que proceden de plantas que ya no están durmientes (tomadas en primavera, inmediatamente antes del inicio de su crecimiento). La dormición es muy importante considerarla también, cuando se trabaja con semillas.

5. *Estado sanitario.* Existen más probabilidades de éxito en el cultivo *in vitro*, si la planta tiene un buen estado de salud en el momento del aislamiento. Si se debe elegir entre individuos de un mismo clon, se deben tomar los más sanos como material experimental, ya que esto repercute sobre el porcentaje de infección después del aislamiento.

6. *Efecto del tiempo atmosférico.* Si los explantos se obtienen de material vegetal, procedente de plantas cultivadas en el campo, se pueden encontrar diferencias debidas a las condiciones meteorológicas como por ejemplo un invierno riguroso, que facilita la ruptura de la dormición; un verano seco, responsable de un crecimiento pobre si ha faltado el agua; luz insuficiente durante el período de crecimiento, que puede significar una menor cantidad de sustancias de reserva.

7. *Condiciones de crecimiento.* Si el material ha sido cultivado bajo condiciones naturales de luz y duración del período luminoso, reaccionará de modo diferente al que haya crecido en un invernadero. En general el material de invernadero (más etiolado) regenera con más facilidad que el procedente del exterior, un buen ejemplo lo constituye el *Rhododendron* (Pierik y Steegmans, 1975a). En el caso de las begonias, que florecen en el invierno, las condiciones de crecimiento (duración del día y temperatura) tienen un efecto claro en la formación de raíces adventicias y brotes.

8. *Posición del explanto dentro de la planta.* Topófisis es el fenómeno que explica la influencia de la posición del explanto en el vegetal, sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro*, después del aislamiento. Por ejemplo, cuanto más alto es el vástago aislado de un árbol, menor es la probabilidad de que se formen raíces adventicias; ya que las porciones más altas son más adultas que las más bajas. Un ejemplo de topófosis fue descrito por Evers en 1984. Este autor encontró trabajando con *Pseudotsuga menziesii*, que las iniciales del vástago, aisladas de posiciones bajas en el árbol mostraron un mejor desarrollo *in vitro*, y que las yemas terminales crecían más rápidamente que las yemas axilares.

Igualmente, si se aislan los explantos y se anota su posición original en la planta, generalmente se pueden observar las diferencias como gradientes de regeneración. Por ejemplo, resulta obvio que el jacinto forma bulbos adventicios con más facilidad sobre explantos aislados de la base del catafilo, que de la parte superior. Lo mismo ocurre con catafilos de azucena (Robb, 1957). También se han encontrado gradientes de regeneración en tabaco (Aghion-Prat, 1965), *Lunaria annua* (Pierik, 1967), y *Brassica carinata* (Jaiswal, 1986). Merece la pena destacar, que callos que se originan de explantos, que proceden de partes diferentes de la planta, como raíces, vástagos, peciolos, etc., pueden reaccionar de forma idéntica a sus órganos originarios cuando se cultivan *in vitro* (Barker, 1969).

9. *Tamaño del explanto.* En términos generales se puede decir que es mucho más difícil inducir el crecimiento en estructuras muy pequeñas como células, agregados de células, y meristemos, que en estructuras más grandes, como

explantos de hoja, tallo o tubérculo. Cada fracción aislada de una planta tiene su propia porción de reservas y hormonas, y es obvio que cuanto mayor sea el fragmento vegetal, más fácil es inducir el crecimiento y regeneración (Fig. 12.3). Las fracciones de plantas que contienen grandes cantidades de reservas alimenticias como tubérculos, bulbos, etc, generalmente se regeneran más fácilmente *in vitro*, que aquellas que contienen menos reservas. Cuando se aislan explantos grandes, la adición de nutrientes (azúcares, minerales) y reguladores puede tener menos efecto.

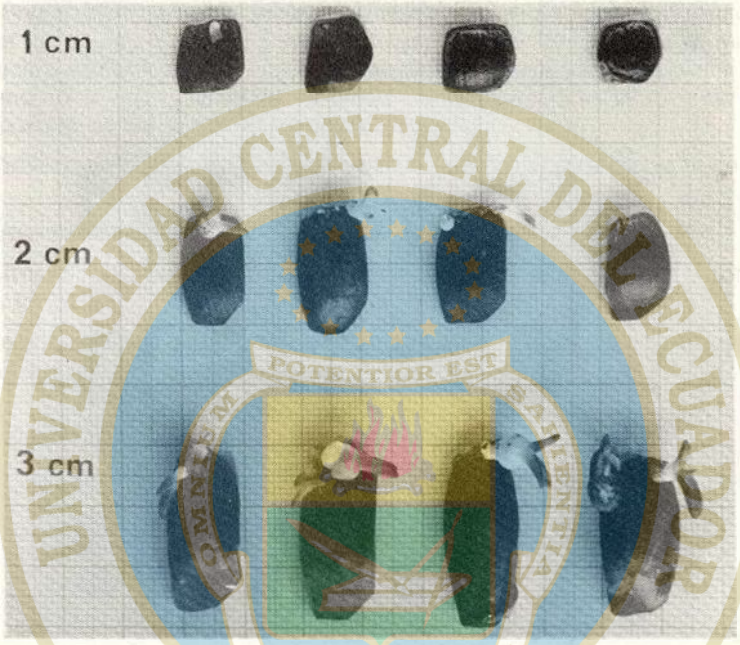


Figura 12.3 Influencia de la longitud del explanto, sobre la capacidad regeneradora, de explantos de catafilo de bulbo de jacinto, situados de forma apolar (Pierik y Ruibing, 1973). Fotografía tomada 12 semanas después del aislamiento

Cuando se obtienen explantos (pequeños versus grandes), se debería tener en cuenta que la proporción entre superficie herida e intacta, puede influir en la regeneración. La influencia de la herida (que induce la formación de etileno), sobre la regeneración de explantos de bráctea de bulbo de azucena, ha sido descrita claramente por Van Aartrijk (1984).

Relacionado con lo anterior es el "efecto masa", que juega un papel importante en el crecimiento de células y de las semillas de orquídea. Se debe tener cuidado de que exista una determinada densidad celular, cuando se inicia un cultivo de células, por ejemplo, sobre placas de agar, ya que este factor puede inhibir la división celular. Las semillas de orquídea germinan *in vitro* mucho mejor cuando la densidad de siembra es elevada. También el subsiguiente crecimiento y desarrollo es mejor si las plántulas están juntas que si están separadas. Este "efecto masa" se conoce también como "efecto comunidad", en la bibliografía.

10. *Tipo de lesión.* Cuando se obtienen explantos se debería tener en cuenta que la superficie de tejido que es lesionada puede ser de gran importancia. Un aumento de la superficie lesionada aumenta también la posibilidad de absorción de nutrientes y reguladores, aumentando simultáneamente la producción de etileno. Al mismo tiempo las heridas o lesiones pueden romper barreras de tipo anatómico en los explantos, (por ejemplo, una capa de fibras de esclerénquima), facilitando la formación de raíces adventicias (Fig. 12.4).

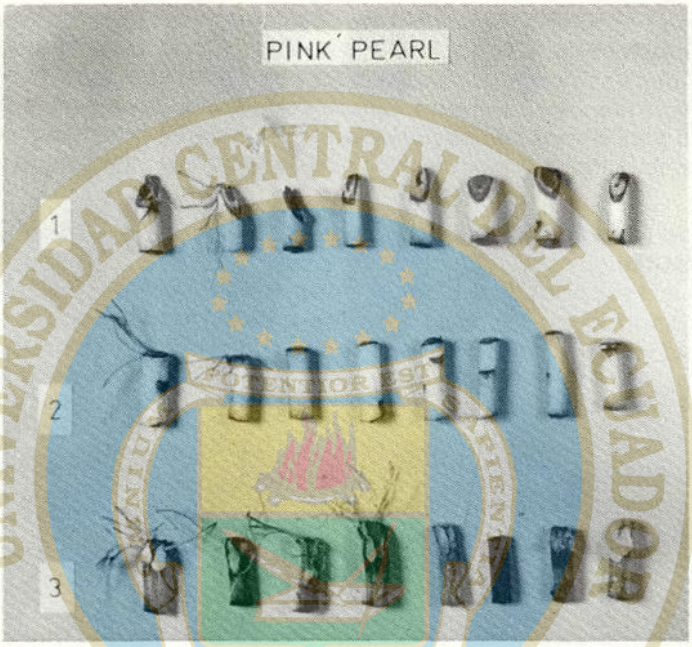


Figura 12.4 Efecto de las lesiones sobre la regeneración de raíces, en explantos peciolares, colocados apolarmente, de *Rhododendron* "Pink Pearl". En 1, los explantos han sido cortados de forma oblicua; en 2, de forma transversal; mientras que en 3, se ha retirado una tira de corteza, en toda la longitud del explanto. La regeneración de las raíces es estimulada cuando se elimina la tira de corteza (Pierik y Steegmans, 1975a). Fotografía tomada a los 8 meses del aislamiento

11. *Método de inoculación.* Los explantos se pueden situar en el medio nutritivo de diferentes formas: Polar (derechos, con su base fisiológica apoyada sobre el medio), o apolar (invertidos, con su base fisiológica fuera del medio y su parte superior apoyada en el medio). Las raíces y los vástagos son capaces de regenerar generalmente con más facilidad y más rápidamente si se hace una inoculación apolar (Pierik y Steegmans, 1975a). Esta mejor regeneración puede ser el resultado de una mejor oxigenación, sin embargo, también existen otros factores que pueden jugar su propio papel. Los explantos que son inoculados de forma apolar tienen sustancias acumuladas en su base que no llegan a difundir al agar, por su falta de contacto.

Cuando la regeneración de órganos sólo tiene lugar en la base de los catafilos del bulbo, como ocurre en las Amarilidáceas (Pierik *et al.*, 1985), el méto-

do de inoculación cobra especial importancia; la inoculación apolar produce mejor formación de bulbos adventicios, que la polar.

12. *Efecto nodriza.* Este efecto se menciona en la bibliografía especialmente cuando se trata del crecimiento de células o de agregados celulares, sobre placas de agar. Describe la influencia de agregados de tejido calloso, cuando están situados en el centro de una población de células. El callo produce sustancias que difunden en el medio y ejercen un efecto positivo sobre la división celular de las células individuales de la placa.

13. *Preparación.* La condición fisiológica del material inicial puede tener una gran influencia sobre el crecimiento *in vitro* de los explantos; ya se han visto muchos ejemplos de diversos tratamientos en este capítulo. Otra posibilidad es modificar artificialmente el estado fisiológico del material de partida; esto es posible de las siguientes formas (Debergh, 1986):

— Pulverizando las plantas madre con reguladores (por ejemplo con citoquininas).

— Inyectando el material de partida con reguladores.

— Situando las plantas, de las que se van a obtener los explantos en una solución forzada (con azúcares, BA, GA_3, etc).

— Incubando los explantos primarios en soluciones que contengan, por ejemplo, diferentes concentraciones de BA.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM RERUM PRINCIPIA EST SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

13
INFLUENCIA DE LOS FACTORES FISICOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO

La cámara de cultivo

Resulta necesario, tanto para la investigación como para la aplicación práctica del cultivo *in vitro*, el disponer de una cámara de cultivo, en la que se puedan controlar la luz, temperatura, etc. En la mayor parte de los casos una única cámara es insuficiente, especialmente cuando se trabaja con especies diferentes, que tienen necesidades diferentes de temperatura, o con una especie con la que se experimenta en distintos regímenes térmicos. La cámara debe estar bien aislada, de manera que no se vea afectada por los cambios de temperatura externos. La iluminación es suministrada generalmente por tubos fluorescentes, situándose el equipo de control fuera de la cámara, ya que si estuviese en el interior, sería preciso incrementar la instalación frigorífica, debido al calor que desprenden dichos equipos. Cuando se enciende la iluminación es necesario refrigerar la cámara de cultivo, para disipar el calor. La cantidad de refrigeración necesaria depende del número de tubos fluorescentes que se usen. La temperatura de una cámara bien aislada se debe poder mantener al nivel deseado durante la noche, pero si está mal aislada será necesario añadir calefacción. El control de la temperatura (refrigeración y calefacción) se consigue con la ayuda de un termostato.

La temperatura se puede controlar por dos métodos diferentes: colocando un elemento refrigerador y calefactor en cada cámara, o haciendo pasar aire frío o caliente por las diferentes cámaras de crecimiento, y que provenga de una fuente central. El segundo método de control de temperatura se utiliza especialmente en grandes laboratorios, con muchas cámaras de crecimiento. Una gran ventaja de este sistema consiste en que el exceso de producción de calor de una cámara (durante el período luminoso) puede ser utilizado para calentar otras cámaras, si es preciso (durante el período oscuro), en este caso es un pre-requisito que los períodos luminosos en las cámaras no sean coincidentes. En algunos laboratorios comerciales se utiliza un sistema, en el que la mitad de las cámaras de crecimiento está completamente desfasada (la mitad

de las cámaras en un momento determinado está en período luminoso, mientras que la otra mitad está en oscuridad). En este sistema las necesidades de calefacción y refrigeración se reducen a un mínimo. En este tipo de instalaciones el equipo de control de las lámparas se monta generalmente en el interior de las cámaras de crecimiento.

Cualquiera que sea el sistema de control de temperatura elegido (dentro o fuera de la cámara de crecimiento), es necesario asegurarse de que en el interior de las cámaras y en particular entre las gradillas de crecimiento, existe una buena ventilación. Si los diferentes pisos de gradillas de crecimiento se encuentran muy juntos (Fig. 13.1), produciéndose una cierta falta de ventilación, la temperatura puede hacerse en determinados puntos demasiado alta, debido a los tubos fluorescentes. Este hecho puede tener graves consecuencias para algunas especies.

Los tubos fluorescentes pueden ser instalados de formas diferentes. Pueden ser montados debajo de los estantes, quedando encima de los cultivos. Este

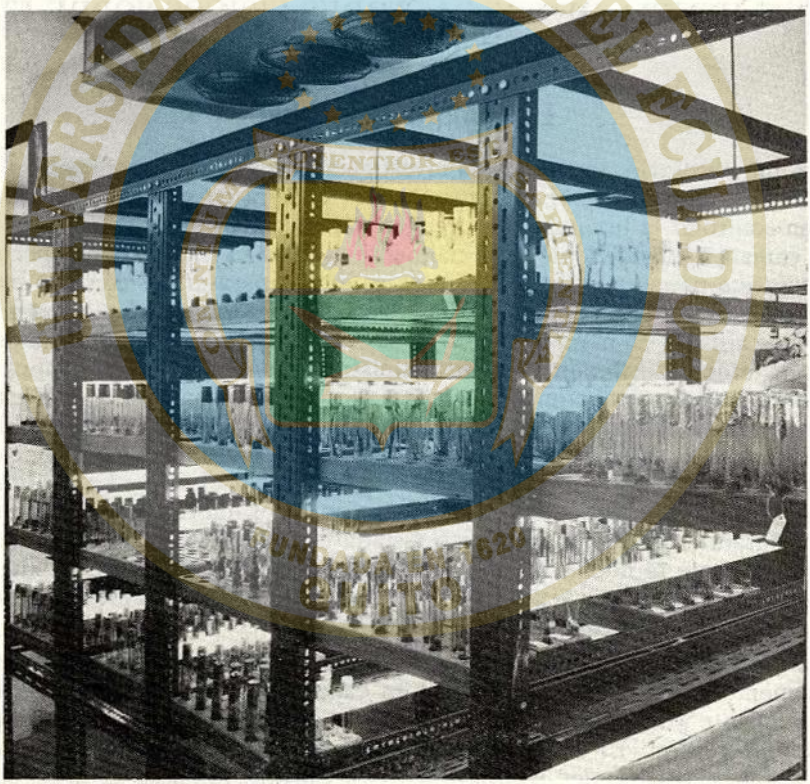


Figura 13.1 Cámara de cultivo, en la que se pueden regular la luz y la temperatura. Las estanterías están construidas a partir de un perfil metálico ranurado. Los tubos fluorescentes han sido colocados a media altura dentro de cada estante. La unidad de refrigeración se puede ver en el techo, sobre la estructura metálica. Los tubos de ensayo se mantienen en orificios, practicados sobre bloques de madera. En el trabajo de investigación resulta de gran utilidad el disponer de una mesa en la cámara de cultivo para realizar observaciones

sistema tiene la desventaja de que los cultivos situados en los estantes inmediatamente por encima de las lámparas tienen una temperatura más alta que aquellos que se encuentran debajo, sin embargo, tiene la ventaja de que suministra una iluminación más uniforme a los cultivos, que el segundo método de instalación. En éste las lámparas se montan en posición central entre los estantes (ver Fig. 13.1), dando una luz menos uniforme, pero presentando menos problemas en la calefacción de los cultivos. En los dos sistemas se mantiene el problema de que los recipientes de cultivo más cercanos a los tubos fluorescentes, alcanzan una temperatura superior que los que se encuentran más alejados. Para asegurarse de que la variación de temperatura entre los estantes sea lo más pequeña posible, lo mejor es utilizar gradillas de metal abiertas, en lugar de estructuras en forma de caja. Incrementando el movimiento de aire dentro de la cámara, es posible evitar, de forma parcial, el incremento de temperatura en recipientes de vidrio o plástico, que estén iluminados.

Aún debemos considerar tres aspectos más sobre la irradiación:

1. Si la temperatura en las cámaras de crecimiento sube, como resultado del uso de tubos fluorescentes, el sistema de refrigeración entra en funcionamiento a una temperatura específica pre-fijada. Si por cualquier razón el sistema de refrigeración no funciona (por ejemplo, por una fuga en el sistema de refrigeración), la temperatura puede subir hasta producir la muerte de los cultivos. Para evitar este problema, es importante que cada cámara de crecimiento posea un sistema de seguridad, de manera que las luces se corten, cuando se alcance una determinada temperatura crítica.

2. Al instalar los tubos fluorescentes, se debe requerir la asesoría del fabricante sobre el tipo de tubo etc., ya que esto puede tener una influencia considerable sobre el crecimiento y morfogénesis de las plantas. Los tubos fluorescentes sólo deben sustituirse cuando se agotan.

3. La luz emitida por los tubos fluorescentes declina desde el momento en que se encienden por primera vez: Si consideramos como 100 la cantidad de irradiación al principio de su vida, este valor cae hasta 93 en 8 días, hasta 86 en 4 meses, y hasta 70 después de un año.

Es extremadamente difícil indicar si un cultivo particular debería ser cultivado en la luz o en la oscuridad, a alta o a baja temperatura. Generalmente lo mejor es elegir las condiciones de luz y temperatura que constituyen un óptimo, para el crecimiento y desarrollo del material experimental *in vivo*. Algunas veces cuando se cultiva un embrión, tejido, órgano, etc., se hacen necesarias condiciones especiales, primero de luz y después de oscuridad o viceversa. Por ejemplo, un período oscuro, seguido de otro luminoso, es necesario para la formación de vástagos adventicios a partir de yemas florales jóvenes de *Freesia* (Pierik y Steegmans, 1975b). Para la germinación de las semillas, unas veces se requiere luz y otras oscuridad, a las semillas se les llama germinadoras a la luz o en la oscuridad respectivamente. En la bibliografía, frecuentemente se encuentran conclusiones contradictorias; por ejemplo, un autor puede indicar la necesidad de luz para que se produzca la organogénesis, trabajando con la planta X, mientras que otro autor, trabajando con la planta Y, llega a la conclusión opuesta.

Discusión sobre factores físicos especiales

Se conoce poco la influencia de los factores físicos porque:

1. Los experimentos en los que se varía la luz y la temperatura son relativamente caros. Se necesitan muchas cámaras con diferentes temperaturas, longitud de los días y fuentes luminosas. Es posible estudiar la influencia de la irradiancia utilizando un dispositivo experimental como el que se indica en la figura 13.2. La irradiancia puede ser reducida cubriendo los cultivos con capas adicionales de gasa.

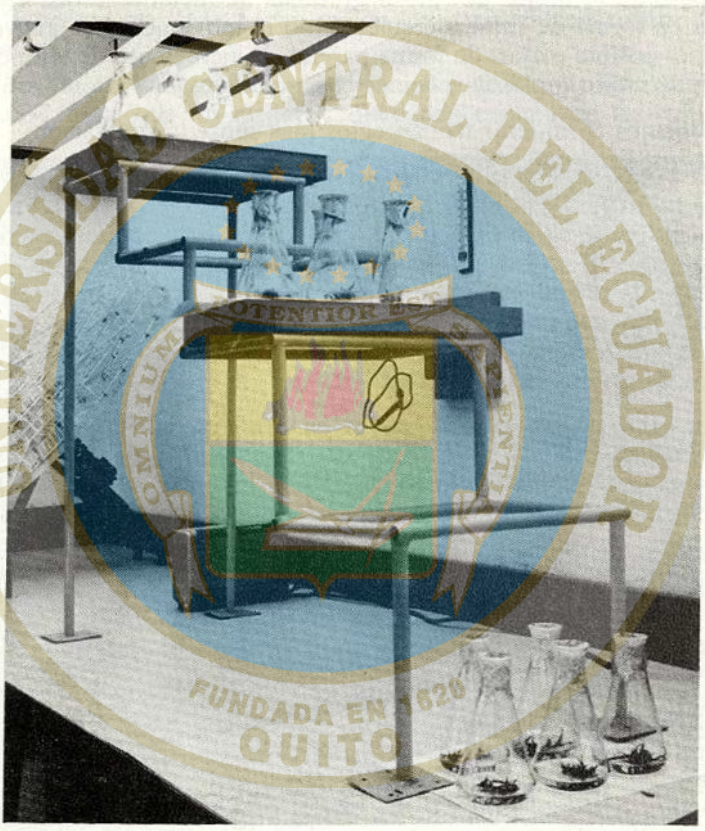


Figura 13.2 Para estudiar el efecto de la irradiancia, los cultivos se pueden colocar sobre algún tipo de escalera, sobre una mesa de la cámara de cultivo. Los tubos fluorescentes en este caso, se encontraban a 150 cm de distancia de la superficie de la mesa

2. No hay resultados experimentales que muestren la influencia del suministro de CO_2 y O_2 a un cultivo *in vitro*.

3. Existe poca información sobre el microclima en tubo de ensayo o matraz. Si la concentración de CO_2 en el tubo es alta, hay poco interés en realizar suministros adicionales de CO_2.

A continuación se da una breve revisión de lo que se conoce sobre la influencia de los factores físicos en el cultivo *in vitro*.

Luz. Se trata de un factor más complicado de lo que se pensaba al principio; la duración del día, irradiancia y composición espectral (que depende mucho del tipo de lámpara), son especialmente importantes. Estos tres factores se consideran más adelante.

Se sabe poco sobre el efecto de la duración del día en el cultivo *in vitro*, generalmente se eligen días de 14-16 horas, aunque también se usa luz continua. En casos muy especiales el cultivo se realiza en completa oscuridad (por ejemplo, las semillas de orquídea que requieren oscuridad). Si se estudian procesos que son extraordinariamente sensibles a la luz del día (Fig. 13.3), como la dormición y la floración, se debe tener especial cuidado en la elección del fotoperíodo. En principio el mejor fotoperíodo *in vitro* será el que también funcione mejor con esquejes o plantas intactas.

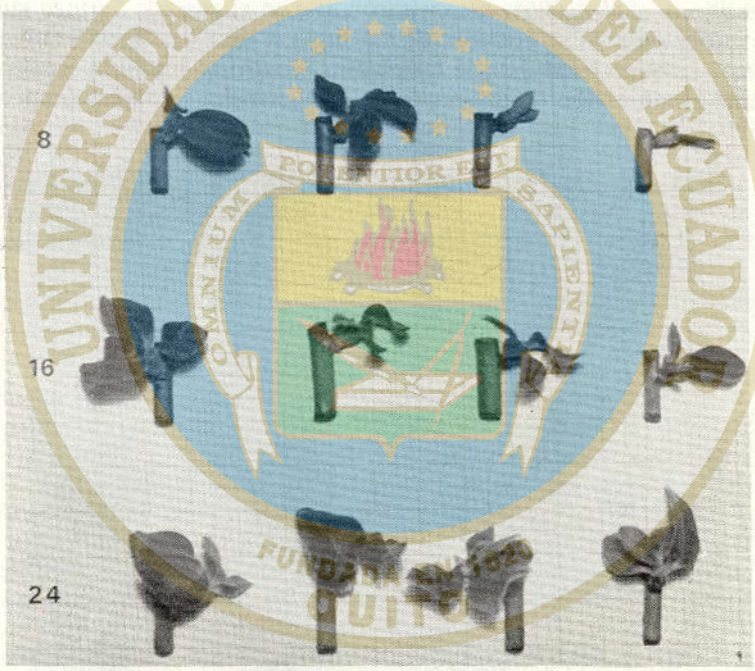


Figura 13.3 Los explantos de tallo de *Rhododendron* "Pink Pearl", con yemas (obtenidos de plantas cultivadas en condiciones de día largo), reaccionan *in vitro*, de forma favorable al alargamiento del día, desde 8 a 16, o incluso hasta 24 horas, desarrollando las yemas (Pierik, 1976). Fotografía tomada 6 semanas después del aislamiento

Es algo más fácil aconsejar sobre la irradiancia, ya que se sabe más acerca de este factor. Las irradiancias altas, que habitualmente se producen en campo abierto o en fitotrón (30-70 Wm^{-2}), son casi sin excepción dañinas para los cultivos *in vitro*. Esto se puede explicar por las altas temperaturas que se producen en los tubos de ensayo u otros recipientes (y que son resultado de la

irradiación; el llamado efecto invernadero). El crecimiento generalmente tiene lugar a una irradiancia de 8-15 W m^{-2}, o a veces a una irradiancia muy baja (Fig. 13.4). Se elige generalmente una irradiancia baja, ya que se asume que la fotosíntesis *in vitro* está generalmente limitada por la baja concentración de CO_2 que se da sobre el agar (Hanson y Edelman, 1972). En realidad esta suposición no es correcta, ya que existe más bien un exceso que una falta de CO_2 en los tubos, recipientes, etc. Si los tejidos no contienen clorofila, no existe la necesidad de la irradiación (Bergmann, 1967). En el caso de especies leñosas, parece que una irradiancia superior a la hasta ahora aconsejada (8-15 W m^{-2}) podría ser ventajosa. Evers, en 1984, demostró que en el caso de primordios aislados, del vástago de *Pseudotsuga menziesii*, las irradiancias necesarias para obtener efectos óptimos, en el crecimiento y desarrollo fueron de 36,4 W m^{-2} cuando el aislamiento tuvo lugar en enero, y 24,5 W m^{-2}, cuando se realizó en abril. También demostró que una irradiancia demasiado baja no podía ser compensada por la adición de azúcares. En contraste con estas observaciones Pierik *et al.* (1986), demostraron que en el caso de *Syringa vulgaris* el crecimiento y desarrollo óptimos tienen lugar a una irradiancia muy baja de 4-5 W m^{-2}. La suposición de que las plantas *in vitro* se hacen "perezosas" si se les suministra un exceso de azúcar con el agua, no ha sido aún comprobada.

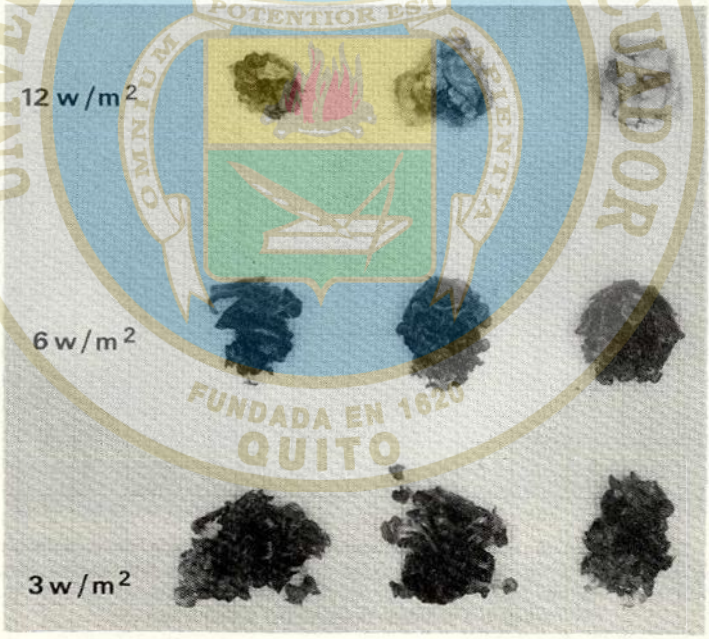


Figura 13.4 Los tejidos callosos de *Begonia venosa* que regeneran brotes adventicios son muy sensibles a la irradiancia. Aquí se puede observar cómo los mejores resultados corresponden a un nivel bajo de irradiancia (3 Wm^{-2}) (Pierik y Tetteroo, 1986). Fotografía tomada 12 semanas después del aislamiento

Casi siempre se utilizan para el cultivo *in vitro*, tubos fluorescentes (tipo blanco frío), aunque en algunos casos se han observado mejores resultados con luz de sodio de alta presión (Norton y Norton, 1986a). Los laboratorios holandeses utilizan sobre todo tubos fluorescentes Philips, tipo 33 (38 W). La importancia que la elección de las lámparas puede suponer ha sido indicada por Schneider-Moldricks (1983). Esta investigadora estudió la influencia de 6 tipos diferentes de tubo de luz fluorescente, sobre la formación de vástagos adventicios en explantos de hoja de *Kalanchöe*. Se obtuvieron los mejores resultados con los tipos Interna 39 y Warm White de Lux 32, que son los que tienen una proporción relativamente alta de luz rojo-naranja. Las lámparas que producen una porción relativamente alta de luz UV o UV cercana presentaron un efecto inhibidor en la formación de vástagos adventicios.

Otro trabajo ha puesto de manifiesto que el papel de la luz no debería ser menospreciado. Beauchesne y otros (1970), demostraron que si se añade IAA, las luces roja y verde son mucho más efectivas que la azul para estimular el crecimiento de los tejidos de tabaco. Más tarde se descubrió que la luz azul descompone el IAA, aunque no el NAA, limitando en consecuencia el crecimiento. Estos resultados no son válidos para los tejidos de chopo, sauce, crisantemo y dalia. La luz roja (660 nm) también estimula la formación de raíces adventicias, en *Helianthus tuberosus*, más que la luz azul (Letouzé y Beauchesne, 1969). Ward y Vance (1968) demostraron que el crecimiento del callo de *Pelargonium* era mejor con luz blanca (policromática), o azul, en comparación con la luz roja o verde o la oscuridad total. Seibert *et al.* (1975) también indicaron que la luz azul y violeta estimulaban la formación de vástagos adventicios en callos de tabaco, mientras que la luz roja inducía la formación de raíces adventicias. Se puede concluir de forma general que la luz blanca generalmente inhibe la formación de raíces adventicias (Pierik y Steegmans, 1975a), y promueve la formación de vástagos adventicios.

Se puede hacer la siguiente observación, acerca de los diferentes papeles que juegan la luz roja y la infrarroja. En la mayor parte de los casos ocurre que la luz roja promueve la formación de vástagos adventicios: *Pseudotsuga menziessii* (Kadkade y Jobsen, 1978), *Petunia hybrida* (Economou y Read, 1986), y *Brassica oleracea "Botrytis"* (Bagga *et al.*, 1986). Degani y Smith (1986), trabajando con tabaco, son los únicos autores que han descrito un efecto inhibidor sobre la organogénesis, por parte de la luz roja. Se ha visto también que la luz roja promueve la formación de raíces adventicias en *Rhododendron* (Economou, 1986), y en *Petunia hybrida* (Economou y Read, 1986). Toda esta información nos conduce a la conclusión de que el sistema rojo/rojo lejano es importante para la formación de raíces y vástagos adventicios. Una revisión detallada del papel de la luz (longitud de onda, duración del día, irradiancia), se puede encontrar en el manual de George y Sherrington (1984).

Temperatura. La temperatura se mantiene generalmente constante a 24-26°C. A veces, dependiendo de la especie experimental, se elige una temperatura más baja (18°C para las especies bulbosas), o una temperatura más alta (28-29°C para las especies tropicales; Fig. 13.5). La temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, es generalmente 3-4°C más alta que la correspondiente para el crecimiento *in vivo*. Teniendo en cuenta que la temperatura en los tubos de ensayo es 3-4°C más alta que en la cámara de crecimiento,

debido al efecto de la irradiación, la temperatura de esta última puede ser mantenida en el óptimo para el crecimiento *in vivo*.

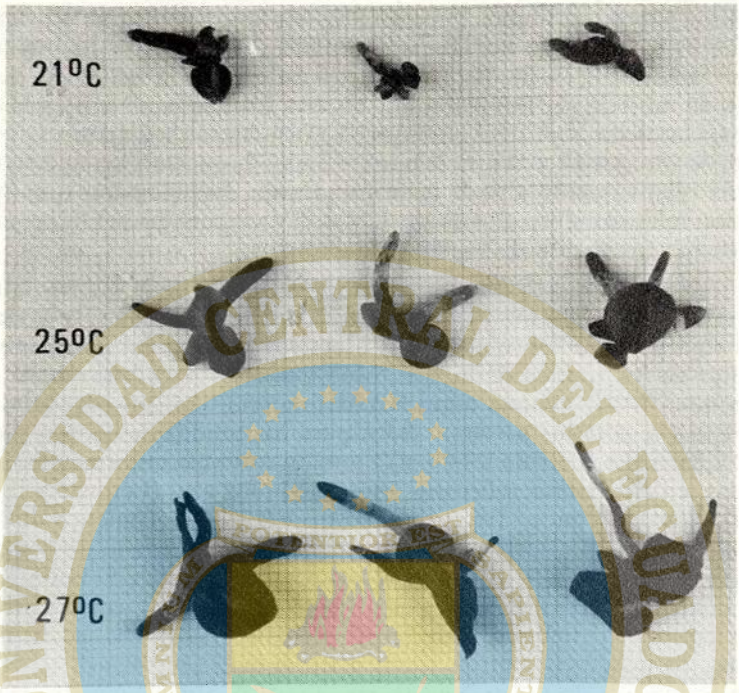


Figura 13.5 El crecimiento *in vitro* de las plántulas de los híbridos de *Phalaenopsis*, es óptimo a la temperatura de 27 °C (Pierik y Hendriks, datos sin publicar). Fotografía tomada 14 semanas después del aislamiento

Se debe elegir una temperatura algo más baja para algunos procesos especiales, como la formación de yemas florales, ruptura de la dormición, germinación de semillas, etc. Se obtiene un buen crecimiento y ruptura de la dormición *in vivo*, con bulbos adventicios de gladiolo, azucena y *Nerine* formados *in vitro*, cuando se les mantiene 4-6 semanas a 5°C. A veces se necesitan condiciones muy especiales para la formación de órganos (Pierik, 1967): 5°C para la formación de raíces adventicias de la bienal *Lunaria*, 27-29°C para una formación óptima de raíces adventicias en *Gerbera* (Fig. 13.6), y 17-25°C para la formación de bulbos adventicios en el jacinto. Temperaturas bajas o muy bajas pueden utilizarse para detener el crecimiento de los cultivos *in vitro*. Más información sobre este aspecto se puede encontrar en el apartado Almacenaje del material vegetal *in vitro*.

A veces son necesarias las temperaturas alterantes. La formación de raíces en *Helianthus tuberosus* es estimulada por una temperatura diurna de 26 °C y una temperatura nocturna de 15 °C. De Capite, en 1955 llegó a la misma conclusión con tejidos de callo de *Helianthus tuberosus*, zanahoria y *Parthenocissus*, encontrando que el mejor crecimiento se producía con una temperatura diurna de 26 °C y nocturna de 20 °C. Cuando se utilizan temperaturas alternan-

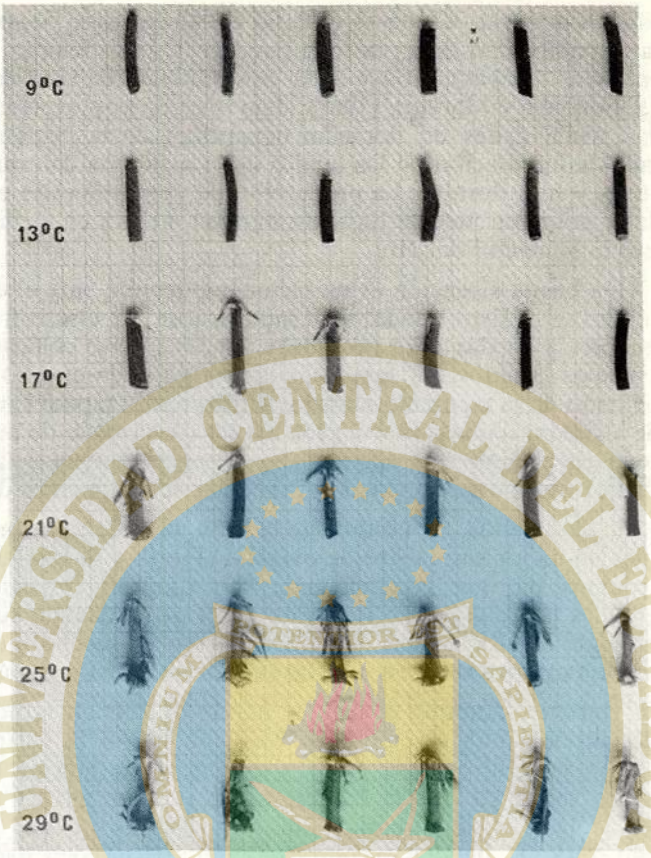


Figura 13.6 Influencia de la temperatura sobre la regeneración de raíces adventicias, en explantos de peciolo, apolares, de *Gerbera jamesonii*. A temperaturas bajas (9 y 13° C) no se produce formación de raíces. Se necesitan temperaturas más altas (17-29° C), para que sea estimulada la formación de las raíces adventicias (Pierik y Segers, 1973). Fotografía tomada 8 semanas después del aislamiento

tes, se debe tener en cuenta que una bajada de la temperatura produce una entrada de aire en la cámara (ya que aquel se contrae al enfriarse), y como consecuencia se aumenta el número de infecciones, especialmente cuando se utilizan tubos o matraces con tapón.

Humedad. Se conoce poco sobre la influencia de la humedad de la cámara de crecimiento, sobre el desarrollo y crecimiento *in vitro*. Teniendo en cuenta que la humedad en los tubos de ensayo es relativamente alta (como se desprende de las condensaciones en las paredes), la humedad de la cámara de crecimiento probablemente sólo influirá en la pérdida de agua desde los tubos. Sin embargo, una elevada humedad en la cámara produce como resultado una mayor cantidad de infecciones. En el capítulo 7 se da más información sobre la pérdida de agua por evaporación y la influencia del tipo de cierre de los recipientes de crecimiento.

Disponibilidad de agua. Como se discutió en el Capítulo 6, sobre medios nutritivos, la disponibilidad de agua (que puede ser, por ejemplo, controlada por la concentración de agar), influye en las posibilidades de vitrificación. Bouniols (1974) y Bouniols y Margara (1968), demostraron con explantos de achicoria, que las posibilidades de floración dependían de la disponibilidad de agua: El estado de hidratación de los tejidos de la achicoria determina la diferenciación de las yemas florales. La producción de yemas florales es buena en medios sólidos y pobre en medios líquidos; aunque mejora en medios líquidos si se disminuye la humedad del aire.

Oxígeno. Una buena aireación es un factor importante para el crecimiento de células, tejidos, etc. Esto queda bien demostrado por el uso frecuente de aparatos agitadores y ruedas para orquídeas, en las que se colocan matraces conteniendo medios líquidos. El suministro de oxígeno en el tubo de ensayo puede ser facilitado de la siguiente manera: Utilizar sólo tapones metálicos, y no tapones de algodón; realizar inoculación apolar (se dispone de mayor cantidad de oxígeno en el aire, que sobre el agar); utilizar medios líquidos (se consigue un mejor transporte de oxígeno); inocular sobre puentes de papel.

La formación de órganos, especialmente la formación de raíces adventicias, es facilitada por un mejor suministro de oxígeno (Pierik y Steegmans, 1975a); es un hecho comprobado que, especialmente los esquejes de especies leñosas, encuentran grandes dificultades en regenerar sus raíces, cuando sus bases se encuentran en agar. La formación de raíces *in vivo* es mucho mejor en un medio líquido o en un sustrato bien aireado (mejor suministro de oxígeno).

Dióxido de carbono. Aunque el CO_2 se puede utilizar en principio como una fuente de carbono para el cultivo *in vitro*, de hecho la sacarosa es un material mucho mejor (Bergmann, 1967). Ciertamente la adición de CO_2 *in vitro* tiene escaso valor, ya que la concentración de este gas en un tubo o matraz bien sellado es casi siempre muy alta. Más detalles sobre el abonado o enriquecimiento con CO_2, pueden encontrarse en el artículo de Chandler *et al.* (1972), y Gathercole *et al.* (1976). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la fotosíntesis *in vitro* es generalmente inferior a la normal, debido a la baja irradiancia (Hanson y Edelman, 1972; Evers, 1984), siendo en consecuencia de poco interés el suministro de CO_2.

Corriente eléctrica. Se han observado pronunciados incrementos en el crecimiento de callo de tabaco, cuando se pasa una corriente débil, del orden de 1 µA entre el tejido y el medio de cultivo (Rathore y Goldsworthy, 1985). Este efecto depende de la dirección de la corriente; cuando el callo actúa como negativo, la tasa de crecimiento se incrementa en alrededor del 70%, mientras que si se invierte la corriente se produce sólo un ligero estímulo.

14
EL TRASPASO DESDE EL MEDIO NUTRITIVO AL SUELO

Una planta que se ha originado *in vitro,* difiere en muchos aspectos de las que se originan *in vivo* (De Fossard, 1977; Grout, 1975; Grout y Aston, 1977, 1978; Grout y Crisp, 1977; Debergh, 1982; Wardle *et al.*, 1983; Sutter, 1985; Fabbri *et al.*, 1986; Connor y Thomas, 1981; Brainerd y Fuchigami, 1985).

1. Las plantas cultivadas en tubos de ensayo tienen generalmente la cutícula (capa de cera) escasamente desarrollada, debido a la alta humedad relativa, 90-100%, que se da *in vitro.* Como consecuencia, cuando se transfiere la planta al suelo, se produce una transpiración cuticular extra, ya que la humedad del aire en las condiciones *in vivo* es más baja. Las hojas de una planta producida *in vitro,* son frecuentemente finas, blandas y fotosintéticamente poco activas, y en consecuencia mal adaptadas a las condiciones que se pueden encontrar *in vivo.* Las plantas procedentes de tubo de ensayo tienen las células en empalizada, que son las que deben utilizar la luz, más pequeñas y en menor cantidad. Los estomas de las plantas *in vitro* pueden no ser suficientemente operativos; y al permanecer abiertos, cuando la planta ha pasado al suelo, pueden ser el origen de un importante estrés hídrico, durante las primeras horas de aclimatación. En las plantas procedentes de cultivo de tejidos, la conducción de agua entre vástagos y raíces puede verse reducida por una pobre conexión vascular. Es importante tener en cuenta que las plantas *in vitro* han sido criadas como heterótrofas, pero se deben comportar como autótrofas *in vivo:* el azúcar debe ser producido por medio de la fotosíntesis.

Se puede ver por lo dicho anteriormente, que a las plantas *in vitro* se les debería dar un cierto tiempo para acostumbrarse a las condiciones *in vivo* y/o permitirles aclimatarse ya *in vitro,* de manera que queden endurecidas para afrontar el nuevo ambiente. La aclimatación puede realizarse permitiendo a las plantas *in vitro* habituarse de forma gradual a una humedad relativa más baja, como la que encontrarán *in vivo.* El desarrollo del mecanismo de cierre estomático es un componente muy importante de la aclimatación. Wardle y colaboradores (1983), han demostrado con *Brassica oleracea "Botrytis",* que una disminución de la humedad relativa *in vitro* produce una formación mejor de la

cutícula, que se traduce en una menor transpiración cuticular. Se puede realizar una aclimatación directamente, después de la fase *in vitro*, manteniendo *in vivo* una humedad relativa alta (Fig. 14.1), y manteniendo también una baja irradiancia y temperatura. Otro método de aclimatación consiste en dejar el tubo o matraz abierto, en un ambiente estéril, durante algunos días, para ajustarse a las condiciones *in vivo*. También es posible pulverizar las plantas con antitranspirantes, para reducir la transpiración *in vivo* (Sutter y Hutzell, 1985), aunque esto siempre produce un efecto negativo.

Figura 14.1 Plántulas jóvenes de *Anthurium andreanum*, transferidas a un suelo tamizado y estéril, después de su crecimiento en tubo de ensayo. Las plantas se cubren durante un cierto tiempo con vasos, para dificultar la evaporación, y facilitar el enraizamiento en el suelo (Pierik *et al.*, 1975a)

2. Las raíces que se han originado *in vitro* son vulnerables y no funcionan de forma adecuada *in vivo* (no tienen, o tienen pocos pelos radicales); por lo que mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces subterráneas. El desarrollo de pelos radicales *in vitro* puede a veces ser estimulado al desarrollar las raíces en medio líquido. Un desarrollo pobre del sistema radical hace que el crecimiento *in vivo* se haga muy difícil, especialmente cuando hay una elevada transpiración. Es de vital importancia que las plantas *in vitro* pierdan la menor cantidad de agua posible, cuando pasan a condiciones *in vivo* (ver lo indicado en el punto 1).

3. Las plantas que en condiciones normales viven simbióticamente con hongos (micorrizas), o con bacterias (*Rhizobium* de las leguminosas), carecen de estos organismos simbióticos cuando son transferidas desde los tubos de ensayo al suelo. Existen cada vez más indicaciones de que la inoculación con hongos o bacterias, de las plantas cultivadas *in vitro*, estimula el crecimiento y el desarrollo. Dhawan y colaboradores (1986) demostraron que la adición de *Rhizobium*,

durante la aclimatación de plantas de *Leucaena,* produjo la nodulación del 80% de las plantas que sobrevivieron el trasplante. Morandi *et al.* (1979) encontraron que las plantas producidas *in vitro* de *Rubus idaeus* crecían mucho mejor, si eran inoculadas con micorrizas *Glomus sp.* Strullu y colaboradores (1984) indicaron que las micorrizas juegan un papel importante en la propagación *in vitro* del abedul: La inoculación con las micorrizas *Paxillus involutus* estimuló el crecimiento en un 75%, en comparación con las plantas no inoculadas. Recientemente Tremblay *et al.* (1986), estudiaron la utilidad de las simbiosis actinorrícica y micorrícica en la propagación de plantas de aliso.

Al considerar los problemas asociados con el sistema radical no funcional se deben tener en cuenta algunos aspectos, que resumimos a continuación:

— Permitir al menos que los primordios radicales se desarrollen *in vitro;* ya que éstos se pueden convertir en auténticas raíces subterráneas *in vivo.*

— Cuando sea posible facilitar las condiciones que permiten el desarrollo de las raíces *in vitro* (por ejemplo en medios líquidos), que luego serán funcionales en el suelo.

— Transferir la fase radical completa al suelo, o al sustrato de que se trate (Debergh, 1982). Bañar los vástagos en una solución de auxina, inmediatamente antes de que vaya a desarrollarse el enraizamiento, para facilitar la formación de raíces. El trabajo de Debergh (1982) ha demostrado que estos métodos no son válidos para todas las especies; los vástagos *in vitro* generalmente son muy tiernos y blandos.

Además de seguir las normas indicadas para el trasplante, desde el tubo de ensayo al suelo u otro sustrato, es necesario tener en cuenta lo siguiente:

1. Para evitar infecciones por hongos y bacterias:

— El agar (con azúcar) debe ser bien eliminado.

— Se debe utilizar suelo esterilizado, el suelo se puede esterilizar con vapor, o también con mucha eficacia, por radiación gamma. Sin embargo, en la práctica, rara vez se utiliza suelo estéril.

2. Inmediatamente después de su transferencia al suelo se deben eliminar todos los patógenos y plagas de las plantas (hongos, bacterias, insectos, babosas, etc.), ya que las plantas *in vitro* son generalmente débiles.

3. Los hongos como *Fusarium* y *Pythium* pueden ser tratados con Previcur-N (Schering), al 0,15-0,25%, inmediatamente después de la transferencia desde el tubo de ensayo (Zimmer *et al.*, 1981).

4. Para evitar hacer daño a las raíces, es interesante plantar sobre suelo finamente tamizado.

5. Para mejorar el establecimiento *in vivo,* de plantas producidas *in vitro,* el enraizamiento debería tener lugar en un medio pobre en sales (Murashige y Skoog, 1962, diluido a la mitad, o Knop, 1884).

6. A veces es necesario dar un tratamiento de frío (4-8 semanas a 5° C), a la planta *in vitro,* o inmediatamente después a su paso *in vivo*, para romper la dormición. La ruptura de la dormición es generalmente necesaria en bulbos formados *in vitro,* y a veces en arbustos y árboles.

7. Las plantas que forman cormos o bulbos, deberían ser transferidas en esta forma desde el tubo de ensayo al suelo; de esta forma las posibilidades de supervivencia son mayores. La aclimatación y el crecimiento de las especies tuberosas y bulbosas, cuando se transfieren al suelo, es mejor si se parte de cormos o bulbos grandes.

8. La aclimatación *in vitro,* especialmente cuando se produce al exponer las plantas a una humedad relativa baja, incrementa la tasa de supervivencia cuando las plantas se transfieren al suelo (Ziv, 1986; Short y Roberts, 1986). Si se transfieren a invernadero plantas *in vitro,* se deberían bajar gradualmente la humedad relativa y la irradiancia (Ziv, 1986). Griffis *et al.* (1983) han descrito procedimientos de aclimatación para alta humedad relativa *in vivo:* Tiendas de humedad (con y sin sistema de niebla), sistemas de niebla automáticos (con o sin cubierta de plástico), cubiertas de plástico, etcétera.

9. Desjardins *et al.* (1986) demostraron con plantas de fresa, que la aclimatación al suelo, de plantas producidas *in vitro,* se promueve también con un enriquecimiento del ambiente en CO_2 y luz suplementaria, condiciones que fueron comprobadas por Lakso *et al.* (1986), experimentando con vid. Grout *et al.* (1986) intentaron desarrollar *in vitro* plantas completamente autotróficas, con un balance en carbono positivo, transfiriendo plántulas defoliadas a un medio libre de azúcar. Esta técnica fue también aplicada a rosas por Langford y Wainwright (1986).

Una revisión de los últimos adelantos, en la industria del cultivo de tejidos de plantas, en lo que se refiere al paso desde el tubo de ensayo al suelo, queda resumida más abajo:

1. La transferencia, de plantas enraizadas *in vitro,* al suelo, no se realiza comercialmente como se indica en la Figura 14.1, sino en unidades más grandes: cuadrados de suelo, cubiertos con plástico que mantengan la humedad del aire elevada (a veces se utilizan pulverizadores). La temperatura y la irradiancia se mantienen bajas (por medio del sombreado) (Fig. 14.2).

2. Los esquejes del tallo, formados *in vitro,* de algunas especies *(Gerbera* y *Rhododendron),* se pueden transferir directamente a un sustrato artificial. Recientemente los Laboratorios Twyford han comenzado a fabricar un tipo de plato de plástico especial, que tiene 400 agujeros rellenos con un sustrato de enraizamiento; éste se expansiona, una vez humedecido, aprisionando el vástago. El enraizamiento en este tipo de platos tiene lugar en una cámara especial de enraizamiento, semi-estéril, en la que se mantiene elevada la humedad del aire, por medio de pulverizadores. Tan pronto como la formación de raíces es suficiente y los vástagos comienzan a crecer, los esquejes se transfieren en el plato al invernadero. Posteriormente, cada esqueje, de forma individual puede ser retirado del plato y cultivado en el suelo.

Las especies leñosas son ahora enraizadas más frecuentemente *in vivo* que *in vitro,* ya que así se evita mano de obra. Este método se utiliza en *Rhododendron, Kalmia, Amelanchier, Betula,* patrones de manzano, *Vaccinium* y *Syringa vulgaris* (Zimmerman, 1985).

3. La compañía Milcap France S. A. (Chemin de Montbault, Nuaillé 49340 Trementine, Francia), produce un sustrato de enraizamiento sintético, que tie-

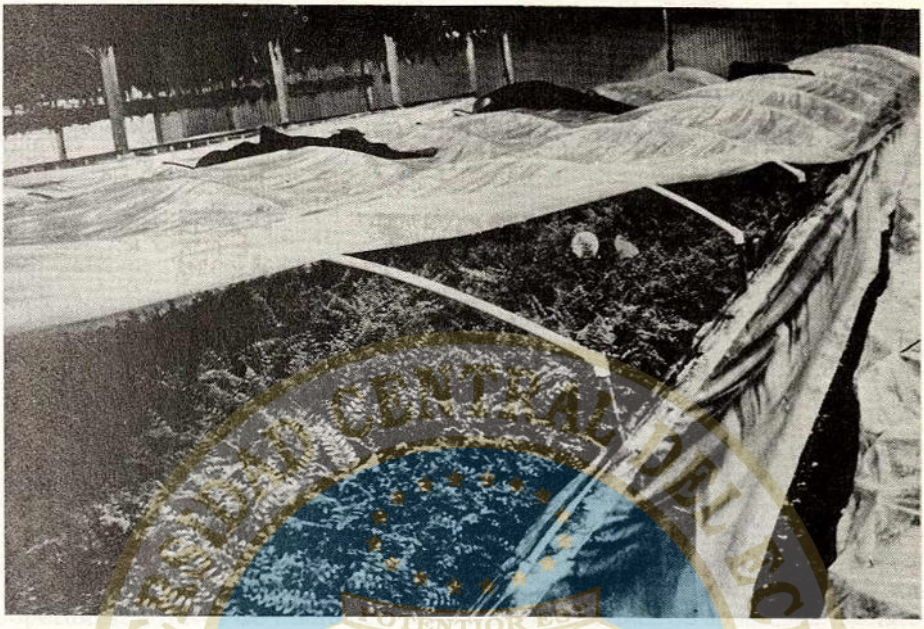


Figura 14.2 Cuando se transfieren al suelo plantas obtenidas *in vitro*, se debe evitar la deshidratación que puede resultar de una evaporación excesiva. Se puede mantener una elevada humedad en el aire, cubriendo las plantas con una lámina de plástico

ne una base de polipropileno (capaz de ser autoclaveada, biológicamente estable, químicamente inerte, bien aireada, con una entramado capilar). Este sustrato se encuentra en forma de copos aptos para el enraizamiento *in vitro*. Para la formación directa de raíces *in vivo*, existen también pequeños bloques, en los que se pueden colocar los esquejes directamente. Este nuevo sustrato de enraizamiento es muy adecuado para el enraizamiento de vástagos *in vitro* (copos), o también *in vivo* (bloques).

4. McCowan (1986), ha descrito recientemente los diferentes métodos posibles de micro-propagación (un campo en rápida expansión en este momento), con sistemas de trasplante tipo agujero (y tapón). También describe los criterios necesarios para un sistema óptimo ideal.

5. En los últimos años los sistemas de producción de niebla se han generalizado mucho para la aclimatación.

Teniendo en cuenta lo que se ha indicado más arriba, se puede esperar que en el futuro cercano se presenten nuevos sustratos en el mercado, que permitan que los esquejes del vástago se comporten de una forma más eficiente, tanto *in vivo* como *in vitro*. La obtención directa de esquejes *in vivo* es especialmente importante. El precio de las plantas *in vitro* descenderá (el enraizado *in vitro* resulta todavía relativamente caro), haciéndose así la multiplicación *in vitro* más popular; se necesitarán cámaras de crecimiento, especialmente equipadas para esquejes *in vivo* tratados sobre sustratos artificiales.

Si las plantas producidas *in vitro* necesitan ser transportadas a grandes distancias, deberán ser empaquetadas en lana de algodón húmeda y envueltas en bolsas de plástico. Las temperaturas deberán regularse cuidadosamente durante el transporte, especialmente cuando se trate de especies tropicales, como la palma de aceite, que no puede tolerar temperaturas de 15° C, siendo aceptables mínimos de 21° C.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

15
AYUDAS AL ESTUDIO

Bibliografía

Se puede obtener una gran ayuda para el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, a través de manuales, resúmenes e informes de congresos y simposios, y artículos de revistas. En la lista de bibliografía se indican los manuales más importantes y actas de congresos sobre el tema del cultivo *in vitro*.

Dado que es imposible dar los nombres de todas las revistas relevantes en cultivo de tejidos, se indica a continuación una lista donde se puede encontrar la información más importante sobre el tema. Esta relación se ha obtenido de la bibliografía sobre cultivo de tejidos de Pierik (1979).

Acta Botanica Sinica.
Acta Horticulturae.
American Journal of Botany.
American Orchid Society Bulletin.
Annals of Botany.
Canadian Journal of Botany
Comptes Rendus Academie Sciences Paris.
Current Science.
HortScience.
In Vitro.
Journal Japanese Society of Horticultural Science.
Physiologia Plantarum.
Phytomorphology.
Plant Cell Tissue Organ Culture.
Planta.
Plant Physiology.
Plant Science Letters.
(Ahora, Plant Science).
Scientia Sinica.
Zeitschrift Pflanzenphysiologie.
(Ahora, Journal Plant Physiology).

Las colecciones de referencias bibliográficas son también importantes para el estudio de los temas publicados; existen sólo 3 que traten el cultivo de tejidos vegetales en las plantas superiores: Brown y Sommer (1975), Pierik (1979), y Bhojwani *et al.* (1986).

Si se considera la enorme cantidad de artículos que aparecen cada día, es prácticamente imposible, incluso en un área restringida, el reunir y revisar toda la información que llega. Esta tarea se ve facilitada en gran manera con la ayuda de un ordenador. Más abajo se da una descripción simplificada de cómo se realiza esta búsqueda de bibliografía, con la ayuda de la computadora.

Si se requiere una puesta al día periódica (generalmente mensual) de la bibliografía, se debe recurrir a una biblioteca o centro de documentación experimentado. El documentalista hace entonces un perfil de los temas de interés. Esto se facilita utilizando palabras clave, que tienen un peso determinado de acuerdo con su importancia. Más abajo se da una lista de palabras clave, que son relevantes en el cultivo *in vitro* de las plantas superiores; cubren la información dada en este libro, y son utilizadas en el centro de documentación/información Pudoc, en Wageningen, para la búsqueda computerizada de bibliografía. Cada palabra clave tiene un valor que depende de su importancia; tienen valores más altos las palabras más importantes. Algunas palabras tienen valores negativos, y, por tanto, se restan si los valores de un grupo de palabras se consideran en conjunto. Un * después de una palabra clave indica que se trata de una raíz, que puede ser completada de distintas formas. Utilizando unas normas específicas, es posible obtener, por ejemplo, expresiones como cultivo *in vitro* de algas, hongos, bacterias, levaduras, o de tejidos animales o humanos.

Palabras clave relevantes:

(Debido a que el lector de la versión en castellano de este libro, sobre el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, posiblemente realizará en ocasiones búsqueda de bibliografía en inglés, hemos mantenido, a la derecha de cada palabra clave, entre paréntesis, la original en ese idioma).

10 Axenic* (Axenic)
10 Agalla del cuello* (Crown gall)
10 Mericlon* (Mericlone)
10 Protocormo* (Protocorm)
8 Excis* (Excis)
8 Tubo de ensayo* (Test tube)
7 Androgen* (Androgen)
7 Suspen* (Suspen)
6 Embrio* (Embryo)
6 Medio (Medium)
5 Apice del brote (Sprout tip)
4 Morfogen* (Morphogen)
4 Segment* (Segment)
3 Aisla* (Isolat)
2 Antera* (Anther)
2 Yemas (Buds)
2 Cultiv* (Cultivat)
10 Callo* (Callus)
10 Explanto* (Explant)
10 Plántula* (Plantlet)
8 Tubo de agar* (Agar tube)
8 Inoculac* (Inoculat)
8 Vitro* (Vitro)
7 Cultivo* (Culture)
7 Protoplas* (Protoplas)
6 Medios (Media)
5 Muta* (Muta)
4 Adventic* (Adventit)
4 Regenera* (Regenerat)
3 Célula* (Cell)
3 Tejido (Tissue)
2 Yema (Bud)
2 Continu* (Continu)
2 Diferenc* (Differenti)

2 Meristem* (Meristem)
2 Polen (Pollen)
2 Raíz* (Root)
2 Tallo* (Stem)
2 Virus* (Virus)
–5 Celulo* (Cellulo)
–5 Viticult* (Viticult)
2 Multiplic* (Multiplicat)
2 Propagac* (Propagat)
2 Vástago (Shoot)
2 Apice (Tip)
–3 Inocula con virus* (Virus inoculat)
–5 Horticult* (Horticult)

¿Cómo puede decidir un ordenador si una publicación en concreto es o no relevante para el suscriptor? Se considera el título de la publicación, así como las palabras clave y el resumen si existe, también se suman los valores positivos de las palabras clave que se encuentren, al mismo tiempo que se restan los negativos. El valor resultante debe encontrarse por encima de uno predeterminado (decidido por el centro de documentación y el suscriptor), antes de que el título del artículo, y en algunos casos un resumen, se imprima, o se grabe en una cinta, disco blando, etc. En el perfil de palabras clave de cultivo *in vitro* de plantas superiores, el valor al que se debe llegar es 10. Un centro de documentación o biblioteca mecanizada, con medios para la búsqueda de bibliografía, obtiene los títulos relevantes (generalmente a partir de revistas de referencias), y se analizan por medio de un ordenador, para obtener las referencias para cada cliente. El coste de una búsqueda bibliográfica por ordenador depende del número de bases de datos que se consultan, y del número de referencias que se recuperan. Los costes pueden descender, si varias personas o grupos participan en una misma búsqueda. A continuación se indica una lista de las bases de datos más importantes para el cultivo *in vitro* de las plantas superiores:

1. AGRIS. AGRINDEX en la forma impresa. Se trata de bibliografía recopilada por la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), dirigida a investigadores en el campo agrario.

2. CAB. Producido por el Commonwealth Agricultural Bureau International, en Inglaterra. Recoge información de alrededor de 30 revistas de referencias sobre temas de agricultura.

3. AGRICOLA. Se trata de bibliografía sobre agricultura recogida por la National Agricultural Library, en Beltsville, Madison, EEUU.

4. BIOSIS. Conocido como Biological Abstracts. Se trata de una recopilación muy amplia, que cubre todos los aspectos de la biología. Es producido por Bio Sciences Information Service, en Filadelfia, EEUU.

Obviamente se debe producir un cierto grado de solapamiento entre las fuentes 1-3, pero si se necesita información sobre los aspectos agrícolas del cultivo *in vitro* de las plantas superiores, se deben consultar las tres. La duplicidad se produce inevitablemente al tratarse de entidades competidoras. Las referencias recogidas en 4 se caracterizan por tener una orientación más biológica y menos agrícola.

Hay que tener en cuenta que, a pesar de que se ponga el máximo cuidado, alrededor del 40-50% de la bibliografía recuperada por el ordenador, resulta irrelevante, debido a la necesidad de realizar una búsqueda amplia, para no perder ninguna referencia.

Las personas interesadas en obtener estas referencias bibliográficas, a través de computadora y que no dispongan de estos servicios en su propio país, pueden obtener información gratis escribiendo a: PUDOC, P.O. Box 4, 6700 AA Wageningen, Holanda (Telex 45015 blhwg nl).

En el año 1982 Tateno *et al.*, en Japón, desarrollaron una nueva base de datos, para el cultivo de tejidos y células vegetales; contenía alrededor de 2.000 artículos en 1982. En los últimos años otras compañías anuncian búsquedas bibliográficas por medio de ordenador.

Sociedades y Asociaciones

Antes de la formación de la Asociación Internacional para el Cultivo de Tejidos Vegetales (IAPTC), ya existían en diferentes países sociedades relacionadas con el cultivo de tejidos. Estas organizaban reuniones locales para los investigadores e industriales interesados en el tema. En Holanda, en el año 1963, se inició un club de cultivo de tejidos, para aglutinar a las personas interesadas en el cultivo de tejidos y células vegetales.

La IAPTC tiene una importante misión internacional. Cuando su primera hoja informativa apareció en el año 1971, tenía ya 648 miembros, y en el año 1986 este número se había elevado a 2.894 asociados, pertenecientes a 72 países diferentes. En cada país implicado, los llamados corresponsales nacionales actúan como enlaces entre los miembros locales y la IAPTC, y también son responsables de la distribución de las hojas informativas, 4 veces al año. El órgano de gobierno de la IAPTC, que edita la hoja informativa, elige un país, en el Congreso Internacional sobre Cultivo de Tejidos y Células Vegetales, para que realice la hoja informativa durante un período de 4 años. En el 6º Congreso, el gobierno de la sociedad fue traspasado desde los EEUU a Holanda. Este país está coordinando el trabajo de la IAPTC durante el período 1986-1990, y organizará también el 7º Congreso Internacional en 1990.

La mayor parte de las personas que trabajen en cultivo de tejidos en los diferentes países, conocerán a su corresponsal nacional en la IAPTC, sabrán cómo se puede uno hacer miembro de la sociedad y probablemente recibirán de forma periódica las hojas informativas. No obstante, en el caso de que alguien no tuviese esta información, la dirección de la División Internacional es: Dr. A. J. Kool, Secretary IAPTC, Plant Biotechnology Division, Zaadunie Research, P.O. Box 26, 1600 AA Enkhuizen, Holanda.

Para estar al día en los adelantos, en el campo del cultivo *in vitro* de las plantas superiores, es muy importante leer las hojas informativas periódicas de la IAPTC. Contienen artículos de revisión, informes sobre seminarios, simposios, conferencias y congresos, informes cortos sobre el contenido de reuniones, trabajos de investigación, información y direcciones de cursos, y una lista puesta al día de los miembros y sus direcciones; también contienen información sobre libros y revistas recientemente publicados, artículos recientes, etcétera.

Cuaderno de laboratorio, fotografías y diapositivas

Resulta aconsejable tener un cuaderno de laboratorio puesto al día (un

cuaderno de anillas resulta muy adecuado). En este cuaderno se anotan todos los detalles experimentales: número del experimento, fecha en que se hicieron los medios, detalles sobre los mismos, procedimiento de esterilización, condiciones de crecimiento, número de infecciones, observaciones y resultados finales. De esta forma todos los detalles importantes se guardan de forma segura, por si son necesitados más tarde.

También resulta una buena idea tomar fotografías y/o diapositivas, de forma regular, de los cultivos, sobre todo al final de cualquier observación: de esta forma, cualquier resultado visual, objetivo, del experimento, queda siempre a nuestra disposición. Las fotografías pueden ser utilizadas más tarde para publicaciones, y las diapositivas se pueden utilizar para conferencias o seminarios.

La fotografía de los cultivos *in vitro* es frecuentemente más difícil de lo que parece a primera vista. Existen dos problemas principales: el reflejo de los recipientes de vidrio, y también a veces el pequeño tamaño de los cultivos. El reflejo del vidrio puede ser eliminado sacando la muestra del tubo de ensayo, antes de tomar la fotografía o diapositiva. Sin embargo, si esto no es posible o deseable, se recomiendan las siguientes medidas:

1. Colocar el tubo o matraz en diagonal, dirigido hacia atrás, y no derecho y vertical. Se puede también disminuir el reflejo, o incluso eliminarlo cambiando la iluminación.
2. Utilizar un filtro polaroid.
3. Colocar un flash en forma de anillo sobre el tubo o matraz.
4. Poner una fuente de luz fría en forma de anillo (como la que se utiliza en un estereomicroscopio), sobre el tubo o matraz.

Utilizando las medidas indicadas en los puntos 3 y 4, es posible realizar fotografías libres de sombras (Staritsky, comunicación personal), ya que la luz ilumina el objeto desde todas las direcciones. Cuando se fotografían objetos muy pequeños, se deben utilizar lentes de aproximación, o una cámara montada sobre el microscopio. Para tener una idea del tamaño del objeto, éste se debe fotografiar junto a una escala. Cuando se fotografía un objeto fuera del tubo de ensayo es aconsejable colocarlo sobre papel milimetrado (que se puede encontrar en el comercio en diferentes colores).

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
Facultad de Ciencias Agrícolas
BIBLIOTECA
Apt. 25-20
Quito - Ecuador

16
CULTIVO DE EMBRIONES

Introducción

El cultivo de embriones consiste en el aislamiento y crecimiento, *in vitro,* en condiciones estériles, de un embrión inmaduro, con el fin de obtener una planta viable (Fig. 16.1). La información contenida en este capítulo se ha tomado en parte de los siguientes artículos de revisión: Tukey (1935), Randolph y Cox (1943), Kruyt (1951), Rijven (1952), Rappaport (1954), Zagaja (1962), Sanders y Ziebur (1963), Narayanaswami y Norstog (1964), Maheswari y Rangaswamy (1965), Dégivry (1966), Bajaj y Bopp (1971), Theiler (1971), Beasly *et al.* (1974), Norstog (1975), Jensen (1976), Raghavan (1966, 1976a, 1977, 1980, 1986), Monnier (1980), Johri *et al.* (1982), Hu y Wang (1986).

En 1904 Hännig fue el primer investigador que obtuvo plantas viables, a partir de embriones de Crucífera, aislados *in vitro.* En 1924 Dietrich cultivó embriones de diferentes especies vegetales, tratando de determinar si eran capaces de germinar sin completar su período de dormición; se refirió a "künstliche Frühgeburt" (nacimiento prematuro artificial), para designar la conversión de estos embriones en plantas completas, después del aislamiento. Laibach (1925, 1929), aisló embriones de *Linum,* que abortaban *in vivo.* Tukey (1933a, b) logró obtener plantas normales a partir de millares de embriones abortivos, de cultivares precoces, de diferentes frutales de hueso. Van Overbeek *et al.* (1941) descubrieron que la leche de coco estimulaba el crecimiento de embriones de *Datura;* como resultado de este hallazgo, la investigación sobre el cultivo de embriones fue grandemente estimulada. En 1945, Randolph aisló embriones de *Iris* para acortar el ciclo de mejora. En 1945 Cox *et al.* cultivaron embriones de diferentes cultivares de col para acelerar la germinación de las semillas. A partir de 1945 el cultivo de embriones ha sido cada vez más utilizado, sobre todo por los mejoradores vegetales, en programas de mejora interespecíficos.

En principio existen dos tipos de cultivo de embriones:

1. Cultivo de embriones inmaduros, que se originan en semillas no acaba-

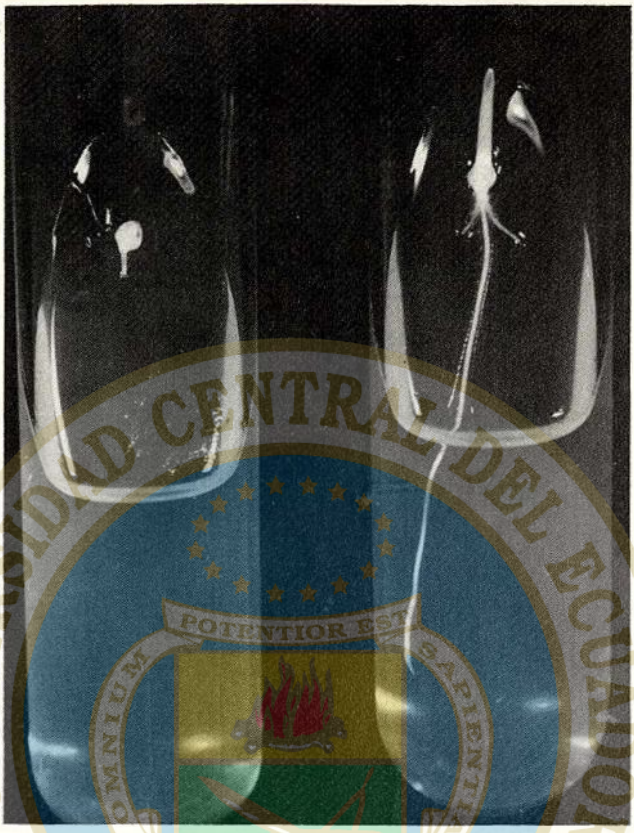


Figura 16.1 Cultivo de embriones de cebada. Los embriones han sido aislados sobre un medio sólido, de superficie inclinada. Izquierda: 2 días después del aislamiento, se acaba de iniciar el crecimiento (primera raíz). Derecha: 6 días después del aislamiento, se aprecia una plántula desarrollada

das de madurar. Este tipo de cultivo se utiliza sobre todo para impedir el aborto embrionario (muerte prematura del embrión), y con el fin de obtener una planta viable. Este tipo de cultivo es (extremadamente) difícil; en parte porque se necesita una ardua disección, y también porque se necesita un medio nutritivo complejo. Las posibilidades de éxito de este tipo de cultivo, dependen mucho del estado de desarrollo del embrión en el momento de ser aislado.

2. Cultivo de embriones maduros, que se encuentran a su vez en semillas maduras. Este tipo de cultivo es relativamente fácil, y se utiliza, por ejemplo, para eliminar la inhibición (absoluta) de germinación de las semillas. Suele ser suficiente en estos casos el uso de un medio nutritivo simple, con agar, azúcar y minerales.

Si se compara el desarrollo de embriones inmaduros *in vitro* e *in vivo*, si partimos del estado globular, los embriones *in vitro*, generalmente tienen:

1. Un crecimiento más globoso y tienen forma de pera.
2. Una expresión morfogenética retardada: Estado globular más largo.

3. Inicialmente un solo cotiledón (en dicotiledóneas), mientras que *in vivo* se desarrollan los dos de forma simultánea.

4. Posibilidad de exhibir un desarrollo policotiledonar (más de dos cotiledones), lo cual rara vez ocurre *in vivo*.

Los embriones aislados *in vitro* generalmente muestran una germinación precoz (Jensen, 1976), ya que se produce una pérdida de inhibidores al retirar la cubierta seminal; otra razón podría ser el que el potencial osmótico negativo que existe *in vivo*, tenga un valor mucho más alto *in vitro*.

Técnicas

En el cultivo de embriones no se encuentran generalmente problemas de desinfección. Las semillas maduras se encuentran desinfectadas en su exterior, a partir de ellas se obtienen los embriones abriendo la cubierta seminal. Si las semillas están todavía inmaduras, el fruto aún cerrado permanece estéril, y al abrirlo se obtienen los óvulos sin infectar.

La disección de los embriones presenta mayor número de problemas. Es posible diseccionar embriones grandes sin la ayuda del microscopio, pero hay que recurrir a éste, y a una fuente de luz fría, en el caso de embriones pequeños. Para la disección se utilizan agujas de siembra, y mangos sobre los que se montan porciones de cuchillas de afeitar. Se debe tener cuidado cuando se retira la cubierta de una semilla madura, ya que resulta fácil dañar los embriones. En el caso de semillas con embriones inmaduros, generalmente es más fácil ver dónde quedan éstos localizados y, por lo tanto, es menor el riesgo de dañarlos, aunque se debe poner atención en no producir daño al suspensor. A continuación se dan algunos ejemplos de diferentes procedimientos de aislamiento:

1. El aislamiento de embriones de cereza se realiza como a continuación se indica (Theiler, 1971). Primero se retiran los huesos de los frutos. Se seleccionan las mejores semillas, descartando las que floten en un baño de agua. Se esterilizan las semillas seleccionadas. A continuación se rompe el endocarpio leñoso, quedando a la vista el embrión. Se retiran los embriones con la ayuda de unas pinzas con punta, y se siembran sobre un medio sólido.

2. En el caso de la cebada se retira el fruto de la espiga, se desinfecta, se aclara con agua estéril y se coloca sobre una caja de Petri estéril, con la raquilla hacia abajo y la lemma hacia arriba. Después de retirar la lemma, pared del fruto y cubierta seminal (Fig. 16.2), el embrión queda libre. Se separa con un escalpelo y se siembra sobre el medio (Lange, 1969). Se dan más detalles en Yeung *et al.* (1981).

3. En el caso de la azucena, 40-60 días después de la fertilización se esteriliza el fruto cerrado (con alcohol de 96% y posteriormente flameando), se sacan entonces las semillas y se colocan en agua estéril para impedir su deshidratación (Smaal, 1980). Se retira la cubierta seminal raspando con un escalpelo, haciéndose así visible el endospermo. El embrión puede entonces aislarse a través de unos cortes longitudinales, o es obligado a salir del endospermo a

través de un agujero lateral. El embrión se siembra tan pronto como queda en libertad.

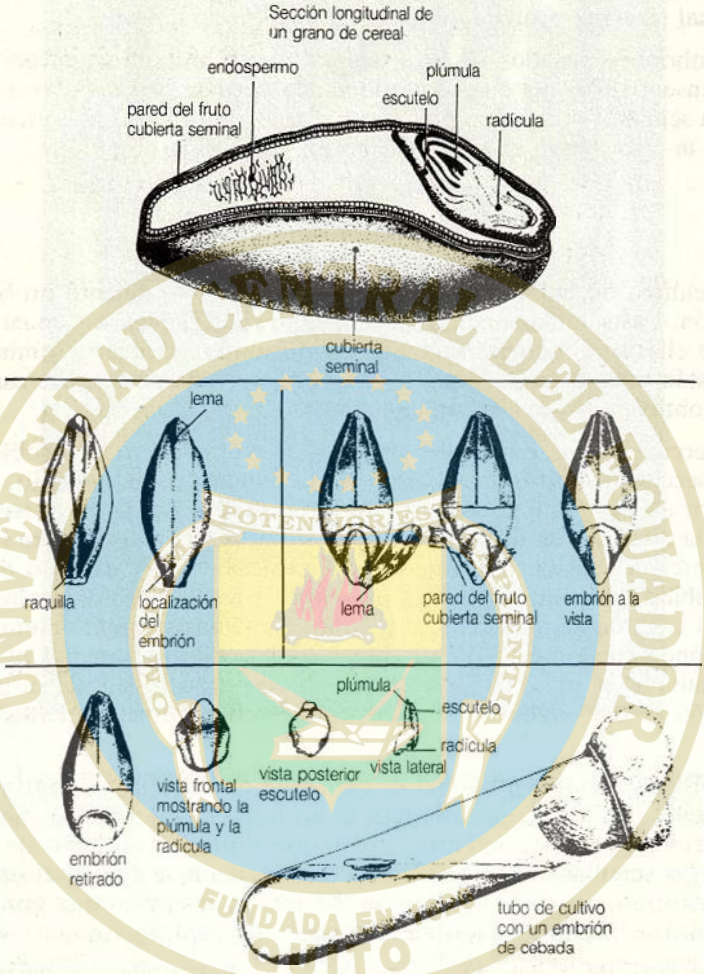


Figura 16.2 Cultivo de embriones de cebada. Consultar el texto para una descripción más detallada. Dibujo del Instituto de Mejora Vegetal, Wageningen.

Sin embargo, no se puede decir que el cultivo de embriones sea un proceso fácil. En 1969 Lange aisló 1888 embriones de cebada, obteniendo solamente 201 plantas viables. Las razones de este bajo porcentaje de viabilidad pueden ser:

1. Pérdidas debidas a infección (15%).

2. Embriones demasiado pequeños en el momento del aislamiento (elevando la concentración de azúcar se estimula el crecimiento de los embriones pequeños).

3. Interrupción del desarrollo embrionario.

4. Daños en los embriones (especialmente en el caso de semillas duras).

5. Las condiciones artificiales (medios nutritivos).

Debido a que los embriones son a veces difíciles de diseccionar se pueden realizar cultivos de ovario o de óvulos (Redei y Redei, 1955; Harberd, 1969; Braak, 1967 y 1968). Braak indicó la posibilidad de utilizar cultivos de ovarios y de óvulos porque:

1. La disección de los embriones es generalmente difícil (resulta muy fácil dañar el embrión durante el aislamiento), consume mucho tiempo y para ella es preciso utilizar personal experimentado.

2. El tipo de medio que se necesita para el cultivo de embriones, es mucho más complicado que el que se necesita para el cultivo de ovarios y óvulos.

Braak (1967) llevó a cabo con éxito cultivo de óvulos con tomate, *Rhododendron*, tulipán, lechuga, azucena, cebolla, *Hibiscus*, clavel y *Gerbera*. Bajaj y Bopp (1971) han descrito resultados con *Hevea, Papaver* y *Nicotiana*. Más detalles sobre cultivo de ovario, óvulo y óvulo unido a placenta, han sido revisados por Collins *et al.* (1984).

Recientemente se ha introducido el término más general, de cultivo de embriones en óvulos, en lugar de cultivos de óvulo, ovario y óvulo fertilizado. El cultivo en óvulo, probablemente no tendrá éxito en los casos en los que el tejido materno o el endospermo ejerza una acción inhibidora en el desarrollo del embrión (Collins *et al.*, 1984).

Factores que afectan al éxito del cultivo de embriones

A continuación se indican los factores de los que depende el desarrollo de una planta viable, a partir de un embrión:

1. *Genotipo*. En algunas especies vegetales los embriones son difíciles de cultivar, mientras que en otras resulta fácil. Se pueden encontrar incluso diferencias, entre los cultivares de una misma especie.

2. *Estado de desarrollo del embrión en el momento del aislamiento*. Generalmente los embriones muy pequeños, indiferenciados, es virtualmente imposible desarrollarlos in vitro (Jensen, 1976; Monnier, 1980). Cuanto más desarrollado esté un embrión *in vivo*, más fácil resulta su cultivo *in vitro*. A veces es posible, con la ayuda de técnicas especiales, cultivar embriones muy pequeños; por ejemplo incubando, en estrecho contacto con el embrión un fragmento de endospermo de una semilla madura (Ziebur y Brink, 1951; Williams, 1978), o una porción de tejido hipocotilar (Mott, 1981). También se puede realizar un trasplante del embrión inmaduro, al endospermo de una semilla normal, de la misma especie (Williams y De Lautour, 1980).

3. *Las condiciones de crecimiento de la planta madre.* Generalmente las plantas madre son cultivadas en invernadero, aunque a veces se utiliza material que se ha cultivado en el campo, por ejemplo cebada (Yeung *et al.*, 1981), estas plantas se cortan y se transfieren a soluciones aireadas, en un fitotrón. La mejora del desarrollo de la planta madre, en condiciones controladas, general-

mente produce un mejor desarrollo del endospermo, y, por consiguiente, mejor crecimiento de los embriones aislados. El crecimiento del embrión puede también ser estimulado, si se desarrollan más los cotiledones (Kruyt, 1952; Kester, 1953), lo cual depende también del crecimiento de la planta madre. En *Fraxinus* la dormición de la semilla procede con gran probabilidad de los cotiledones, por lo que en esta especie es necesario retirar los cotiledones antes de comenzar el cultivo de embriones (Bulard y Monin, 1963).

A veces se pueden tratar las plantas (inflorescencias), con giberelinas, antes de aislar los embriones; este tratamiento incrementa su tamaño, haciéndolos más fáciles de manejar.

4. *Composición del medio nutritivo.* Los embriones inmaduros tienen unas necesidades mucho más críticas, en cuanto a la composición del medio nutritivo, que los embriones maduros. Sin embargo, tanto los embriones maduros como los inmaduros necesitan macro-, microelementos, y azúcar. Generalmente se usan medios sólidos con pH 5,0-6,0. Para el cultivo de embriones se utilizan muchos medios minerales diferentes, que pueden encontrarse en la bibliografía (Pierik, 1979). Monnier (1976), desarrolló un medio mineral para *Capsella bursa-pastoris*, que ha servido también para otras especies. Las macrosales de Knop (1884), en melocotón, estimularon el desarrollo normal de las plantas desde el estado de embrión, al de roseta, en cambio el medio de Murashige y Skoog (1962) produjo plantas anormales (Toledo *et al.*, 1980). Los factores más importantes son los iones de amonio y potasio (Jensen, 1976; Monnier, 1980).

La sacarosa se utiliza generalmente como fuente de azúcar, aunque a veces se pueden utilizar también la glucosa y la fructosa. El azúcar es sobre todo una fuente de energía, aunque también tiene el papel de rebajar el potencial osmótico (negativo), de los medios nutritivos, sobre todo en el caso de embriones jóvenes (Rijven, 1952). Los embriones maduros se cultivan generalmente sobre un medio con sacarosa al 2-3%; mientras que los embriones inmaduros tienen un mejor comportamiento con concentraciones más elevadas (8-12%); la demanda de azúcar disminuye con el tamaño del embrión (Monnier, 1980). Generalmente el agar se utiliza a una concentración de 0,6-0,8%, produciéndose inhibiciones en el crecimiento si se utilizan concentraciones más altas (Stolz, 1971). A veces se puede realizar el cultivo con éxito, utilizando un medio líquido (Hall, 1948; Rabechault *et al.*, 1972).

Generalmente no se utilizan auxinas y citokininas en el cultivo de embriones, ya que pueden inducir la formación de callo (Monnier, 1976). Las giberelinas a veces tienen un efecto positivo, sobre todo cuando existe dormición (Raghavan, 1980); en ocasiones, también se necesitan vitaminas en el cultivo de embriones (Raghavan, 1980).

Aunque actualmente se utilizan medios sintéticos, en referencias antiguas se describen componentes como leche de coco, hidrolizado de caseína y extracto de malta. Estas mezclas complejas resultan aún adecuadas para el cultivo de embriones inmaduros. Se piensa que algunos aminoácidos de estas mezclas son importantes como fuente de nitrógeno (Raghavan, 1980); sobre todo la glutamina es especialmente necesaria para el crecimiento de embriones inmaduros.

Debido a que las necesidades en nutrientes cambian durante el crecimiento y desarrollo de los embriones, a veces es necesario el repicado. Monnier (1976) describió un ingenioso sistema, en el que dos medios diferentes (uno para embriones inmaduros y otro para maduros), se encuentran uno al lado del otro, en una misma caja de Petri. El embrión inmaduro se incuba sobre el primer medio, el cual cambia gradualmente su composición, debido a la difusión de sustancias desde el segundo medio; de esta forma se puede prescindir del repicado.

5. *Oxígeno.* Se trata de un factor importante, siendo en algunas ocasiones, las necesidades de oxígeno de los cultivos de embriones, superiores a las concentraciones que normalmente se encuentran en el aire (Monnier, 1980).

6. *Luz.* A veces los embriones aislados necesitan ser cultivados en la oscuridad, durante 7-14 días, pudiendo luego ser transferidos a la luz, para permitir la formación de clorofila (Smaal, 1980).

7. *Temperatura.* La temperatura depende de la especie vegetal que se usa. Normalmente se utiliza una temperatura relativamente alta (22-28 °C) para el crecimiento; aunque algunas especies como la azucena (Smaal, 1980), necesitan una temperatura más baja (17°C). Un tratamiento de frío (4 °C) puede ser necesario para romper la dormición. En el caso de la azucena, se ha encontrado que las plantas obtenidas necesitan pasar entre 4 y 6 semanas a una temperatura de 5-9°C, para obtener un buen crecimiento. Las plantas de melocotón crecen en forma de roseta a no ser que reciban un tratamiento de frío (Toledo *et al.*, 1980).

Aplicaciones prácticas

Las aplicaciones prácticas más importantes del cultivo de embriones se indican a continuación:

1. *Eliminar la inhibición (absoluta) de germinación de las semillas.* En algunas especies es absolutamente imposible lograr la germinación *in vivo*, siendo imprescindible en estos casos el cultivo de embriones, por ejemplo en: *Colocasia esculenta* (Raghavan, 1977) *Musa balbisiana* (Cox *et al.*, 1960) y *Pinus armandii* × *P. koraiensis* (Bulard y Dégivry, 1965).

2. *Germinación de semillas de parásitos obligados,* que resulta imposible *in vivo* sin la presencia del huésped, pero que puede conseguirse con el cultivo de embriones (Raghavan, 1977, 1980).

3. *Acortar el ciclo de mejora* (Fig. 16.3). Existen muchas especies que presentan dormición seminal, la cual frecuentemente se localiza en la cubierta de la semilla y/o en el endospermo. Aislando los embriones se puede producir una germinación inmediata (Randolph y Cox, 1943; Rabechauld *et al.*, 1969). A veces la germinación se ve retrasada, si no impedida del todo, por la impermeabilidad de la cubierta al agua y al oxígeno. En estos casos el cultivo de embriones puede acelerar la germinación. Algunos ejemplos: Coles de Bruselas (Wilmar y Hellendoorn, 1968), rosa (Lammerts, 1942, 1946; Elemion, 1948), manzana (Nickell, 1951), palma de aceite (Rabechauld *et al.*, 1968, 1969, 1972, 1973), y lirio (Randolph y Cox, 1943). Hay que tener en cuenta que el cultivo

de embriones inmaduros puede producir un acortamiento mayor aún del ciclo de mejora (por ejemplo en orquídeas, ver capítulo 17).

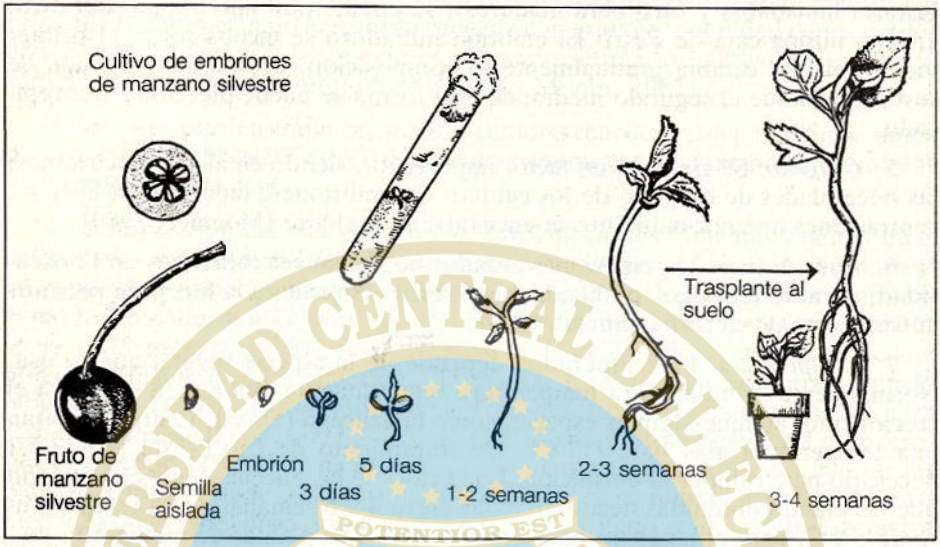


Figura 16.3 Ilustración esquemática del cultivo de un embrión de manzano. Se esteriliza el fruto, posteriormente se extraen las semillas, y finalmente se aisla el embrión sobre un medio nutritivo. Después de varias semanas se obtiene una plántula viable, que puede ser transferida al suelo. El cultivo de embriones acelera la germinación, ya que en condiciones normales ésta es retardada por la presencia de la cubierta seminal. Dibujo de Nickell (1951)

4. *Producción de haploides.* En el cruce *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum*, se produce la fertilización, pero después los cromosomas de *H. bulbosum* son eliminados, produciéndose como resultado un embrión haploide de *H. vulgare*, el cual sólo es viable por cultivo de embriones. Si se duplican los cromosomas, al final se produce un homocigoto de *H. vulgare* (Kasha y Kao, 1970; Jensen, 1976). Siguiendo la técnica de *bulbosum*, se obtuvieron haploides también de *Agropyron tsukushiense* por cruce con *Hordeum vulgare* (Shigenobu y Sakamoto, 1981). Kott y Kasha (1985) han publicado recientemente una revisión sobre la utilización del cultivo de embriones, en la producción de haploides en cereales.

5. *Prevención del aborto embrionario en frutales de hueso precoces.* El transporte de agua y nutrientes, al embrión todavía inmaduro, en cruces con frutales de hueso precoces (melocotón, cerezo, albaricoque, ciruelo), queda cortado a veces demasiado temprano, produciéndose el aborto del embrión. En la práctica esto quiere decir que no son posibles los cruces con una madre precoz. La única solución es utilizar el cultivo de embriones, para evitar el aborto *in vivo* (Tukey, 1933a, b). En el caso del melocotón, cuanto más se prolongue el cultivo del embrión *in vivo*, más posibilidades de éxito se tendrán *in vitro* (Toledo *et al.*, 1980).

6. *Prevención del aborto embrionario como resultado de incompatibilidad.* En el caso de cruces interespecíficos, intergenéricos, y en el caso de cruces por

ejemplo entre diploides y tetraploides, el endospermo puede no desarrollarse o hacerlo muy pobremente. El resultado es el aborto embrionario *in vivo*, que puede ser evitado exclusivamente por el cultivo de embriones. El cultivo de embriones se utiliza frecuentemente en cruces interespecíficos: *Phaseolus* (Bajaj y Gosal, 1981), azucena (Skirm, 1942; Smaal, 1980), lino, algodón, tomate, arroz y cebada (Jensen, 1976). Ejemplos bien conocidos de cultivo de embriones con cruces intergenéricos son: *Hordeum* × *Secale y Triticum* × *Secale* (Raghavan, 1977). El cultivo de embriones se emplea también en los cruces entre diploides y tetraploides (que producen triploides con un endospermo muy poco desarrollado): en cebada y centeno.

7. *Propagación vegetativa.* Los embriones se utilizan como un material inicial, para la propagación vegetativa, por ejemplo en las Gramíneas y Coníferas. Los embriones responden muy bien, debido a que se trata de un material juvenil; en las Gramíneas la organogénesis se produce con relativa facilidad a partir de tejido calloso juvenil. En las Coníferas el clonado partiendo de callos inmaduros producidos a partir de embriones, así como la formación de vástagos axilares, resulta también fácil (Hu y Wang, 1986).

En la bibliografía indicada por Pierik (1979), Narayanaswamy y Norstog (1964), Norstog (1975), Johri *et al.* (1982), Bhojwani *et al.* (1986), y en los artículos de revisión que se indican al principio del apartado *Introducción*, se dan listas extensivas de las aplicaciones del cultivo de embriones.

UNIVERSIDAD TECNICA DEL ECUADOR
OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

17
GERMINACION DE SEMILLAS DE ORQUIDEA

Introducción

Bernard (1909) descubrió de forma accidental que los hongos juegan un papel importante en la germinación de las semillas de orquídea. De hecho las orquídeas viven en una relación simbiótica con algunos hongos desde el momento de la germinación. Se llama simbiosis a la asociación de dos organismos con ventajas mutuas. Las asociaciones simbióticas entre hongos y raíces reciben el nombre de micorrizas; lo que literalmente significa hongo-raíz. Quedó establecido ya, alrededor de 1900, que las hifas (filamentos fúngicos) penetran en los protocormos y las raíces de las plantas, y son "digeridas", suministrando a las orquídeas nutrientes y otros materiales. Se sabe que hay dos tipos diferentes de células huésped en las orquídeas; células huésped subepidérmicas, en las que el hongo permanece "intacto" y sano, y células huésped más profundas, en las que el hongo es "digerido", para convertirse en una masa amorfa (Hadley, 1975; Harley, 1969). Los hongos más importantes que tienen relaciones simbióticas con las orquídeas, pertenecen al género *Rhizoctonia*. Desde que se hicieron los primeros estudios sobre el tema (1900-1910), se pensó que las orquídeas sólo podían germinar *in vitro*, en la presencia de un hongo, y sólo se realizaba germinación simbiótica de orquídeas. Se suponía que las orquídeas recién germinadas y juveniles eran heterótrofas, y dependían de los hongos para el suministro de nutrientes; la principal razón para pensar esto era la pequeña cantidad de reserva alimenticia que se encuentra en las semillas de orquídea.

Hadley (1982) llegó a la conclusión de que generalmente no queda claro qué es lo que la orquídea recibe del hongo. Se suponía que eran hidratos de carbono, pero esto está lejos de la realidad en algunos casos. Se ha comprobado que las orquídeas reciben a veces aminoácidos (glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico) y ácido nicotínico provenientes del hongo (Hyner y Arditti, 1973). Parece que en el caso de las orquídeas tropicales el papel del hongo no es muy importante; mientras que sí lo es en las orquídeas terrestres.

Knudson (1922), demostró que era posible la germinación, sobre un medio simple que contuviera minerales y azúcares, sin necesitar la presencia del hon-

go. Este es de poca importancia para la planta después de la fase juvenil, ya que la planta es entonces una autótrofa fotosintética (Whitner, 1974).

La investigación desarrollada por Knudson alrededor de 1922 supuso una conmoción en el mundo de las orquídeas, ya que demostró que las semillas de *Cattleya, Laelia, Epidendrum,* y de otras muchas orquídeas, eran capaces de germinar asimbióticamente *in vitro*. A pesar del descubrimiento de Knudson, pronto se pudo comprobar que no siempre era posible hacer un medio en el que una determinada especie de orquídea pudiese germinar y desarrollarse. Se han descrito muchos medios nutritivos en la bibliografía, para muchos géneros y especies diferentes (Arditti, 1967, 1982; Arditti y Ernst, 1982; Fast, 1980).

Para las personas ajenas al mundo de las orquídeas y no conocedoras de que éstas se siembran *in vitro*, a continuación damos las razones de esta práctica:

1. Las semillas de orquídea son muy pequeñas y contienen muy pocas, o ninguna reserva alimenticia. Su pequeño tamaño hace muy posible que las semillas se pierdan si se siembran *in vivo*, también sus limitadas reservas alimenticias hacen improbable su supervivencia *in vivo*. La germinación tiene muchas más posibilidades de éxito *in vitro*.

2. Debido a que la germinación, y lo que es más importante, el subsiguiente desarrollo de la plántula, dependen en la naturaleza, de la relación simbiótica con un hongo, también *in vitro* se debería encontrar este hongo; a este tipo de germinación se le llama simbiótica. Sin embargo, *in vitro* es posible prescindir del hongo, sustituyendo su acción por un medio nutritivo; a esta germinación se denomina asimbiótica.

3. Si como resultado de un determinado cruce, se obtiene un número limitado de semillas, eligiendo un medio nutritivo apropiado, se puede conseguir que todas germinen *in vitro*.

4. La siembra *in vitro* permite germinar embriones inmaduros de orquídea, acortándose en consecuencia el ciclo de mejora.

5. La germinación y el desarrollo tienen lugar mucho más rápidamente *in vitro*, ya que se realiza en un ambiente acondicionado, y sin competencia con hongos o bacterias.

Para una mejor comprensión de (la siembra de) las semillas de orquídea, se deben consultar los artículos de: Arditti (1967), Arditti y Ernst (1982), y Harley (1969). Las semillas de orquídea son muy pequeñas; 1,0-2,0 mm de largo y 0,5-1,0 mm de ancho. Se producen en elevadas cantidades por cápsula: 1.300-4.000.000. Las semillas constan de una testa gruesa (cubierta seminal), que encierra un embrión de alrededor de 100 células (Fig. 17.1). La cubierta tiene un aspecto exterior característico, en forma de red, que es diferente para cada especie. La testa está formada por un tejido muerto, compuesto hasta en un 96% de aire; de forma que cada semilla de orquídea puede ser considerada como un auténtico globo. El embrión tiene una forma redondeada o esférica. La mayor parte de las semillas de orquídea están escasamente diferenciadas: no se distinguen cotiledones ni raíces, y no tienen endospermo. En el extremo distal del embrión existe un punto de crecimiento potencial, no identificable en el estado de semilla. Las células del embrión presentan una estructura simple, son isodiamétricas y escasamente diferenciadas.

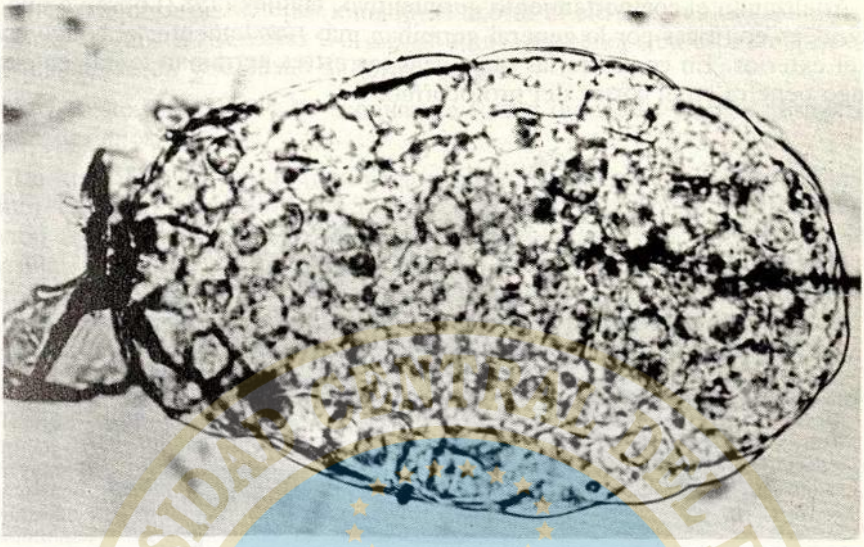


Figura 17.1 "Embrión" de *Paphiopedilum ciliolare*, en una semilla en reposo. El embrión no se encuentra diferenciado, y no existen cotiledones, raíces o un endospermo visible. (Pierik *et al.*, 1983)

De acuerdo con Arditti (1967), Harley (1969), y Pierik *et al.* (1982a, 1983), la germinación de las semillas de orquídea tiene lugar de la siguiente forma: El embrión absorbe agua a través de la testa, aumentando de volumen. Después se inicia la división celular, rompiendo el embrión la cubierta seminal (Fig. 17.2). A continuación se forma una estructura de tipo protocormo, a partir del agregado de células, y sobre aquel puede distinguirse un meristemo del vástago (Fig. 17.3). Tan pronto como se inicia la diferenciación de órganos (meristemo del vástago en un lado y rizoides en el opuesto), comienza un período de crecimiento intenso. Si el protocormo está a la luz, adquiere el color verde y al mismo tiempo se desarrollan hojas. Como resultado de la formación de la clorofila la planta se hace autótrofa. Más tarde las primeras raíces auténticas se forman endógenamente; el protocormo y los rizoides (pelos radicales) pierden su misión nutritiva y desaparecen (Fig. 17.3).

Figura 17.2 Izquierda: semillas de *Paphiopedilum ciliolare*, secas, en reposo (sin germinar). Derecha: varios estadios de la germinación, 5-8 semanas después de la siembra *in vitro* (Pierik *et al.*, 1983)

Analizando el comportamiento germinativo, Hadley (1982) observó que las orquídeas epifíticas por lo general germinan más rápidamente; el hongo crece en el exterior. En contraste las orquídeas terrestres germinan lentamente y el hongo penetra en el cortex del protocormo.

Figura 17.3 Desarrollo del protocormo de *Paphiopedilum ciliolare* para originar una plántula. Arriba: desarrollo del meristemo caulinar, para originar un vástago. Abajo: formación de la primera raíz. Dibujos realizados 14-21 semanas después de la siembra *in vitro* (Pierik *et al.*, 1983)

Hasta hace poco tiempo el porcentaje de germinación de las semillas de orquídea, se podía determinar exclusivamente sembrando las semillas y contando aquellas que germinaban. Sin embargo, Singh (1981) demostró que el test del tetrazolio (los embriones viables se tiñen de rojo, mientras que los no viables se quedan blancos), puede ser utilizado para determinar la viabilidad de las semillas de orquídeas tropicales epífitas. Sin embargo, Van Waes y Debergh (1986) han demostrado que el método Singh no puede ser aplicado directamente a las orquídeas del oeste de Europa, cuya viabilidad se determina mejor por el siguiente procedimiento de tres etapas: Preparación de las semillas en una solución al 5% (p/v) de $Ca(OC1)_2$ + 1% (v/v) Tween 80. Inmersión en agua estéril durante 24 horas. Aplicación, al final, del test clásico del tetrazolio.

Si las semillas de orquídea pueden o no ser almacenadas, es una pregunta difícil de contestar; generalmente se aconseja que las semillas maduras sean almacenadas a 5 °C (Fast, 1980).

Muchos investigadores han indicado que las semillas de orquídea pueden ya germinar antes de que la cápsula esté madura (adquiera el color marrón) y se abra. Esta información es importante, tanto para el aficionado como para el profesional (Valmayor y Sagawa, 1967), ya que:

1. Es mucho más fácil esterilizar una cápsula seminal cerrada, que cada semilla individualmente, una vez que ha salido de aquélla.

2. La propagación precoz, a partir de la cápsula todavía verde, desgasta menos a la planta.

3. Existe un menor riesgo de aborto embrionario con cruces entre especies y cultivares que no están estrechamente relacionados.

4. La siembra de semillas inmaduras acorta el ciclo de mejora; se pueden sembrar a veces las semillas 2-3 meses antes, sin tener que esperar a que las cápsulas maduren y se abran de forma natural.

5. La esterilización de las semillas de forma individual es más posible que produzca daños.

Lucke (1971) afirmó que, en principio, las semillas de orquídea se pueden sembrar cuando la semilla se encuentra en el estadio intermedio entre la fertilización (que tiene lugar muy tarde en las orquídeas), y la maduración de la cápsula. El mismo autor aconseja que no se deben sembrar las semillas *in vitro*, antes de que la cápsula haya llegado a los dos tercios de su madurez. En la tabla que se da a continuación (Lucke, 1971), se indican los períodos de tiempo que normalmente transcurren entre la fertilización y la madurez:

Calanthe	4 meses	*Laelia*	9 meses
Cattleya	11 meses	*Miltonia*	9 meses
Coelogyne	13 meses	*Odontoglossum*	7 meses
Cymbidium	10 meses	*Paphiopedilum*	10 meses
Cypripedium	3,5 meses	*Phalaenopsis*	6 meses
Dendrobium	12 meses	*Stanhopea*	7 meses
Epidendrum	3,5 meses	*Vanda*	20 meses

La esterilización se puede realizar de dos formas:

1. Cápsulas todavía cerradas. En este caso la esterilización es muy simple: Se baña la cápsula en alcohol de 96% y posteriormente se flamea. La cápsula que contiene las semillas, que generalmente está estéril en su interior, se abre después con un escalpelo estéril.

2. Cápsulas abiertas. La esterilización de las semillas individuales constituye un proceso más delicado y complejo. Se colocan las semillas en un pequeño matraz (que posteriormente se tapa con un tapón de goma), conteniendo lejía (10% NaClO), en la proporción de 2-5% (v/v), también se añade Tween 20 u 80. La esterilización se realiza durante 5-10 minutos. Las semillas viables generalmente se hunden en la lejía, mientras que las que flotan, la mayor parte de las veces no contienen embrión. Después de la esterilización el líquido es retirado, bien por vertido, o con la ayuda de una pipeta, posteriormente se aclaran las semillas con agua esterilizada etc. Otro procedimiento de retirar el líquido consiste en invertir el matraz, con el tapón ligeramente suelto; de esta forma las semillas quedan en las paredes del matraz.

Antes de sembrar las semillas de orquídea, se debe comprobar si tienen embrión; esto se puede ver con la ayuda de un estereomicroscopio, con una iluminación adecuada. La siembra se realiza generalmente sobre un medio nutritivo sólido con una cierta pendiente (así se pueden extender mejor las semillas). Se utiliza una espátula o aguja de siembra para distribuir las semillas de forma uniforme sobre el medio, también se pueden suspender las semillas en agua estéril y hacer la siembra por medio de una gota (Arditti, 1982). Las semillas se siembran sobre, y no dentro del agar, donde se puede dar una deficiencia en oxígeno. La densidad a la que se siembran las semillas depende de la proporción de viables (siendo la densidad más alta si la viabilidad es baja), y también de la especie de orquídea de que se trate. Si la especie *Phalae-*

nopsis se siembra demasiado densa, los protocormos y plántulas que se obtienen quedan enmarañados, y como consecuencia el repicado se hace con dificultad.

No está claro si la cubierta seminal (testa) contiene inhibidores. Smith (1975) afirmó que la cubierta seminal no tiene efecto inhibidor sobre la germinación. Sin embargo, Van der Kinderen (1982) indicó que la germinación de algunas orquídeas, estaba influida por la concentración de ABA de las semillas: De manera que si la concentración de ABA era alta, se producía una germinación pobre.

Debe tenerse en cuenta que puede ser necesario repicar las plántulas de orquídeas dos o tres veces, hasta que alcanzan el tamaño suficiente para ser trasplantadas al suelo. El medio en el que se repican es generalmente diferente del de siembra. El tiempo que las orquídeas permanecen en el tubo o matraz es muy variable: entre 6 meses y 2 años. El repicado es necesario, ya que si no se realiza las plantas llegan a estar demasiado apretadas y el crecimiento se para. Las orquídeas *in vitro* se repican en grupos, de la misma forma que se hace con las orquídeas *in vivo;* ya que las semillas crecen así mejor que cuando están aisladas, a este hecho se le denomina en la bibliografía como "efecto comunidad". Cuando las orquídeas se trasplantan al suelo, generalmente se llevan a éste, en las llamadas "macetas madre" (Fig. 17.4).

Figura 17.4 Plantas de *Paphiopedilum* después de su traspaso al suelo, creciendo juntas (efecto comunidad), en lo que se llama maceta madre

Factores que afectan a la germinación y al crecimiento

Existe un gran número de factores complejos que influyen en la germinación y el crecimiento de las orquídeas, y que dependen en gran medida de la especie. A continuación se hace una estimación de los distintos factores, aunque de ninguna manera se debe considerar como completa. Esta información se ha recopilado con la ayuda de los siguientes artículos: Arditti (1967, 1977, 1982), Arditti y Ernst (1982), Fast (1980), Hadley (1975, 1982), Harley (1969), Rao (1977), Thomale (1957), y Zimmer (1980).

Al considerar esta relación se debe tener en cuenta que la germinación de las semillas inmaduras requiere unas condiciones más controladas que la que precisan las semillas completamente desarrolladas; también las orquídeas terrestres son más difíciles de germinar y cultivar que las epífitas (tropicales). Cuando se pretende cultivar una especie en concreto, se debería consultar la bibliografía especializada, por ejemplo, las revistas American Orchid Society Bulletin, die Orchidee, Orchideeën, etcétera.

1. *Temperatura*. Las semillas se germinan generalmente a 20-25° C. Se sabe poco sobre dormición y sobre la posible necesidad de frío.

2. *Luz*. Se utilizan duraciones del día normalmente de 12-16 horas (tubos fluorescentes). Se aconseja una irradiancia baja de 2,5-10 W m^{-2}. Las semillas de *Paphiopedilum ciliolare* (Pierik *et al.*, 1982a, 1983), sólo germinan cuando están en la oscuridad durante los tres primeros meses; esto coincide con las investigaciones iniciales sobre *Paphiopedilum* llevadas a cabo por Allenberg (1976), Smith (1975), y Stimart y Ascher (1981). El género relacionado *Cypripedium* también precisa oscuridad para germinar (Allenberg, 1976; Reyburn, 1978). Una vez que las semillas de *Paphiopedilum* y *Cypripedium* han germinado en la oscuridad, se les proporciona un bajo nivel de luz (1 W m^{-2}), posteriormente se incrementa la irradiancia hasta 4 W m^{-2}.

3. *Agar*. La concentración recomendada es de 0,6-0,8% (p/v Bacto-agar Difco).

4. *Minerales*. Aunque Knudson (1922) germinó las semillas de orquídea sobre el medio Knudson C (sin micro-elementos), se recomienda utilizar un medio que contenga micro- y macro-elementos. Las orquídeas generalmente necesitan hierro para germinar (Fig. 17.5), y es muy probable que se necesite también manganeso. La certeza de esta conclusión es cuestionable, ya que el agar está siempre contaminado con micro-elementos (Fast, 1980).

Los medios minerales que se usan frecuentemente para la germinación y el crecimiento de las orquídeas son: Knudson C (1946), Vacin y Went (1949), Thomale GD1 (1957), Burgeff-3f (Thomale, 1957). A pesar de que el medio Thomale GD1 no contiene calcio, este medio es muy apropiado para *Paphiopedilum* (Flamee, 1978; Stimart y Ascher, 1981; Pierik *et al.*, 1982a, 1983). Las necesidades minerales de las orquídeas no son generalmente altas, recomendándose generalmente un medio pobre en sales. Arditti (1982) aconsejó la siembra de las orquídeas tropicales en un medio Knudson C modificado. Las orquídeas terrestres requieren un medio, pobre en sales, mucho más complejo; mientras que las epífitas necesitan un medio más rico en sales.

5. *Azúcar*. Es de extremada importancia como fuente de energía, especialmente para las semillas que germinan en la oscuridad (ya que son completa-

Figura 17.5 Germinación de semillas de *Paphiopedilum ciliolare in vitro* (Pierik *et al.*, 1983). Izquierda: germinación sobre un medio sin hierro (germinación pobre, sin crecimiento y desarrollo posterior). Derecha: germinación sobre un medio con 25 mg l^{-1} de NaFeEDTA (buena germinación, crecimiento y desarrollo). Fotografía tomada 28 semanas después de la siembra

mente heterótrofas, en lo que respecta al azúcar). Una concentración de azúcar de 1-3% (p/v), es la que se utiliza habitualmente. Por lo general se emplea sacarosa, aunque a veces puede utilizarse una mezcla de glucosa y fructosa (ambas a concentraciones de 0,5-1,5% p/v).

6. El *pH* debe situarse entre 4,8-5,8. Un pH más bajo de 4 o más alto de 7 resulta muy desfavorable.

7. *Vitaminas*. Las necesidad de vitaminas está generalmente discutida (Arditti, 1977a; Arditti y Harrison, 1977). A veces se añaden las siguientes vitaminas: biotina, ácido nicotínico (niacina), vitamina C, vitamina B_1, piridoxina, ácido pantoténico y meso-inositol. El ácido nicotínico es el que se utiliza con más frecuencia, aunque la biotina resulta importante para la formación de clorofila en *Paphiopedilum* (Lucke, 1969).

8. Los *reguladores* generalmente no son necesarios para la germinación de las semillas, y su presencia suele producir efectos no deseados (formación de callo, formación de vástagos adventicios, etc.). Concentraciones bajas de IBA y NAA, a veces estimulan el crecimiento de las plántulas de *Dendrobium, Cymbidium, Cattleya* y *Galeola* (Cheng-Haw *et al.*, 1976-1978; Strauss y Reisinger, 1976; Nakamura, 1982). Cheng-Haw *et al.* (1976-1978) también demostraron el efecto estimulador de la kinetina en *Aranda* y del GA_3 en *Vanda*.

9. *Mezclas complejas*. Se utilizan las siguientes mezclas: Homogeneizado de plátano, leche de coco, peptona, triptona, levadura de fermentación, hidrolizado de caseína, salep, jugo de piña, jugo de tomate y extracto de patata (Arditti, 1982). Los efectos estimuladores de estas mezclas se explican por su contenido en vitaminas, aminoácidos, y a veces por su contenido en reguladores. La peptona y la triptona (Fig. 17.6) tienen un efecto estimulador sobre la

Figura 17.6 Efecto de la triptona sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de ***Paphiopedilum ciliolare in vitro***. Izquierda: sin triptona; derecha: con 2 g l^{-1} de triptona (Pierik *et al.*, 1983). Fotografía tomada 28 semanas después de la siembra

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
FUNDADA EN 1620
QUITO

germinación y el crecimiento de *Paphiopedilum* (Fast, 1971; Pierik *et al.*, 1983). Ernst (1975) indicó que la adición de plátano es especialmente estimulante para el crecimiento de las plántulas de *Paphiopedilum* y *Phalaenopsis;* no se encontraron diferencias marcadas entre plátanos verdes y maduros. Se debería evitar la utilización del plátano cuando se siembra *Paphiopedilum,* ya que frena completamente el crecimiento después de la germinación (Pierik *et al.*, resultados no publicados).

10. Carbón activo. Ernst (1975) y Fast (1971) encontraron que el crecimiento de plántulas de *Paphiopedilum* y *Phalaenopsis* era estimulado por carbón activo al 0,2% (2g l^{-1}), si se añade además plátano, el efecto es aún más marcado. Sin embargo, en contra de lo que Ernst (1975) aconsejó, se debería evitar la utilización del carbón activo, al sembrar *Paphiopedilum* (Pierik *et al.*, datos sin publicar).

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

18
PROPAGACION VEGETATIVA DE LAS ORQUIDEAS

Introducción

Las orquídeas se pueden multiplicar tanto de forma vegetativa como sexual. Si se utiliza la propagación vegetativa, la descendencia es idéntica a la planta madre. Sin embargo, si se usa la propagación generativa (por medio de semilla), sólo raras veces se obtiene una descendencia semejante a los padres, y esto sólo en el caso de especies silvestres. Si se utilizan semillas procedentes de una orquídea cultivada (generalmente obtenida por un cruce, y fuertemente heterocigótica), la descendencia será muy heterogénea y rara vez idéntica al material inicial. En principio las orquídeas cultivadas se pueden propagar sólo de forma vegetativa. El clonado de orquídeas *in vivo* es un proceso muy lento, y se pueden requerir a veces 10 años antes de conseguir un clon de un tamaño aceptable.

A partir de 1960 se produjo una revolución en la propagación vegetativa de las orquídeas. Morel (1960) intentó obtener *Cymbidium* libres de virus, por cultivo de meristemos; y para este propósito aisló ápices del vástago *in vitro*, como se indica en la figura 18.1. A partir de estos ápices del vástago se obtuvieron unos "cuerpos protocórmicos" que eran extremadamente parecidos a los que se forman después de la germinación de la semilla. A veces este protocormo se divide de forma espontánea, pero generalmente esto se consigue cortando el protocormo en porciones (Morel, 1965). En el caso de *Cymbidium* se pueden producir 6-8 nuevos protocormos, a partir de uno inicial en alrededor de 6 semanas; en principio este esquejado de los protocormos se puede repetir de forma indefinida. Si no se obtienen nuevos esquejes, el ápice del vástago de cada protocormo puede en principio desarrollar un vástago con hojas y raíces (Fig. 18.2). De esta forma Morel produjo millares de plantas en un año, a partir de un único ápice del vástago (un meristemo con algunos primordios foliares). El clonado de orquídeas por cultivo de meristemos se convirtió así en la primera aplicación comercial de la propagación vegetativa *in vitro*. Este método, que originalmente se desarrolló para *Cymbidium*, se modificó más tarde, y se utilizó para *Cattleya* y otros muchos géneros de orquídeas. El "Meri-clona-

do de orquídeas" (propagación vegetativa por cultivo de meristemos), se realiza ahora en gran escala, en el mundo entero. Como resultado de esto las orquídeas han dejado de ser unas plantas de lujo, en realidad, en el caso de algunas especies como *Cymbidium* se producen demasiadas plantas.

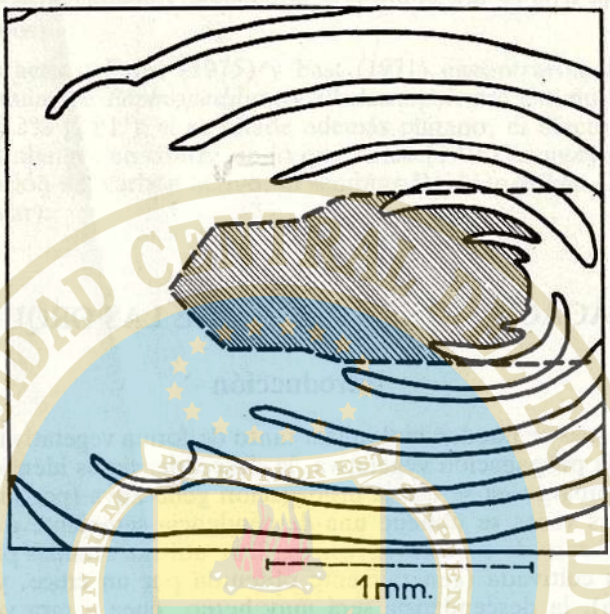


Figura 18.1 Diagrama de una sección longitudinal, de una yema de *Cymbidium*. Para el aislamiento *in vitro*, se retira el meristemo y dos primordios foliares (área sombreada), cortando a lo largo de la zona indicada con trazo discontinuo, y despreciando las hojas exteriores. Adaptado de Champagnat *et al.* (1966)

Los protocormos que se desarrollan después de la germinación de una semilla de orquídea, tienen un estado morfológico que se encuentra a mitad de camino entre un embrión indiferenciado y un vástago. Con la propagación vegetativa por medio del cultivo de meristemos (Fig. 18.2), se forman también cuerpos protocórmicos, lo que de hecho significa que el ápice del vástago de una planta adulta se rejuvenece (pasa de la fase adulta a la juvenil). Debido a que los protocormos obtenidos por germinación de semillas tienen muchas semejanzas (formación de rizoides, formación espontánea o inducida de protocormos, a partir de fragmentos de protocormo, polaridad débil), con los producidos a partir de ápices aislados del vástago, se ha introducido el término cuerpos protocórmicos, cuando se clonan orquídeas por cultivo de meristemos (Champagnat, 1977).

La propagación vegetativa de orquídeas, por cultivo de meristemos, se puede dividir en tres fases: transformación del meristemo en un cuerpo protocórmico o tipo protocormo, la propagación de los protocormos, dividiéndolos en fragmentos, y la conversión de estos protocormos en vástagos con raíces (Teo, 1976-1978). Se dan más detalles de estas fases en el apartado *Cultivo de meris-*

temos (Whitner, 1974; Champagnat, 1977; Arditti 1977; Arditti *et al.*, 1982; Rao, 1977; Fast, 1980).

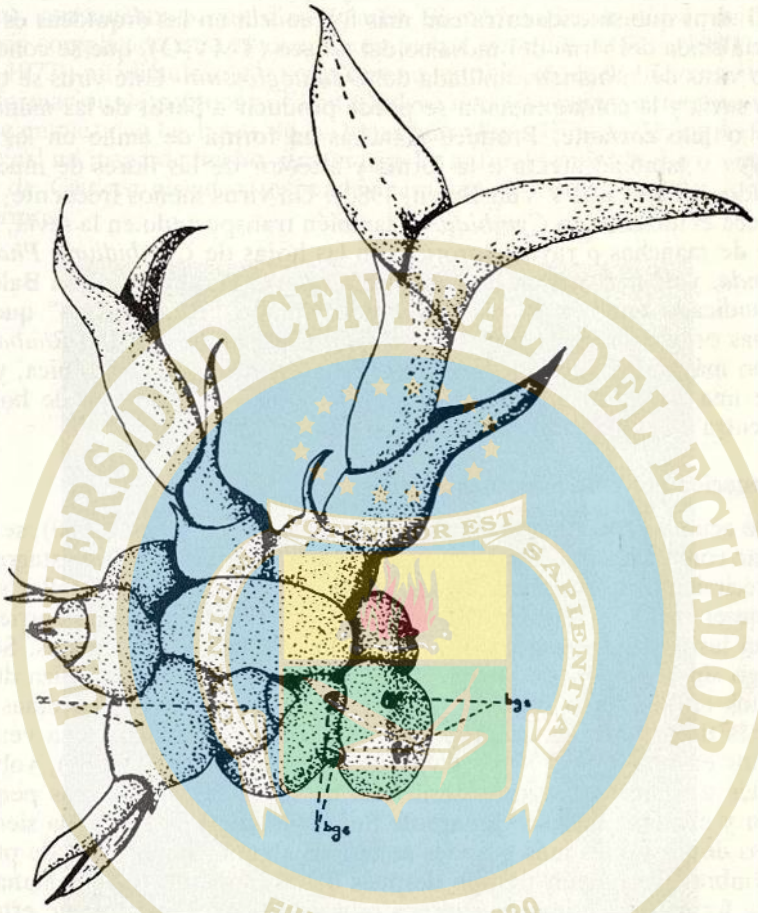


Figura 18.2 Meristemo de *Cymbidium*, mostrando varios cuerpos protocórmicos y brotes adventicios. Adaptado de Champagnat *et al.* (1966)

Cultivo de meristemos

Producción de plantas libres de virus

Una de las condiciones necesarias para la propagación, es que las plántulas obtenidas deben estar libres de virus. En el Capítulo 19 se sugiere que por medio del cultivo de meristemos, se obtienen de forma automática plantas libres de virus, pero en la realidad no ocurre así. Las investigaciones llevadas a cabo por Morel (1960) con *Cymbidium*, demostraron que se obtenían plantas libres de virus, sólo en el caso de que se utilizasen meristemos (de aproximadamente 1 mm) con dos primordios foliares. El clonado que se hace actualmente, con porciones apicales de vástago mucho más grandes que las utilizadas por

Morel, tiene pocas probabilidades de producir plantas libres de virus. Por consiguiente, para la reproducción de las orquídeas, se debería empezar por obtener un material libre de virus.

El virus que se encuentra con más frecuencia en las orquídeas es una cepa especializada del virus del mosaico del tabaco (TMV-O), que se conocía antes como virus de la mancha anillada del *Odontoglossum*. Este virus se transporta en la savia y la contaminación se puede producir a partir de las manos o cualquier objeto cortante. Produce manchas en forma de anillo en las hojas de *Cattleya* y también afecta a la forma y al color de las flores de muchas otras orquídeas (Hakkaart y Van Balen, 1980). Un virus menos frecuente, es el que produce el mosaico en *Cymbidium*, también transportado en la savia, y responsable de manchas o rayas cloróticas en las hojas de *Cymbidium, Phalaenopsis* y *Vanda,* y de necrosis en las flores de *Cattleya*. Hakkaart y Van Balen (1980) han indicado también la existencia del llamado "Rhabdovirus" que ataca a muchas orquídeas. En contraste con los dos primeros virus, el *Rhabdovirus* es mucho más difícil de identificar: se precisa microscopía electrónica, y trabajar sobre una porción de una hoja vieja, sin embargo, este tipo de hojas no se encuentra en el material propagado *in vitro*.

Propagación por cultivo de meristemos

De acuerdo con Champagnat (1977), Rao (1977), y Fast (1980), se deberían utilizar como material inicial, para el cultivo de meristemos, vástagos jóvenes en crecimiento de 10-15 cm de longitud, que acaben de desarrollar sus hojas. Cualquier residuo de suelo o suciedad se lava bien con agua corriente, y se retiran las hojas de manera que se puedan ver las yemas axilares. Se baña el vástago sin hojas, en alcohol de 70% (v/v), y después se esteriliza durante 10 minutos en una lejía al 10% (v/v). Se preparan entonces las yemas axilares, después de haberlas aclarado en agua estéril. Se esterilizan una vez más (10 minutos en una lejía 3-10% (v/v), conteniendo Tween 20 u 80), volviéndolas después a aclarar en agua estéril. Las bases de las yemas más pequeñas se cortan y eliminan en una cámara de flujo laminar, y se realiza la siembra. En el caso de las yemas más grandes se retiran algunas hojas antes de proceder a su siembra. Pasa algún tiempo después del aislamiento (6-10 semanas), hasta que se forman los primeros cuerpos protocórmicos. Una vez que esto ocurre, los protocormos se separan y son repicados. Actualmente se siembran yemas mayores (con al menos 3-4 primordios foliares), con lo que se consigue un mejor nivel en el prendimiento de los esquejes. Si los protocormos no se separan, el ápice del vástago del protocormo crece y se forman raíces y vástagos; si se separan, continúa la formación de protocormos adventicios.

Champagnat (1977) consideró impreciso el término propagación meristemática de orquídeas, ya que de hecho el meristemo apical no juega ningún papel, y se pierde durante el cultivo. En el caso del cultivo de meristemos de *Cymbidium*, solamente las zonas de alrededor de los primordios foliares muestran crecimiento, para transformarse finalmente en protocormos. La formación de protocormos es en definitiva también posible, sin el meristemo apical.

En el caso del cultivo de meristemos de *Cattleya*, se produce muy rápidamente una coloración marrón en los tejidos lesionados; por esta razón se reco-

mienda frecuentemente cortar el meristemo en líquido, y cultivarlo después en un medio líquido, en el cual la coloración marrón difunde con más facilidad (Fast, 1980). En el caso de *Cattleya* generalmente se aisla una yema completa (3-5 mm), con muchos primordios foliares. El medio que se utiliza para *Cattleya* es más complicado que el que se usa para *Cymbidium* (Fast, 1980; Champagnat, 1977); añadiéndosele a veces auxina, citokinina, leche de coco y peptona. La formación de protocormos en *Cattleya* necesita bastante tiempo y generalmente empieza en las bases de las hojas más viejas (Fig. 18.3); aquí el meristemo apical no juega de hecho ningún papel y al final se pierde. Los primordios foliares de *Cattleya* aislados responden también de forma positiva formando protocormos.

Figura 18.3 Meristemo aislado de *Cattleya aurantiaca*, conteniendo primordios foliares, después de 2 meses de cultivo en un medio líquido. En las bases de los primordios foliares exteriores, escamiformes, se originan protocormos, en los que se pueden ya reconocer los ápices caulinares (Pierik y Steegmans, 1972)

Miltonia, Odontonia y Odontoglossum ofrecen el mismo tipo de respuesta que *Cattleya* (regeneración en la base de las hojas), y se cultivan también en un

medio relativamente rico. La respuesta de estos 3 géneros es mucho más rápida que la de *Cattleya* (Champagnat, 1977). Hasta ahora el cultivo de meristemos de *Paphiopedilum* ha fracasado, debido a la rápida coloración marrón (necrosado) que se produce cuando se aisla el meristemo (ápice del vástago).

El medio para el cultivo de meristemos es muy semejante al relativamente simple, que se utiliza para la siembra de los distintos géneros. *Cymbidium* y *Miltonia* (que son relativamente fáciles de multiplicar), se cultivan frecuentemente en un medio Knudson C (1946) o sobre el medio modificado de Vacin y Went (1949). *Cattleya* y algunos otros géneros necesitan un medio especial (Morel, 1974). Los medios tipo para los diferentes géneros han sido dados por: Bergman (1972), Withner (1974), Arditti (1977), Fast (1980) y Zimmer (1980). Los medios Murashige y Skoog (MS) (1962), y Wimber (1963) fueron utilizados más tarde (De Bruyne y Deberg, 1974).

El aislamiento de meristemos generalmente tiene lugar en medios sólidos, con la excepción de *Cattleya*; la propagación de protocormos generalmente tiene lugar en medios líquidos, y el crecimiento de protocormos hasta plántulas, nuevamente en medio sólido (Leffring, 1968). La composición de los medios, en tres etapas diferentes de la propagación de las orquídeas es frecuentemente diferente. Resulta llamativo el hecho de que los protocormos generalmente no se transforman en plántulas en un medio líquido (Homes *et al.*, 1972).

El pH del medio se selecciona entre 4,8 y 5,8. La fuente azucarada es sacarosa en la proporción 1-3% (p/v), o a veces glucosa 1,5% + fructosa 1,5%. Las orquídeas monopódicas (Sagawa, comunicación personal), necesitan un medio libre de azúcar para el aislamiento de los meristemos; en presencia de azúcar se produce un amarilleamiento y la muerte del meristemo. En la fase posterior (formación del protocormo), se puede añadir al medio azúcar y leche de coco. Por analogía con el cultivo de plántulas, se utiliza frecuentemente leche de coco (10-15%), para estimular la formación de protocormo en las células epidérmicas (Morel, 1974).

La adición de reguladores no es generalmente necesaria (Homes y otros, 1972); las posibilidades de mutación son mucho más grandes en su presencia. Fonnesbech (1972) encontró efectos positivos de las auxinas sobre *Cymbidium* y Cheng-Haw *et al.* (1976-1978), en *Cattleya* y *Aranda*. Reinert y Mohr (1967) y Pierik y Steegmans (1972), indicaron un efecto estimulador de la citokinina en *Cattleya*. Cheng-Haw *et al.* (1976-1978), indicaron también un efecto positivo, de ese tipo de regulador en *Cattleya* y *Epidendrum*. Finalmente Fonnesbech (1972), indicó que el GA_3 inducía el crecimiento por elongación en *Cymbidium*.

La temperatura óptima para el crecimiento de las orquídeas se encuentra entre 22 y 28° C. La luz fluorescente se utiliza generalmente con una duración del día de 12-16 horas, aunque a veces se puede emplear luz continua. Se puede usar una baja irradiancia para el aislamiento, pero ésta se debe incrementar cuando las plántulas se forman a partir de los protocormos.

En principio la multiplicación de las orquídeas por cultivo de meristemos se puede hacer de dos formas: 1: Sobre un medio sólido; 2. En un medio líquido en movimiento, que se mantiene así por la acción de una rueda rotatoria (Wimber, 1963). Su velocidad es extremadamente variable, pero la mayor parte de

los investigadores prefieren una velocidad lenta (2-5 revoluciones por minuto). La propagación y el crecimiento son, en general, mejores en un medio en movimiento que en un medio sólido. En los medios líquidos existe un mejor suministro de oxígeno y el transporte de nutrientes es más eficaz.

Cuando las plántulas con tres o cuatro hojas son suficientemente grandes (5-7 cm de altura), después de varios repicados, se transfieren a cajas. Es aconsejable esterilizar bien el suelo con vapor. El abono utilizado depende de la clase de orquídea de que se trate. Generalmente se utiliza una turba suave, a la que se sube el pH y se le añaden nutrientes.

Otros métodos de propagación

Con el paso de los años se han desarrollado algunos otros métodos, además del cultivo de meristemos, para clonar orquídeas en pequeña escala:

1. *Utilización de hojas jóvenes.* Las hojas jóvenes y los ápices de hojas, por ejemplo, de *Cattleya,* forman callos en sus bases, a partir de los cuales se pueden formar protocormos, que se pueden utilizar para la subsiguiente multiplicación (Champagnat, 1977; Champagnat y Morel, 1969). Churchill *et al.* (1971a, 1971b, 1973) describieron también la regeneración de plántulas, obtenidas a partir de la formación de callos y protocormos, de hojas jóvenes y ápices foliares de *Laeliocattleya* y *Epidendrum.* Vij *et al.* (1984) reprodujeron la especie *Rhynchostylis retusa* por organogénesis directa, a partir de cultivos de segmentos de hoja.

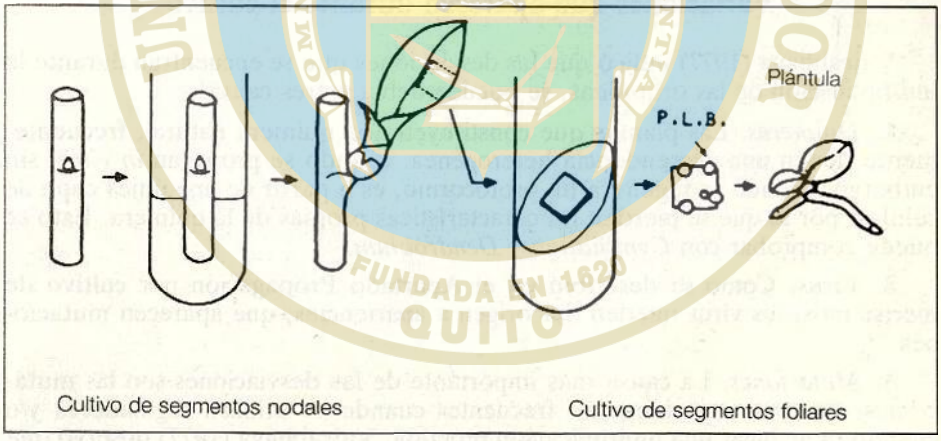


Figura 18.4 Propagación vegetativa *in vitro* de híbridos de *Phalaenopsis.* Los explantos foliares se aislan a partir de los brotes, que se originan de las yemas durmientes. Estos explantos forman cuerpos de tipo protocórmico (PLB), que finalmente producen plántulas (Tanaka y Sakanishi, 1977)

Tanaka y Sakanishi (1977, 1985) indicaron que se podían desarrollar cuerpos protocórmicos, sobre fragmentos de hojas de vástagos jóvenes de *Phalaenopsis,* bajo la influencia de BA, NAA, y adenina. A partir de esos cuerpos protocórmicos se obtenían plántulas. Los vástagos jóvenes, a su vez, procedían de yemas aisladas de una inflorescencia (Fig. 18.4).

2. *Yemas durmientes.* Se pueden obtener vástagos a partir de primordios jóvenes de yemas florales, o de yemas basales, vegetativas durmientes, de inflorescencias de *Dendrobium, Vanda, Phalaenopsis, Oncidium, Phragmipedium, Epidendrum,* y *Thunia* (Rao, 1977; Fast, 1980; Singh y Prakash, 1984). De acuerdo con Teo (1976-1978), Rotor, en 1949, fue el primer investigador que clonó *Phalaenopsis* de esta forma.

3. *Inflorescencias jóvenes.* Intuwong y Sagawa (1973) desarrollaron un método para propagar *Vascostylis, Neostylis,* y *Ascofinetia, in vitro,* a partir de explantos de inflorescencias jóvenes. Estos explantos generaban tejidos, que se transformaban en protocormos, cuando se cultivaban en un medio especial.

4. *Callo.* Champagnat y Morel (1972) regeneraron tejido calloso a partir de tejido procedente de rizoma de *Ophrys;* del primero se podían formar protocormos. La misma experiencia se pudo realizar con *Aranda* (Chiang-Shiang *et al.*, 1976-1978).

5. *Plántulas jóvenes.* Estas pueden ser inducidas a regenerar, como fue demostrado por Pierik y Steegmans (1972), con *Cattleya aurantiaca,* siendo la citokinina el factor inductor.

6. *Etiolación.* Si son etioladas plántulas de *Paphiopedilum,* cultivadas *in vitro,* haciéndolas crecer en la oscuridad o con baja irradiancia, pueden utilizarse en el método de segmentos nodales (Pierik y Sprenkels, datos no publicados). Este método se describe en el Apartado Cultivo de segmentos nodales, para cualquier planta en general.

Variaciones que aparecen durante el cultivo

Vajrabhaya (1977) indicó que las desviaciones que se encuentran durante la multiplicación de las orquídeas, se pueden deber a tres causas:

1. *Quimeras.* Las plantas que constituyen una quimera natural, frecuentemente tienen una descendencia heterogénea, cuando se propagan *in vitro;* sin embargo, cuando se regenera un protocormo, es a partir de una única capa de células, por lo que se pierden las características propias de la quimera. Esto se puede comprobar con *Cymbidium* y *Dendrobium.*

2. *Virus.* Como se describió en el Apartado Propagación por cultivo de meristemos, los virus pueden dar origen a apariencias, que aparecen mutaciones.

3. *Mutaciones.* La causa más importante de las desviaciones son las mutaciones, que son especialmente frecuentes cuando se utilizan reguladores y/o cuando tiene lugar una multiplicación repetida. Vajrabhaya (1977) observó que con 205 plantas de un clon de *Dendrobium,* se obtuvieron 5 tetraploides (con flores grandes). Por propagación *in vitro* resulta que los *Dendrobium* triploides pueden convertirse en hexaploides, y los diploides pueden llegar a octaploides después de algunas multiplicaciones. Rutkowsky (1983) demostró que concentraciones de ABA menores de 0,1 mg l^{-1} producían mutaciones en *Phalaenopsis.*

También se pueden producir mutaciones de forma artificial con colchicina o por medio de radiaciones ionizantes. Fast (1980) demostró que el uso de la

colchicina en *Dendrobium* (5 días, 0,1% p/v) y en *Cymbidium* (10-21 días en un medio líquido, conteniendo 2,5% de colchicina) era capaz de producir mutaciones.

Aplicaciones prácticas

Existen muchas aplicaciones prácticas en relación con el clonado *in vitro* de las orquídeas, de las cuales, las más importantes se pueden encontrar en la bibliografía indicada por Pierik (1979), y en el manual de Arditti (1977).

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

19

PRODUCCION DE PLANTAS LIBRES DE ENFERMEDADES

Introducción

Las infecciones internas producidas por virus, micoplasmas, bacterias y hongos pueden ser muy difíciles de combatir. Es prácticamente imposible liberar a la planta de estos patógenos internos, utilizando productos químicos. A veces es posible impedir la multiplicación de los virus, utilizando compuestos relativamente caros como Virazole (ribavirina) y vidarabina (antimetabolitos), añadidos al medio (Walkey, 1980; Kartha, 1986; Long y Casells, 1986). En algunas ocasiones, como en el caso de la azucena (Cohen, 1986) y la manzana (Hansen y Lane, 1985), la utilización de Virazole ha producido plantas libres de virus. La adición de antibióticos, para contrarrestar infecciones bacterianas internas, resulta también ineficaz. En un artículo de revisión de Bastiaens *et al.* (1983), se indica que los bactericidas son inútiles para eliminar las bacterias en los cultivos *in vitro,* ya que las concentraciones que se necesitarían para ser eficaces son fitotóxicas; además, a veces los micro-organismos no reaccionan en absoluto a los antibióticos añadidos. La utilización de antibióticos puede también conducir involuntariamente a la selección de cepas resistentes.

En contra de lo que se había pensado antes, los virus pueden también ser transmitidos en la multiplicación sexual; se conocen alrededor de 600 virus, parásitos de plantas, de los cuales por lo menos 80 pueden ser transferidos en la semilla (Phatak, 1974). Los virus, bacterias y hongos se transfieren casi siempre por multiplicación vegetativa. Por supuesto que siempre se puede intentar sanear un clon, por medio de la selección (por presencia de síntomas o por bioensayo); sin embargo, si resulta que el clon en cuestión sólo contiene plantas infectadas, se deberá hacer un intento de liberarse de la infección. Los virus especialmente pueden producir pérdidas en la producción de plantas, y también pueden producir una disminución en la calidad del producto; por todo esto, es de extrema importancia utilizar material libre de virus como material inicial, cuando se hace multiplicación vegetativa. Se utiliza la expresión libre de virus para indicar que un determinado material está libre de los virus, hasta ahora identificados, y cuya presencia se puede detectar con, por ejemplo, un ensayo de virus (Quak, 1966).

Existen 5 métodos utilizables para producir plantas libres de virus: 1. Por tratamiento térmico (calor); 2. Cultivo de meristemos (Fig. 19.1); 3. Tratamiento por calor, seguido de cultivo de meristemos; 4. Formación de vástagos adventicios, seguido del cultivo de meristemos; 5. Injerto de meristemos sobre patrones (plántulas), libres de virus; conocido también como micro-injerto.

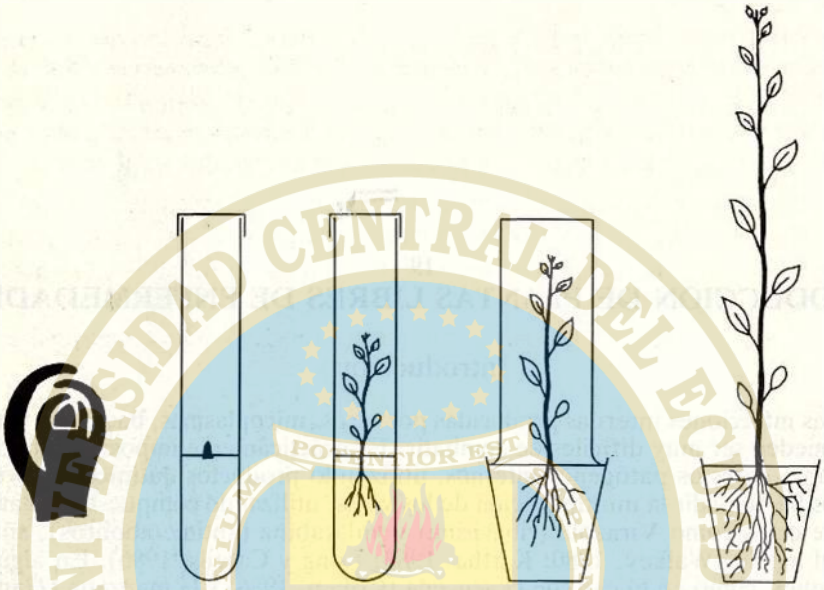


Figura 19.1 Resumen esquemático de lo que es el cultivo de meristemos. Izquierda: ápice del vástago, a partir del cual se aisla un meristemo *in vitro*. A partir del meristemo se origina una plántula que puede ser trasplantada al suelo. Dibujo del Instituto de Investigación Fitopatológica (IPO), Wageningen

Para conseguir meristemos libres de virus en gran escala, se puede inducir sobre explantos la formación de vástagos adventicios; posteriormente, utilizando este material, se puede hacer cultivo de meristemos. Si los meristemos aislados no se pueden mantener *in vitro*, se pueden injertar de forma temporal, sobre patrones (plántulas), cultivados *in vitro* y libres de virus. A veces se pueden obtener también plantas libres de virus, por cultivo de callos o de protoplastos. El cultivo de meristemos se utiliza también frecuentemente para obtener plantas libres de hongos o de bacterias. Más detalles acerca de los métodos de obtener plantas libres de enfermedades, se pueden encontrar en el apartado siguiente.

Si se sospecha que una planta está infectada por virus se deben realizar las siguientes operaciones (Quak, 1977).

1. En primer lugar se debe identificar el o los virus.
2. En segundo lugar, se debe intentar eliminar (todos) los virus.
3. Las plantas obtenidas después de los pasos anteriores, deben ser ensayadas para ver si realmente están libres de virus.
4. Finalmente, se deberán poner los medios para impedir una re-infección.

Hay que tener en cuenta que el material libre de virus, puede ser re-infectado; las siguientes medidas deberían impedir la re-infección (Quak, 1966; Theiler, 1981):

1. Las plantas se deberían cultivar en invernaderos, libres de infecciones y de vectores (libres de áfidos), o en lugares en los que de forma natural no hay portadores o virus.

2. Se debería controlar a los portadores de enfermedades (sobre todo insectos y nematodos), eliminando de forma continua cualquier foco de infección.

3. Se requieren unas normas higiénicas estrictas: Desinfección de manos, ropa, zapatos, así como de los instrumentos de injertado, e inoculación, impidiendo cualquier transferencia mecánica durante el cuidado del cultivo.

4. Las macetas y sustratos deberían estar libres de gérmenes.

5. Para tener una seguridad absoluta (en el caso de que se haya producido algún fallo en los pasos 1-4), se recomienda que el material vegetal libre de enfermedades se conserve *in vitro*.

6. Llevar a cabo continuamente una selección visual y por medio de ensayos.

Cuando se obtienen plantas libres de virus se debería tener en cuenta que las plantas infectadas pueden tener un aspecto diferente del que presentan las plantas libres de virus. Aunque esta diferente apariencia externa es generalmente resultado de la eliminación de los virus, no se puede desechar como posible causa la existencia de micro-mutaciones. Walkey (1980) indicó que se dan micro-mutaciones en ruibarbo y manzana después del cultivo de meristemos. Se puede encontrar más información sobre este fenómeno en el Capítulo 21, que trata de variación somaclonal.

Se han consultado los siguientes artículos para escribir este capítulo: Morel (1964), Quak (1966, 1972, 1977), Styer y Chin (1983), Walkey (1980), y Hildebrandt (1977). Información más especializada sobre géneros y especies en particular se puede encontrar en la bibliografía indicada por Pierik (1979), y Bhojwani *et al.* (1986).

Producción de plantas libres de virus

Tratamiento por calor

El tratamiento por calor es un método eficaz de inactivar algunos virus (Quak, 1972; Ten Houten *et al.*, 1968). El tratamiento por calor es eficaz solamente contra los virus isométricos y contra los micoplasmas (Quak, 1977). El hecho de que el tratamiento por calor sea a veces ineficaz, puede ser debido a que la planta sea demasiado sensible al calor, o a que los virus y micoplasmas no sean afectados por el calor, por razones desconocidas. Se debe elegir una temperatura y tiempo de tratamiento tales que la planta (vástago, rama) sea capaz de sobrevivir, pero que permita la inactivación del virus.

El tratamiento por calor es especialmente eficaz contra virus y micoplasmas que se encuentran en frutales, caña de azúcar y mandioca (Morel, 1964; Quak, 1966, 1977; Kartha y Gamborg, 1975). Este tratamiento resulta muy interesante en el caso de los árboles frutales, donde el cultivo de meristemos es difícil.

En el caso de especies leñosas, en lugar de limpiar toda la planta de virus con el tratamiento térmico, se tratan sólo las yemas axilares. En estos casos, una rama injertada sobre una plántula se toma generalmente después de haber crecido durante 20-40 días (es preferible algunos meses), a una temperatura constante o alternante de 37-38° C; las yemas potencialmente libres de virus, se aislan e injertan sobre un patrón (plántula), libre de virus. Este método suele producir un porcentaje relativamente alto de plantas libres de virus (Fridlund, 1980).

Se pueden obtener vides libres de virus, tratando los vástagos (no los meristemos), *in vitro,* durante 21 días a 35° C (Galzy, 1969a, b); las plantas *in vivo* no podrían tolerar estas condiciones. Walkey y Cooper (1976) demostraron que el virus del mosaico del pepino podía ser eliminado, por calor, de ápices del vástago de *Stellaria media,* cultivados *in vitro.*

Cultivo de meristemos

Historia

Para tener una idea de cómo se utilizó al principio el cultivo de meristemos, para conseguir plantas libres de virus, es esencial tener una visión panorámica de la historia. White (1934a) demostró que el virus del mosaico de tabaco (TMV) se distribuía de forma desigual, por las diferentes zonas de la raíz del tabaco; encontrándose una baja concentración en su extremo y estando el ápice libre de virus. Limasset y Cornuet (1949) propusieron la existencia de un gradiente de virus semejante, en los vástagos de las plantas de tabaco, estando el meristemo libre de virus. Más tarde se confirmó de forma concluyente, que tanto los ápices de la raíz como los meristemos del vástago no estaban siempre libres de virus. En 1952, Morel y Martín tuvieron la brillante idea de aislar *in vitro* los meristemos apicales de dalias infectadas con el virus, y a partir de aquellos pudieron obtener plantas libres de virus. Fueron los primeros en obtener dalias y patatas libres de virus con la ayuda del cultivo de meristemos (Fig. 19.2).

Después del descubrimiento de Morel, muchas publicaciones resaltaron su importancia. Aunque el cultivo de meristemos se utiliza sobre todo en horticultura, también existen algunos cultivos extensivos para los que es importante: Patata, *Trifolium, Lolium,* tabaco (Conger, 1981). También se han obtenido plantas libres de virus, de algunas especies leñosas, utilizando cultivo de meristemos: Cerezo, frambueso, grosellero, forsythia y vid.

Como resultado de todos estos descubrimientos se planteó la pregunta lógica, de por qué el virus se encontraba distribuido de una forma desigual en la planta, y de cómo este hecho podría ser utilizado, con la ayuda del cultivo de tejidos, para obtener plantas libres de virus; aunque en algunas especies (Quak, 1977) se encontraron algunas partículas víricas en los meristemos. Quak (1966) piensa que existe competencia en el meristemo, entre la producción de partículas víricas por un lado, y la producción celular por otro; en el tejido meristemático, durante la división celular, la capacidad para la síntesis de ácido nucleico se utiliza para la producción de células, con detrimento de la multiplicación del virus; en las células por debajo del meristemo, que están aumentando de tamaño, más que dividiéndose, la multiplicación de los virus tiene lugar sin que se

Figura 19.2 Meristemo de una planta de patata, mostrando dos primordios foliares. Fotografía del Instituto de Investigación Fitopatológica (IPO), Wageningen

le "preste atención". De forma alternativa, Quak (1966) propuso que la falta de elementos vasculares en el meristemo dificulta en gran manera el transporte de las partículas víricas. La posible ausencia de plasmodesmos en el meristemo y la ausencia de elementos vasculares, es, para muchos, una explicación muy posible de por qué la concentración de virus es tan baja en los meristemos.

En los años 50 se pensó (Quak, 1977) que la concentración, posiblemente alta, de auxina y citokinina en las células en división (meristemáticas) debería dificultar la penetración de las partículas víricas, o que éstas serían inactivadas por los reguladores; esta teoría no ha sido nunca suficientemente razonada. Mellor y Stace-Smith (1969) propusieron que para la multiplicación de los virus, se necesitaban algunas enzimas que no estaban presentes en el tejido meristemático; esta teoría tampoco ha sido demostrada. Martin-Tanguy *et al.* (1976) propusieron que la baja concentración de los virus en los meristemos se debe a la presencia de inhibidores naturales; estos inhibidores explicarían por qué las semillas, producto de la reproducción sexual, frecuentemente se encuentran libres de virus; esta hipótesis no ha sido aún probada. Como se ve, la explicación definitiva de la producción de plantas libres de virus, por cultivo de meristemos, no está todavía a nuestro alcance.

Realización

Es aconsejable utilizar vástagos en crecimiento, siempre que sea posible,

cuando se vaya a hacer cultivo de meristemos (Fig. 19.3); cuando el meristemo que se va a aislar está activo (compuesto de una zona meristemática y una subapical que crecen rápidamente), la posibilidad de eliminar el virus es mayor.

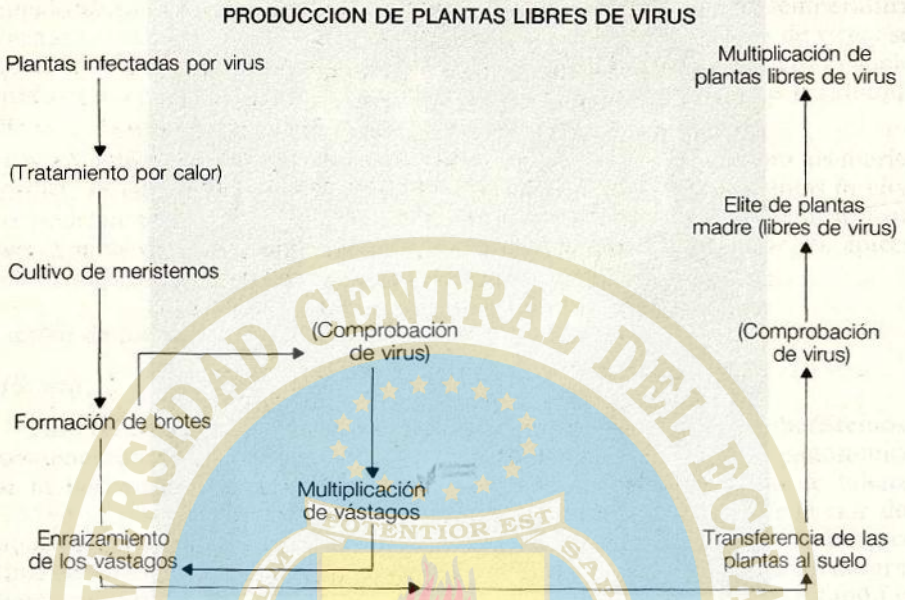


Figura 19.3 Representación esquemática de los diferentes pasos que tienen lugar durante la obtención de plantas libres de virus

Los vástagos se deben limpiar cuidadosamente, de forma previa. Se retiran las hojas del vástago, siempre que sea posible, y entonces los vástagos (o yemas, si no se han retirado las hojas) se sumergen durante un momento en alcohol de 70% para eliminar el aire que pueda haber atrapado. Después de esto se realiza la esterilización en una lejía diluida o $Ca(OCl)_2$, aclarando finalmente con agua estéril. Se retiran entonces algunas hojas, trabajando con la ayuda de un estereomicroscopio (aumento de 20-40×). Se continúa el proceso de esterilización, utilizando concentraciones más bajas de lejía, o con tiempos más cortos de esterilización, aclarando posteriormente con agua estéril. En algunos laboratorios, se usa alcohol de 70% (v/v) para la segunda esterilización, no haciéndose en este caso ningún aclarado más. Si se emplea agua para el aclarado, es posible que las gotas dificulten el aislamiento (reflexión de luz, visibilidad escasa). Se retiran entonces uno por uno los primordios foliares y hojas restantes, trabajando con la ayuda del estereomicroscopio, y utilizando frecuentemente en esta operación agujas o fragmentos de cuchilla de afeitar, montados sobre el mango de una aguja de siembra. El ápice del vástago se mantiene firmemente con una mano (pinzas o dedos limpios), mientras que la operación se realiza con la otra mano. La aguja se debe esterilizar de forma regular durante el proceso. Cuando el meristemo se encuentra prácticamente libre, junto con uno o dos primordios foliares (generalmente un pequeño cubo de material), se corta usando una cuchilla de afeitar, y se siembra inmediata-

mente (para evitar que se seque), sobre un medio nutritivo. Para impedir la deshidratación del meristemo, se debería emplear una luz fría, para iluminar el campo en el que se trabaja con el estereomicroscopio. El meristemo con los primordios foliares es muy pequeño (0,1 mm de diámetro; 0,2-0,4 mm de longitud).

Existe una mayor posibilidad de obtener plantas libres de virus, si sólo se aisla el meristemo; la posibilidad de que un meristemo sobreviva sin primordios foliares, es muy pequeña, como se ha demostrado en el caso del clavel (Morel, 1964; Stone, 1963). Por otro lado, el aislamiento de meristemos más grandes (con más primordios foliares), hace que la posibilidad de obtener plantas libres de virus sea muy pequeña (Kartha y Gamborg, 1975).

Aunque en principio todos los meristemos del vástago de una planta son adecuados como material inicial, en realidad, la posibilidad de éxito depende del tipo de yema o vástago (terminal o axilar) y/o de la posición de la yema (basal o terminal) (Styer y Chin, 1983).

El porcentaje de plantas libres de virus, puede depender también mucho de la estación, como fue demostrado por Van Os (1964) en clavel. Para estar seguros de obtener una buena formación de raíces en los vástagos, a veces se recomienda aislar los meristemos en una estación particular; los vástagos de patata (Mellor y Stace-Smith, 1969), así como los de clavel (Stone, 1963), enraizan mejor cuando el meristemo se aisla en primavera.

La composición del medio nutritivo es compleja, ya que un meristemo es una porción mínima de la planta. Cada especie vegetal diferente, e incluso distintas variedades de una misma especie pueden requerir un medio diferente. El medio de aislamiento no es generalmente el mismo que el de enraizamiento. Debido a que la elección del medio adecuado (si no existe bibliografía disponible) requiere un gran esfuerzo, el cultivo de meristemos debería ser utilizado exclusivamente cuando un clon está completamente infectado y cuando el tratamiento por calor no produce el efecto deseado. Es muy importante, cuando se va a elegir un medio nutritivo, utilizar la experiencia de otros autores, que se pueda encontrar en la bibliografía (Pierik, 1979; Bhojwani *et al.*, 1986).

Los meristemos se aislan generalmente sobre medios sólidos, aunque en algunos casos se utilizan medios líquidos (empleando puentes de papel). El pH por lo general se sitúa entre 5,4 y 6,0, siendo la sacarosa el azúcar habitual (2-5% p/v). Frecuentemente se utilizan las siguientes vitaminas: Vitamina B_1, piridoxina, ácido nicotínico, ácido pantoténico (Styer y Chin, 1983). Los reguladores suelen utilizarse en bajas concentraciones (0,1-0,5 mg l^{-1}); la auxina puede ser necesaria para la formación de raíces, auxinas y citokininas para estimular la división celular; el GA_3 se añade a veces para lograr la elongación del vástago (Morel, 1964). En algunas ocasiones, como con *Pelargonium*, la citokinina no se añade directamente después del aislamiento, sino algo después, ya que puede producir la formación de un color marrón (Debergh y Maene, 1977).

La temperatura normal de crecimiento es 21-25°C; aunque la mayor parte de las plantas bulbosas requieren una temperatura más baja. Temperaturas más altas (35-38°C) se utilizan solamente (generalmente alternando la alta con una baja temperatura), para inactivar virus (Walkey, 1980). Los meristemos se cultivan generalmente con luz fluorescente (longitud del día de 14-16 horas,

irradiancia alrededor de 8-12 W m^{-2}); a veces la luz fluorescente se suplementa con algo de luz roja (Styer y Chin, 1983). En ocasiones es necesario utilizar una irradiancia más baja, durante los primeros días después del aislamiento (Debergh y Maene, 1977).

A veces puede surgir el problema de que el meristemo produce un buen vástago, pero sin raíces. Morel (1964) resolvió este problema, en dalias, injertando el vástago libre de virus, obtenido *in vitro*, sobre una plántula libre de virus. Cuando la planta se hace mayor, es posible obtener esquejes sin problemas. En el caso de que no se tenga más que un vástago libre de virus, es posible estimular el desarrollo de yemas laterales, de manera que se puedan obtener así más vástagos libres de virus.

El porcentaje de meristemos aislados, que llegan a convertirse en plantas libres de virus varía, pero generalmente es muy pequeño. El bajo porcentaje de éxito es consecuencia de pérdidas debidas a infección, otros daños, desecación y necrosis; la muerte o un fallo inicial en el arranque del cultivo pueden también ser achacados a la utilización de un medio nutritivo incorrecto y a problemas relacionados con la dormición. Si al final se obtienen plantas, es necesario aún comprobar que se encuentran libres de virus. Una planta libre de virus puede producir un clon libre de virus solamente si las plantas pueden ser propagadas vegetativamente de forma rápida. La producción masiva de plantas libres de virus depende completamente de la existencia de métodos de multiplicación vegetativa.

Tratamiento por calor y cultivo de meristemos

Para aumentar las posibilidades de obtener plantas libres de virus en los casos difíciles (especialmente cuando hay más de un virus presente), se da con frecuencia un tratamiento por calor (Fig. 19.3), al principio del cultivo de me-

Figura 19.4 Una plántula producida en un tubo de ensayo, a partir de un meristemo de patata, es transferida posteriormente al suelo. Fotografía del Instituto de Investigación Fitopatológica (IPO), Wageningen

ristemos; así se puede disminuir la concentración de virus y/o aumentar la zona libre de virus. La duración del tratamiento por calor (35-38°C) puede ser entre 5 y 10 semanas (Quak, 1977). Este procedimiento ha sido utilizado con éxito en patatas (Fig. 19.4), crisantemo, clavel y fresa. Morel (1964) aconsejó que se almacenasen los tubérculos de patata, a 37-38°C, durante un mes, antes de iniciar el cultivo de meristemos.

Formación de vástagos adventicios, seguida de cultivo de meristemos

En 1962 Brierley (ver Morel, 1964), describió la formación de bulbos adventicios, libres de virus, sobre brácteas de *Lilium longiflorum*. Hildebrandt (1971) llegó a la misma conclusión con gladiolos. También la regeneración de embriones, a partir de tejido nucelar de *Citrus*, generalmente producía plantas libres de virus (Button y Bornman, 1971a, b y c; Bitters *et al.*, 1972). Walkey *et al.* (1974) demostraron que los meristemos de yema floral de coliflor eran capaces de regenerar, de forma vegetativa, plantas libres de virus *in vitro*. Mori *et al.* (1982) demostraron que los vástagos adventicios, obtenidos *in vitro* a partir de explantos foliares de tabaco infectados con TMV (virus del mosaico del tabaco), estaban libres de virus. El mismo resultado se obtuvo con el desarrollo de vástagos adventicios de vid (Barlass *et al.*, 1982).

La obtención de plantas libres de virus, por el método de los vástagos adventicios *in vitro*, ha tenido éxito con azucena (Allen, 1974; Asjes *et al.*, 1974), y también con jacinto. Los explantos de bráctea de azucena, infectados con virus, regeneran bulbillos *in vitro*; cuando el tamaño de los meristemos es de alrededor de 1 mm se transfieren a otro medio para su posterior desarrollo. Hakkaart *et al.* (1983), indicaron que utilizando el método de vástagos adventicios, combinado con el del cultivo de meristemos, se podían producir plantas de *Kalanchoë* "Yucatan", libres de síntomas de virus.

El método de los vástagos adventicios, se utiliza de diferente forma, para obtener plantas libres de virus, con algunas otras especies como petunia, tabaco y col. En estas plantas se puede ver cómo algunas áreas de sus hojas se encuentran libres de virus, mientras que la planta como conjunto se encuentra infectada. Se obtuvieron plantas libres de virus aislando áreas no infectadas y regenerando a partir de ellas vástagos adventicios (Murakishi y Carlson, 1979).

Si el método de vástagos adventicios se utiliza con plantas que presentan quimeras, como el *Pelargonium* variegado, esta forma variegada se pierde, ya que la formación de vástagos adventicios generalmente tiene lugar a partir de una única célula (o capa de células) (Cassells *et al.*, 1980).

Plantas libres de virus obtenidas a partir de callos y protoplastos

En 1962 Cooper (ver Hildebrandt, 1977) demostró que después de unos cuantos repicados, los callos de tabaco pueden quedar libres de virus; aparentemente los callos pueden escapar a la infección vírica; las células meristemáticas, activas y jóvenes, son mucho más resistentes al TMV que las células más viejas e inactivas. Los resultados de la investigación de Cooper, fueron más tarde corroborados por Chandra y Hildebrandt (1967). Abo-El-Nil y Hildebrandt (1971) aislaron anteras de *Pelargonium*, y obtuvieron de ellas callos y plántulas que resultaron libres de virus; el mismo resultado se consiguió con callo de

SIB-UCE

patata que se infectó con el virus X de la patata. Walkey (1978) afirmó que se podía liberar de virus el callo de *Nicotiana rustica,* con un tratamiento por calor.

Mori *et al.* (1982) aislaron protoplastos de hojas de tabaco infectadas con TMV; a partir de esos protoplastos regeneraron plantas libres de virus. También se obtuvieron plantas libres de virus, a partir de protoplastos aislados de las zonas verde oscuras, con pocas o ninguna partícula vírica, de hojas de tabaco infectadas con TMV.

Sin embargo, es poco realista pensar que la producción de plantas libres de virus, por medio de callos y protoplastos, pueda tener importancia práctica, ya que en este tipo de cultivos las mutaciones son muy frecuentes.

Injerto de meristemos sobre patrones (plántulas), libres de virus (micro-injerto)

En el caso de que un meristemo no crezca, o un vástago obtenido por cultivo de meristemos no sea capaz de formar raíces, es posible injertar el meristemo sobre un patrón (plántula) libre de virus, que se cultiva o multiplica *in vitro*. El micro-injerto resulta de gran importancia en el caso de especies leñosas, ya que en este grupo el cultivo de meristemos es frecuentemente imposible. El concepto de micro-injerto nace a partir del trabajo de Morel y Martin (1952) con dalias. Los primeros micro-injertos con éxito fueron llevados a cabo por Murashige *et al.* (1972) y por Navarro *et al.* (1975), que, trabajando con *Citrus*, consiguió eliminar dos virus.

Una revisión del micro-injerto en *Citrus* ha sido hecha por Litz *et al.* en 1985. Posteriormente se utilizaron otras plantas como albaricoque y vid (Anónimo, 1978a), *Eucalyptus* (Damiano *et al.*, 1986), *Camellia japonica* (Creze, 1985), melocotón (Mosella, 1979; Mosella *et al.*, 1979), manzano (Huang y Millikan, 1980). En el caso del albaricoquero y la vid, antes del micro-injerto se realizó un tratamiento por calor. Jonard *et al.* (1983), y Kartha (1986), han valorado las posibilidades del micro-injerto en frutales. Para tener una visión amplia sobre los fenómenos de incompatibilidad que tienen lugar durante el micro-injerto, recomendamos leer el artículo de revisión de Jonard (1986).

Identificación de los virus

No se puede determinar de forma visual si una planta está libre de virus (libre de los virus conocidos), ya que existen muchas infecciones víricas latentes. Por estas razones se deben realizar pruebas sobre las plantas potencialmente libres de virus. Estas pruebas pueden hacerse de las formas que a continuación se indica (Hakkaart *et al.*, 1980; Reuther y Sonneborn, 1981; Maat, 1980; Maat y Schuring, 1981):

1. *Plantas testigo*. Se hace un frotis con savia de la planta que se quiere probar, sobre una planta testigo, previamente tratada con polvo de carborundo. Si el virus se encuentra en la savia, después de algunos días la planta testigo comienza a mostrar los síntomas característicos. Las plantas testigo más importantes son: *Chenopodium amaranticolor, Chenopodium quinoa, Gomphrena globosa* y muchas especies diferentes de tabaco. Los inconvenientes de este tipo de ensayos son que requieren una cierta cantidad de tiempo y amplias instalaciones de cultivo.

2. *Microscopía electrónica.* En la práctica se ha utilizado poco este método, que resulta caro; existiendo escasos laboratorios que posean los equipos y material necesarios.

3. *Serología.* Si se inocula un conejo con receptores proteicos, como un virus vegetal, se forman anticuerpos específicos. Si se añade una gota de savia vegetal centrifugada, a una gota de antisuero de la sangre del conejo, se producirá precipitación, siempre que el virus esté presente. Teniendo en cuenta este fenómeno se han desarrollado métodos serológicos, que a veces son de extremada sensibilidad. Uno de ellos es el denominado como ELISA, (ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas, enzyme-linked immunosorbent assay). En Kartha (1986) y Long y Casells (1986), se pueden encontrar más detalles sobre la utilización de métodos serológicos.

Producción de plantas libres de hongos y de bacterias por cultivo de meristemos

Se pueden obtener también plantas libres de hongos y de bacterias por el cultivo de meristemos (Lamotte y Lersten, 1972; Tramier, 1965). Los géneros más importantes de bacterias que se pueden eliminar son: *Erwinia, Pseudomonas, Xanthomonas* y *Bacillus.* Los géneros más importantes de hongos son: *Fusarium, Verticillium, Phialophora* y *Rhizoctonia.* Se puede utilizar un medio rico en nutrientes, en algunas ocasiones conteniendo peptona, triptona y extracto de levadura, para determinar de una forma rápida si una planta está libre o no de bacterias y hongos.

Figura 19.5 Meristemo apical de clavel, conteniendo dos primordios foliares, aislado *in vitro*, para obtener plantas libres de enfermedades. Fotografía del Instituto de Investigación Fitopatológica (IPO), Wageningen

El primer trabajo de investigación (Baker y Philips, 1962), sobre producción de plantas libres de hongos, por medio del cultivo de meristemos, se centró en el clavel (Fig. 19.5), del cual se eliminó *Fusarium roseum f. cerealis*. Los gladiolos son atacados frecuentemente por *Fusarium oxysporum f. gladioli* que es muy difícil de combatir. Como resultado de los ataques fúngicos, en Francia, se han perdido ya casi completamente, muchos cultivares de gladiolo. Tramier (1965) obtuvo con éxito, por medio de cultivo de meristemos, plantas no infectadas, que luego se multiplicaban en zonas donde no se encontraba el hongo.

En 1977 Rudelle demostró que en el caso del clavel, se podían eliminar, por medio del cultivo de meristemos, dos especies de hongos (*Fusarium oxysporum f. dianthi y Phialophora cinerescens*) y dos especies de bacterias (*Pseudomonas carophylli* y *Pectobacterium parthenii*). Theiler, en 1981, obtuvo plantas de *Pelargonium* libres de bacterias, a partir de material inicialmente infectado con *Xanthomonas pelargonii*. El cultivo de meristemos ha tenido éxito también en el grupo de híbridos de *Begonia elatior*, para eliminar la bacteria *Xanthomonas begoniae* (Hannings y Langhans, 1974; Reuther, 1978; Moncousin 1979; Theiler, 1981); y en la fresa para eliminar a *Phytophthora fragariae* (Seemuller y Merckle, 1984).

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

20
PROPAGACION VEGETATIVA

Introducción general

En principio las plantas se pueden multiplicar de dos maneras: Vegetativamente (de forma asexual, también llamada clonado), y de forma generativa (sexualmente, por semillas). Los dos tipos de propagación pueden ser imposibles en determinadas condiciones. Cuando la multiplicación sexual no es satisfactoria (no se forman semillas, o se forman muy pocas, las semillas pierden rápidamente su capacidad germinativa), se suele buscar la multiplicación vegetativa. La multiplicación sexual puede también ser poco conveniente cuando la descendencia obtenida es (muy) heterogénea, al ser fuertemente heterocigota.

La multiplicación vegetativa *in vivo* (por esqueje, división, acodo, acodo alto y distintos tipos de injerto), ha jugado durante muchos años un importante papel en la agricultura; por ejemplo en el caso de las patatas, manzanas, peras, muchos bulbos ornamentales y plantas tuberosas, cultivos leñosos, claveles, crisantemos, etc. La reproducción vegetativa es también muy importante en la mejora vegetal: Las líneas parentales tienen que ser mantenidas y propagadas de forma vegetativa para la producción de semillas; el clonado es frecuentemente necesario al establecer bancos de genes, la formación de vástagos adventicios es necesaria para obtener suficiente cantidad de mutantes, después de la inducción de la mutación.

Los métodos clásicos de la reproducción *in vivo* o bien son insuficientes para las necesidades reales (demasiado lentos, difíciles o caros) o a veces son completamente inviables. En los últimos 10 años, desde que se descubrió que las plantas pueden ser clonadas más rápidamente *in vitro* que *in vivo*, los conocimientos acerca de la propagación vegetativa *in vitro* han crecido muy rápidamente. Siendo esto cierto, tanto para las plantas de las regiones templadas, como para las de las regiones subtropicales y tropicales. En la actualidad algunas especies que no son susceptibles de clonado *in vivo*, pueden ser clonadas por medio de técnicas *in vitro*.

En este capítulo se da una panorámica de los diferentes métodos de propagación vegetativa *in vitro*: Esquejes de segmentos nodales, ramas axilares, re-

generación de órganos adventicios (raíces o vástagos) sobre explantos (Fig. 20.1), formación de órganos adventicios y embriogénesis somática sobre callo, y regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares y protoplastos. Algunos casos particulares de multiplicación vegetativa como el clonado de orquídeas y el micro-injerto, no se tratan en este capítulo, ya que se hace con más detalle en otros.

Figura 20.1 Regeneración de bulbillos adventicios sobre las bases de explantos de catafilos de bulbos de jacinto. La aplicación de este método puede acelerar el proceso de propagación vegetativa (Pierik y Woets, 1971). Fotografía tomada 12 semanas después del aislamiento

Para multiplicar plantas *in vitro* por formación de órganos o embriones adventicios, en principio es necesario que aquellos sean capaces de regeneración. La capacidad de regeneración viene determinada por el genotipo, las condiciones ambientales (suministro de nutrientes, reguladores y condiciones físicas), y el estado de desarrollo de la planta. Es bien sabido que algunas familias y géneros tienen una alta capacidad de regeneración: Solanáceas (*Solanum, Nicotiana, Petunia, Datura* y *Lycopersicon*), Crucíferas (*Lunaria, Brassica, Arabidopsis*), Gesneriaceas (*Achimenes, Saintpaulia, Streptocarpus*), Compuestas (*Cichorium, Lactuca, Chrysanthemum*), Liliáceas (*Lilium, Haworthia, Allium, Ornithogalum*). En los capítulos 6 y 13 se indicó la importancia de los factores ambientales en la regeneración de las plantas. El estado de desarrollo del material inicial (capítulo 12), es el siguiente factor por orden de importancia: las plantas juveniles tienen una mayor capacidad de regeneración que las adultas. Debido a que las plantas que se usan generalmente para la multiplicación vegetativa son adultas, se debería intentar antes de su uso, sobre todo en las especies leñosas, una juvenilización. Esta puede ser conseguida a veces por: Cultivo de meristemos; la obtención de esquejes a partir de otros esquejes (este méto-

do también se usa *in vivo*); el injerto de un meristemo o ápice del vástago sobre un patrón (plántula); el aislamiento a partir de zonas que son aún juveniles; una poda severa, que estimule la producción de vástagos juveniles laterales. Aunque la formación de embriones y vástagos adventicios frecuentemente produce también juvenilización, estos métodos son poco útiles, ya que se pueden producir mutaciones. El rejuvenecimiento por medio del cultivo de meristemos, a pesar de las dificultades que entraña, es todavía la técnica más utilizada, ya que: Mantiene la estabilidad genética, elimina los hongos y bacterias y puede suponer a veces la ventaja adicional de producir un material libre de virus.

Si se encuentran problemas, cuando se usa material vegetal adulto, para la reproducción vegetativa *in vitro*, se puede desarrollar un modelo utilizando plántulas (material juvenil) (Fig. 20.2). Las semillas se esterilizan y se siembran *in vitro*, y las plántulas obtenidas (generalmente heterogéneas desde el punto de vista genético), se utilizan *in vitro* para la formación de órganos (vástagos axilares o adventicios). Utilizando toda la información obtenida de esta forma, es posible intentar la propagación *in vitro* usando material tomado de plantas adultas seleccionadas. Esto ha sido llevado a cabo con éxito con *Anthurium andreanum* (Pierik, 1976a).

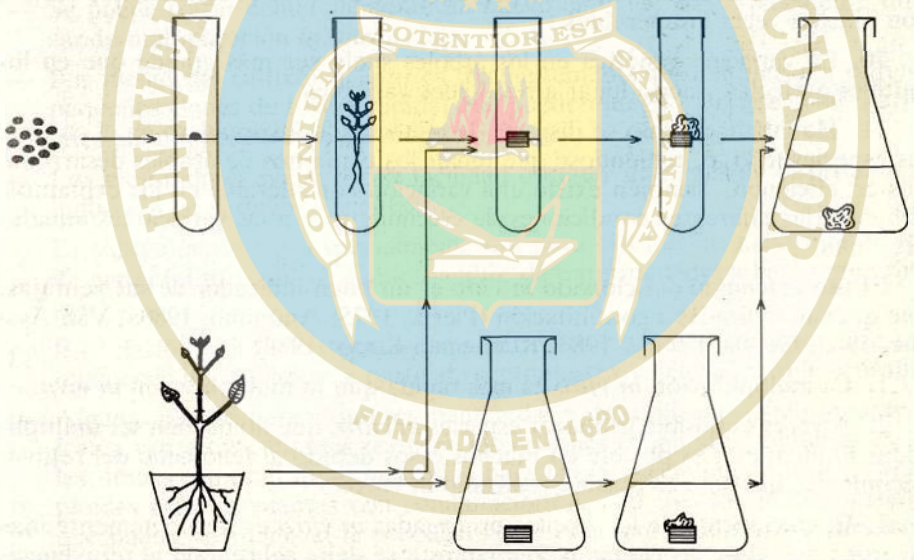


Figura 20.2 Material inicial juvenil (semillas), para la iniciación de un cultivo de callos. En la parte superior izquierda una semilla esterilizada es aislada *in vitro*, originándose una plántula. Esta se puede obtener también sembrando las semillas en una maceta (abajo a la izquierda). Posteriormente se aislan explantos, sobre un medio sólido (arriba), o sobre un medio líquido (abajo). Cuando tiene lugar la inducción del callo, éste es repicado en un matraz Erlenmeyer (línea superior, a la derecha)

Una de las diferencias más notables, entre las especies herbáceas y leñosas, es que estas últimas son mucho más difíciles de clonar *in vitro*. Las razones para que esto ocurra son (Kunneman-Kooij, 1984; Pierik, 1975; Bonga y Durzan, 1982):

1. Las especies leñosas tienen una capacidad regenerativa relativamente débil, si se comparan con las especies herbáceas.

2. La investigación con árboles y arbustos se inició más tarde.

3. La inducción del rejuvenecimiento es por lo general extremadamente difícil en las especies leñosas.

4. La velocidad de multiplicación es mucho más baja en las especies leñosas que en las herbáceas.

5. La dormición juega un papel en el caso de árboles y arbustos, ya que las yemas pueden no abrirse y no tiene lugar el alargamiento de los tallos.

6. La topófisis juega un papel más importante en las especies leñosas.

7. Las especies leñosas son más propensas a ser afectadas por la excreción de sustancias tóxicas en los medios nutritivos.

8. La esterilización es más difícil en las especies leñosas, que generalmente crecen en el exterior.

9. Los árboles y arbustos por lo general sólo pueden ser seleccionados para el clonado, cuando son adultos. Debido a que el material adulto es normalmente muy difícil, si no imposible de propagar *in vitro*, los problemas que surgen son muchas veces insuperables.

10. La variación genética en los árboles suele ser más grande que en los cultivos agrícolas, dando lugar a resultados variables.

11. Habitualmente no se dispone de material de invernadero en el caso de las especies leñosas, teniéndose que tomar los explantos de árboles desarrollados en el campo. También existe una variación considerable en los explantos, debido a las diferentes condiciones de crecimiento y a las variaciones anuales del clima.

El uso extendido del clonado *in vitro* es un buen indicador de sus ventajas, que quedan indicadas a continuación (Pierik, 1975; Anónimo, 1980a; Van Assche, 1983; Gebhard *et al.*, 1983; Kunneman-Kooij, 1984):

1. La multiplicación *in vitro* es más rápida que la multiplicación *in vivo*.

2. A veces es posible propagar especies *in vitro*, que no pueden ser multiplicadas *in vivo*; esto es posible en muchos casos debido al fenómeno del rejuvenecimiento, que sólo es posible realizarlo *in vitro*.

3. El crecimiento de las plantas propagadas *in vitro* es frecuentemente más vigoroso que el de las clonadas *in vivo*; esto se debe sobre todo al rejuvenecimiento y/o al hecho de que las plantas *in vitro* se encuentran libres de enfermedades. Cameron y otros (1986) demostraron que la mayor productividad y vigor de las plantas de fresa micropropagadas estaban relacionados con sus propiedades de intercambio gaseoso.

4. Utilizando el cultivo *in vitro* es posible, en principio, conseguir una multiplicación libre de enfermedades, bien por una rigurosa selección del material inicial , o bien liberando el material inicial de enfermedades. También resulta posible el transporte de plantas libres de enfermedades, en las condiciones *in vitro* (sin suelo).

5. Ya que se necesita una cantidad de material relativamente pequeña para iniciar un cultivo *in vitro*, se puede realizar una cuidadosa selección del mismo antes de iniciar el cultivo. La pronta iniciación de ensayos de campo permite en cualquier caso una posterior selección.

6. La propagación *in vitro* puede suponer elevados ahorros en combustible, espacio de invernadero, etc. El área que se necesita para el cultivo de portainjertos y lechos de multiplicación queda disminuida en el caso de cultivo *in vitro*.

7. Debido a la existencia de condiciones perfectamente controladas (medio nutritivo y medio físico), que permiten una gran precisión en el calendario de la producción de esquejes, se puede eliminar el efecto estacional y conseguir una producción homogénea a lo largo del año.

8. La propagación *in vitro* implica que las plantas son cultivadas con su propio sistema radical, haciendo, por tanto, innecesario el injertado, y ahorrando una gran cantidad de trabajo. Esto resulta especialmente importante en especies como el rododendro, la rosa y el lilo.

9. Para el mejorador profesional se encuentran además las siguientes ventajas adicionales:

— Se puede lanzar comercialmente un nuevo cultivar, más rápidamente utilizando multiplicación *in vitro*.

— Por medio del cultivo *in vitro* es frecuentemente posible llegar a obtener pequeños clones de forma rápida, que pueden luego utilizarse como parentales para la producción de híbridos (F_1).

— Los mejoradores pueden con facilidad obtener mutantes en el proceso de inducción de vástagos adventicios.

— El cultivo *in vitro* es especialmente útil para el establecimiento de bancos de genes (el material se almacena libre de enfermedades a baja temperatura).

— En relación con la manipulación genética (hibridación somática, etc.), la regeneración de plantas a partir de protoplastos y células es indispensable.

— Algunas plantas tienen que ser mantenidas y multiplicadas forzosamente de forma vegetativa: Plantas sexualmente estériles (haploides, mutantes estériles, líneas con esterilidad masculina para la producción de híbridos), aneuploides raros, o plantas con combinaciones poco usuales de cromosomas, que pueden perderse si la propagación se hace por semillas, y combinaciones génicas heterocigóticas específicas (Dale y Webb, 1985).

No cabe duda que en algunas ocasiones el clonado *in vitro* puede tener desventajas:

1. En algunos sistemas de propagación *in vitro* la estabilidad genética es débil. Este tema se discute con más detalle en el capítulo 21.

2. Las plantas producidas *in vitro* pueden mostrar características poco convenientes *in vivo*: Excesiva producción de ramas laterales y paso total a la fase juvenil.

3. En el caso de las plantas leñosas especialmente, la inducción de raíces es con frecuencia muy difícil. En otras ocasiones las raíces formadas *in vitro* pueden resultar no funcionales y necesitar ser reemplazadas *in vivo* por nuevas raíces adaptadas al suelo.

4. La transferencia de las plantas desde el tubo de ensayo al suelo es muy difícil de conseguir. Este tema quedó discutido extensamente en el capítulo 14.

5. Cuando las plantas, que deberán ser cultivadas en el exterior, han sido clonadas *in vitro* y después trasplantadas al suelo, existe el peligro de que el clon muera por la acción de patógenos, tan pronto como surja una nueva cepa de micro-organismos, a la que la planta no sea inmune. En el caso de plantas tropicales como la palmera de aceite, se obtienen plantaciones a las que se denomina multi-clonales, para evitar este problema. En los cultivos protegidos se debe procurar un control intensivo de las enfermedades para evitar un desastre en las plantas objeto de nuestro cuidado.

6. Se puede perder la capacidad de regeneración por cultivos de callos o de células en suspensión, repetidos.

7. En algunos casos el aislamiento estéril es extremadamente difícil de realizar.

8. El clonado *in vitro* exige una aportación de mano de obra importante, lo que redunda en precios relativamente altos para las plantas que se producen de esta forma (Smith, 1986). La utilización de técnicas especiales (cultivo por fermentación), que pueden ahorrar mano de obra, se encuentra todavía en un estadio experimental (Takayama *et al.*, 1986).

Después de hacer una lista de las ventajas y desventajas del clonado *in vitro*, quizá sea el momento de indicar cuáles son los criterios deseables para conseguir el éxito:

1. Estabilidad genética (ausencia de mutaciones).

2. Selección cuidadosa para conseguir que el material de partida esté libre de enfermedades, además de conseguir que en la multiplicación se mantenga esa situación.

3. La transferencia desde el tubo de ensayo al suelo no debería ser demasiado difícil.

4. La capacidad de regeneración no debería perderse.

5. La propagación *in vitro* no debe ser demasiado complicada, de otro modo este método acabará siendo rechazado.

6. Debe ser económicamente viable.

Resulta difícil estimar la viabilidad económica de la multiplicación comercial *in vitro*. Hasta el momento, De Fossard, (1977), Jacob *et al.* (1980), Van Assche (1983), Kyte (1983), y Sluis y Walker (1985), son los primeros autores, que han arrojado algo de luz sobre este tema. El desarrollo de grandes laboratorios comerciales de cultivo de tejidos, en Europa Occidental y en EE UU indica que los problemas económicos y comerciales no son insuperables.

Antes de discutir sobre las diferentes maneras posibles de reproducción vegetativa *in vitro*, es necesario explicar las diferentes fases del proceso (Murashige, 1974; Debergh y Maene, 1981):

Fase 0: Se refiere a lo que ocurre antes de que el cultivo *in vitro* comience: El pre-tratamiento correcto del material inicial, manteniendo las plantas, en la medida de lo posible, libres de enfermedades (ausencia de insectos en los invernaderos, agua exclusivamente en las macetas, mantenimiento de las plantas relativamente secas, buena prevención de enfermedades, etc.).

Fase 1: En ella se realiza el aislamiento estéril de los meristemos, ápices del vástago, explantos, etc. En el caso de existir infecciones internas, se precisan técnicas especiales (ver capítulos 9 y 19). En esta fase se requiere sólo una condición importante: Llevar a cabo un crecimiento y desarrollo sin contaminación.

Fase 2: Es la fase de multiplicación. El primer objetivo en ella es conseguir la propagación sin perder la estabilidad genética. La propagación se puede llevar a cabo de diferentes formas, que se discuten con detalle más adelante en este capítulo (Fig. 20.3).

Figura 20.3 Propagación de vástagos (Fase 2), de *Nidularium fulgens*, en un medio líquido. La propagación de los vástagos se produce por ramificación axilar (Pierik y Steegmans, 1984). Fotografía tomada 12 meses después del aislamiento

Fase 3: Incluye la preparación de los vástagos y plantas, que se obtienen en la fase 2, para ser transferidos al suelo. Esto significa frenado de la formación de vástagos axilares, e iniciación de la elongación del vástago. A continuación se debe inducir la formación de raíces, ya sea *in vitro* o posteriormente *in vivo*.

Fase 4: Comprende la transferencia desde el tubo de ensayo al suelo y el establecimiento de las plántulas. Se dispone de más información sobre este tema en el capítulo 14.

El volumen de bibliografía que se refiere a la propagación vegetativa *in vitro*, ha crecido tanto que cae fuera del alcance de este libro una discusión completa, o el considerar todas las especies estudiadas. Por esta razón sólo se pretende establecer los principios generales, y para una información más detallada, acerca de una especie concreta, se debería consultar la bibliografía indicada por Pierik (1979) y los siguientes manuales: George y Sherrington (1985), Bhojwani *et al.* (1986) y Bajaj (1986, 1986a). Se dan más detalles sobre los sistemas de propagación que han resultado populares en la práctica y satisfactorios, en relación a los que producen pobres resultados (como cultivos de callos, en suspensión, o de células aisladas). El problema de la (in)estabilidad genética se discute de forma separada en el capítulo 21. La aplicación del micro-injerto *in vitro* ha sido ya considerada en el apartado Injerto de meristemos sobre patrones (plántulas), libres de virus (micro-injerto).

Cultivo de segmentos nodales

Con este nombre se conoce el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Este es el método más natural de propagación vegetativa de las plantas *in vitro*, ya que también puede aplicarse *in vivo*. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *in vitro*, realizándose los repicados cuando son necesarios. Cuando se obtiene un número suficientemente grande de vástagos, éstos son enraizados y finalmente se realiza la transferencia al suelo. El aislamiento de yemas y ápices del vástago (Fig. 20.4), es una técnica, donde en principio no se añaden citokininas para evitar la dominancia apical. Cuando se aplica este método se deberían tener en cuenta los siguientes puntos:

1. El aislamiento por este método es prácticamente imposible cuando se trata de plantas en roseta (como las Bromeliáceas, gerbera, etc.) y cuando las posibilidades de infección son altas. En el caso de plantas en roseta se utiliza el método de los vástagos axilares (apartado *Método de las yemas axilares)*.

2. Para reducir las posibilidades de infección, es mejor aislar yemas cerradas (Anónimo, 1978a). En el caso de que existan infecciones internas, este método es impracticable, siendo necesario acudir al cultivo de meristemos.

3. La velocidad de propagación depende del número de yemas disponibles; si este número es pequeño la velocidad de multiplicación resultará lenta. Cuantas más hojas se inicien, habrá mayor número de yemas disponibles, y, por lo tanto, la propagación será más rápida.

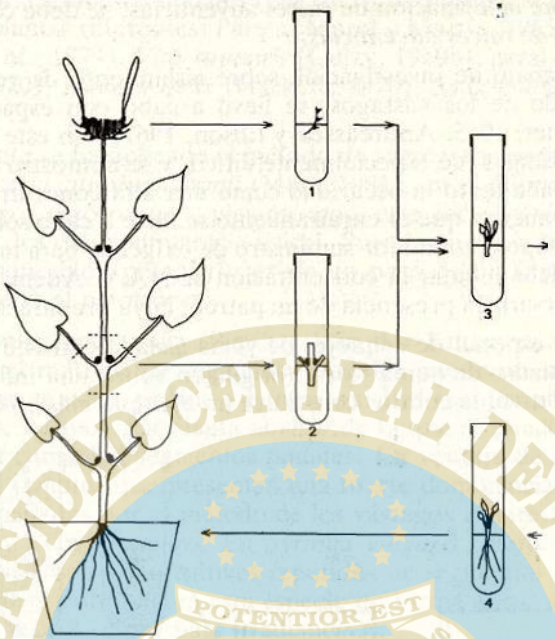


Figura 20.4 Ilustración esquemática de la técnica de propagación vegetativa de explantos nodales. Existen nudos vestigiales en las axilas de las hojas, y en las brácteas involucrales de las inflorescencias, éstos, después de su aislamiento (1,2), originan un vástago (3), que en 4 ha regenerado ya sus raíces. Se pueden aislar aún más nudos, permitiendo el alargamiento del vástago en 3

4. La dormición, especialmente en las plantas leñosas de los climas templados, frecuentemente presenta problemas (Anónimo, 1978a). Para romper la dormición se precisa una buena comprensión de los problemas asociados con la misma o con su ruptura. Como ya se indicó en el capítulo 12, el material inicial, por sí mismo juega un importante papel en este sentido (posición, edad, época del año en que se produce el aislamiento, etc.). Los factores físicos (capítulo 13) son también de gran importancia, por ejemplo la composición del medio nutritivo (capítulo 6). Las formas de romper la dormición después del aislamiento *in vitro,* especialmente en el caso de las plantas leñosas, son: Los tratamientos por baja temperatura (0-5° C), día largo (16 horas de luz por día), y baja temperatura seguida por días largos. En algunos casos las giberelinas y/o citokininas pueden estimular la ruptura de la dormición de las yemas. En muchos casos (especialmente con plantas herbáceas), no se necesita ni frío ni días largos para romper la dormición. La etiolación (causada por la oscuridad o la baja irradiancia) puede producir la ruptura de la dormición de las yemas.

5. Los vástagos juveniles, especialmente en las plantas leñosas, crecen mucho más rápidamente que los vástagos adultos, que por consiguiente necesitan ser rejuvenecidos.

6. Ciertamente no resulta fácil el enraizamiento de vástagos adultos en las plantas leñosas, recomendándose una rejuvenilización inicial. Para una mayor

información sobre la formación de raíces adventicias, se debe consultar el apartado *Formación de raíces adventicias.*

El primer trabajo de investigación sobre aislamiento de yemas y el consiguiente enraizado de los vástagos, se llevó a cabo con espárrago (Galston, 1947, 1948; Gorter, 1965; Andreassen y Elison, 1967). En este caso el enraizamiento de los vástagos fue especialmente difícil, y se demostró que para conseguirlo se necesitaba tanto la oscuridad como una alta concentración de NAA. También se recomienda que el enraizamiento se lleve a cabo sobre medio líquido, ya que esto supone un mejor suministro de oxígeno; para inducir la elongación radical se debe rebajar la concentración de NAA. Además en el caso del espárrago es necesaria la presencia de un patrón, cuya preparación no es fácil.

Un tipo muy especial de esquejes de yema aislada consiste en transformar un primordio aislado, de yema floral (originado sobre una inflorescencia), en un vástago vegetativo; la coliflor constituye un ejemplo clásico de esto (Crisp y Walkey, 1974).

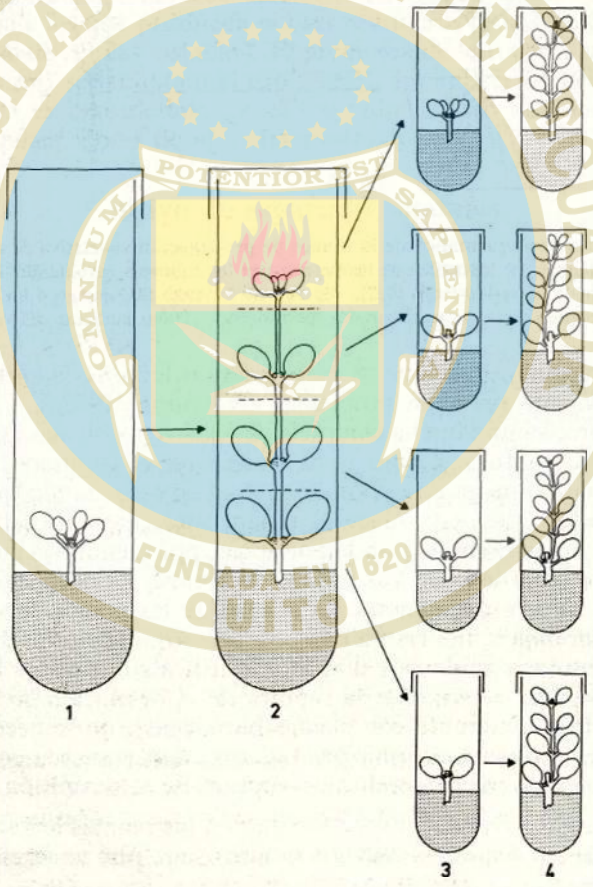


Figura 20.5 Representación esquemática del método de explantos nodales, para la propagación vegetativa de plantas

El método de segmentos nodales (Fig. 20.5) ha producido un éxito apreciable en muchas plantas diferentes: Patata (Morel y Martín, 1955), *Manihot esculenta* (Kartha *et al.*, 1974), *Vitis rupestris* (Galzy, 1969b), peral (Quoirin, 1974), rosa (Elliott, 1970), *Hedera helix* (Hackett, 1970), *Salix babylonica* (Letouzé, 1974), etcétera.

Recientemente se ha aplicado el método de segmentos nodales a *Eucalyptus grandis* y *Araucaria cunninghammii* (Mott, 1981), en el último caso, donde se producen vástagos ortótropos y plagiótropos, este método sólo puede usarse en los primeros, los de crecimiento vertical. Por el contrario en el caso del café (Staritsky, comunicación personal), existe un paso espontáneo desde el crecimiento plagiótropo al ortótropo.

Nuestra propia experiencia (Pierik y Van der Kraan, datos sin publicar), demuestra que el método de segmentos nodales puede ser utilizado también con plantas como tomate, pepino y berenjena: Las semillas aisladas y estériles de estas plantas, forman una planta *in vitro* de la que se puede utilizar el ápice del vástago, así como los segmentos nodales. La ventaja de este método con plantas como el tomate (que presentan una fuerte dominancia apical, y que no pueden ser propagadas por el método de los vástagos axilares), es que permite un clonado muy eficaz *in vitro*. En *Syringa vulgaris* (Pierik *et al.*, 1986), se realizaron también con éxito cultivos repetidos de segmentos nodales. El alargamiento del tallo se obtiene en esta especie de forma eficaz aplicando zeatina (o su ribósido), o 2-iP, y por baja irradiancia.

Método de las yemas axilares

En principio este método es muy similar al de los segmentos nodales; siendo la diferencia más importante el que en este último caso se utilizan casi exclusivamente plantas con tallos largos, y que generalmente no se necesita la citokinina para el desarrollo de las yemas.

Cuando se utiliza el método de las yemas axilares (Fig. 20.7), se aisla un ápice del vástago, a partir del cual se desarrollan las yemas axilares, de las axilas de las hojas, bajo la influencia de una concentración relativamente alta de citokininas. Esta elevada concentración de citokininas frena la dominancia apical y permite el desarrollo de las yemas axilares. Es interesante hacer notar que los principios de este método ya se conocían en 1925: El meristemo apical impide el desarrollo de las yemas axilares, y su eliminación hace que la dominancia desaparezca. Después del descubrimiento de la primera citokinina (kinetina), se pudo ver que la dominancia apical también se podía romper añadiendo citokininas. Si un ápice del vástago contiene varias ramas axilares o laterales, y se siembra sobre un medio conteniendo citokinina, se producen nuevos vástagos axilares. Cuando se produce un número suficiente de vástagos, pueden ser enraizados, y las plántulas obtenidas trasplantadas al suelo.

En la práctica el método de explantos nodales se usa generalmente en combinación con el método de las yemas axilares (Fig. 20.7); se permite a una yema que se desarrolle y posteriormente se añade citokinina para inducir la formación de vástagos axilares.

Las infecciones internas constituyen un problema cuando se utiliza el método de las yemas axilares. Especialmente en el caso de las plantas en roseta, el aislamiento en condiciones estériles es a veces difícil. Por esta razón se aislan ápices del vástago, tan pequeños como sea posible, para tener las máximas posibilidades de conseguir un cultivo estéril. Sin embargo, hay que tener en cuenta que cuanto más pequeño es el ápice aislado, más pequeña es la probabilidad de su establecimiento. Cuando existen infecciones internas el cultivo de meristemos debería ser aplicado previamente. En cualquier caso es aconsejable utilizar un medio nutritivo rico (con peptona o triptona), para comprobar si el ápice del vástago está libre de infecciones internas. Para tener mayor seguridad de que manejamos cultivos estériles, se corta un ápice del vástago de forma longitudinal, y se siembra con su lado plano apoyado sobre un medio nutritivo rico; de esta forma las infecciones internas se expresan de una forma más rápida. El corte longitudinal del ápice puede conducir a la muerte de la planta, de manera que esta prueba no se debería realizar si se dispone de una cantidad limitada de material inicial. Finalmente debemos señalar que la prueba del medio nutritivo rico no produce unos resultados seguros en todas las ocasiones.

A pesar de los problemas del aislamiento de ápices estériles, el método de los vástagos axilares, para las plantas en roseta, se ha convertido en la práctica, y con ventaja, en el método de propagación *in vitro* más importante, por las siguientes razones:

1. El método resulta generalmente más simple que otros métodos de multiplicación.
2. La velocidad de multiplicación es relativamente alta.
3. Generalmente se mantiene la estabilidad genética (ver las excepciones en el capítulo 21).
4. El crecimiento de las plantas obtenidas es muy bueno, quizá debido a la juvenilización y/o a la falta de infecciones.

En la bibliografía se encuentra frecuentemente, especialmente en el caso de los meristemos, pero también en ápices del vástago de plantas adultas, que sufren una juvenilización después de un número de repicados; este proceso es más o menos el mismo que se produce en el método de los "esquejes de esqueje", que se utiliza *in vivo* para producir rejuvenecimiento (parcialmente). El mejor ejemplo de rejuvenecimiento, después del cultivo de meristemos *in vitro*, se encuentra en el caso de las orquídeas (Capítulo 18). Existen importantes indicios (Margara, 1982; Moncousin, 1982) de que el grado de rejuvenecimiento depende del tamaño del meristemo aislado, el número de repicados subsiguientes y la concentración de reguladores en el medio. De igual forma la velocidad de propagación, con el método de los vástagos axilares, no es de ninguna manera constante, sino que depende del número de repicados; cuantos más repicados se hayan llevado a cabo, más rápido es el rejuvenecimiento. Se obtuvo éxito en el proceso de rejuvenecimiento con árboles de 30 años de edad de *Eucalyptus grandis*, después de 12 repicados, llevados a cabo durante el espacio de un año (Brutti y Caso, 1986). Se obtuvieron resultados semejantes con lilos (*Syringa vulgaris*) (Pierik *et al.*, 1986).

El cambio de la forma adulta a la juvenil viene dado por las siguientes características (Moncousin, 1982):

1. Cambio en las características morfológicas (por ejemplo la forma de la hoja).

2. Aumenta el potencial de enraizamiento.

3. Se produce un cambio en la actividad peroxidasa de los ápices del vástago.

4. En *Sequoia sempervirens*, la relación K/Ca en las plantas jóvenes es más alta que en el material adulto; si el material vegetal es rejuvenecido, por medio de una serie de repicados, la relación K/Ca se incrementa (Boulay, 1986).

5. La proporción de IAA/ABA endógeno es más alta en el material juvenil de *Sequoia sempervirens*, que en las plantas adultas. (Boulay, 1986; Fouret *et al.*, 1986).

Siendo imposible dar una lista completa de todos los factores que influyen sobre la formación de vástagos axilares, se indican más abajo los aspectos que se consideran más importantes:

1. Las necesidades de citokinina son extremadamente variables (tipo de citokinina y concentración). Por ejemplo, las plántulas de las Bromeliáceas (Pierik, datos sin publicar) son capaces de formar vástagos axilares sin que el medio contenga ninguna citokinina. Para muchas plantas ocurre, que cuantos más repicados se realizan, más disminuyen las necesidades de citokinina, como resultado del rejuvenecimiento y habituación. La mayor parte de las plantas reaccionan bien a la BA, e incluso a concentraciones menores de kinetina o 2iP. En las gimnospermas, la BA se añade, casi sin excepción, para frenar de una manera eficaz la dominancia apical (Kunneman-Kooij, 1984). En el caso de plantas como *Rhododendron*, sólo se aplica 2iP. La concentración de citokininas se debe ajustar de acuerdo con la especie y el cultivar en concreto, que se esté usando. Kunneman-Kooij (1984) indicó las concentraciones de citokinina apropiadas para algunas plantas leñosas.

2. De lo anterior se deduce que es muy importante correlacionar la concentración de citokininas, con la fase del desarrollo de las plantas. Un material juvenil requiere concentraciones de citokinina inferiores que el adulto. El estado de desarrollo depende también del número de repicados que se han llevado a cabo. Por ejemplo, en el caso de *Sequoia sempervirens* (David, 1982), se ha demostrado que los ápices juveniles forman mejores vástagos axilares, que las plantas adultas.

3. Generalmente se aconseja elegir una concentración de auxinas baja, junto con una concentración de citokinina alta; generalmente la proporción citokinina/auxina es de 10/1. En algunas ocasiones como en las Bromeliáceas, la auxina y la citokinina trabajan de forma sinérgica (Fig. 20.6).

4. En algunas ocasiones se recomienda el permitir al ápice del vástago un cierto desarrollo, antes de aumentar la concentración de citokininas para inducir la formación de vástagos axilares.

5. Si no se produce un desarrollo satisfactorio de vástagos axilares, la eliminación o muerte del meristemo apical puede mejorar el desarrollo de ramas laterales. Pierik y Steegmans (1986) demostraron que en *Yucca flaccida* y *Yucca elephantipes*, la formación de vástagos axilares puede ser estimulada por un corte longitudinal en el ápice del vástago.

Figura 20.6 Formación de brotes axilares, en un medio líquido, sobre vástagos de *Vriesea* "Poelmanii". Las plantas de arriba recibieron 0,08 mg l^{-1} de BA, y además 0,01 mg l^{-1} de NAA (auxina). Prácticamente no se produjo ramificación axilar, en ausencia de la auxina. Fotografía tomada 16 semanas después del aislamiento

6. Se debe evitar la formación de callo, como resultado de una concentración de citokinina demasiado elevada; en esas condiciones se pueden producir vástagos adventicios, existiendo la posibilidad de que se produzcan mutaciones.

7. La formación de vástagos axilares se puede estimular en algunos casos (por ejemplo en Bromeliáceas) utilizando un medio líquido en lugar de uno sólido. Si el medio se debe o no agitar dependerá de la especie utilizada.

8. Se ha demostrado con un amplio rango de especies, que el tidiazuron y otras piridilfenilureas sustituidas pueden estimular la formación de ramas axilares, más que las citokininas clásicas (Read *et al.*, 1986).

9. El cultivo *in vitro* continuado puede producir cambios en la proliferación de vástagos, aunque las razones por las que esto ocurre no son conocidas. Norton y Orton (1986) observaron que la proliferación de vástagos en las rosáceas aumentaba conforme se realizaban los primeros repicados (1-3 dependiendo de la especie), para después disminuir de una forma gradual, para todas las concentraciones de BA (excepto en *Chaenomeles japonica*, en la que esta disminución sólo ocurría a 5 mg l^{-1}); los mismos investigadores encontraron que la longitud del vástago y el tamaño de la hoja disminuían, y que la formación de callo aumentaba después de varios repicados.

El método de los vástagos axilares fue utilizado por primera vez por Hackett y Anderson (1967), para clavel; después por Adams (1972) y Boxus (1973, 1974) para fresa; y por Pierik *et al.* (1973, 1974, 1975a) y Murashige *et al.* (1974) para gerbera. Resulta sorprendente el que, en estos últimos años, este método se ha utilizado raramente con clavel, mientras que se ha usado en gran escala con fresa y gerbera. Más adelante en este mismo apartado se encuentra más información en relación con la fresa y gerbera.

El sistema de vástagos axilares (Fig. 20.7), desarrollado para fresa por Boxus (1973, 1974) y Boxus *et al.* (1984), en Bélgica, es conocido por el nombre de micro-propagación vía yemas axilares. Boxus llevó a cabo cultivos de meristemos, al principio, para obtener material libre de enfermedades, en esas circunstancias no se añadían citokininas, para producir vástagos axilares. En la práctica, con fresa, no se realizan más de 12 ciclos de propagación, ya que un número excesivo de éstos puede producir desviaciones fisiológicas (Debergh, comunicación personal). La propagación *in vitro* de la fresa tiene las siguientes ventajas (Aerts, 1979):

1. Teniendo en cuenta que inicialmente se realiza cultivo de meristemos, y que se llevan a cabo pruebas para ver si hay infección vírica, el resultado es

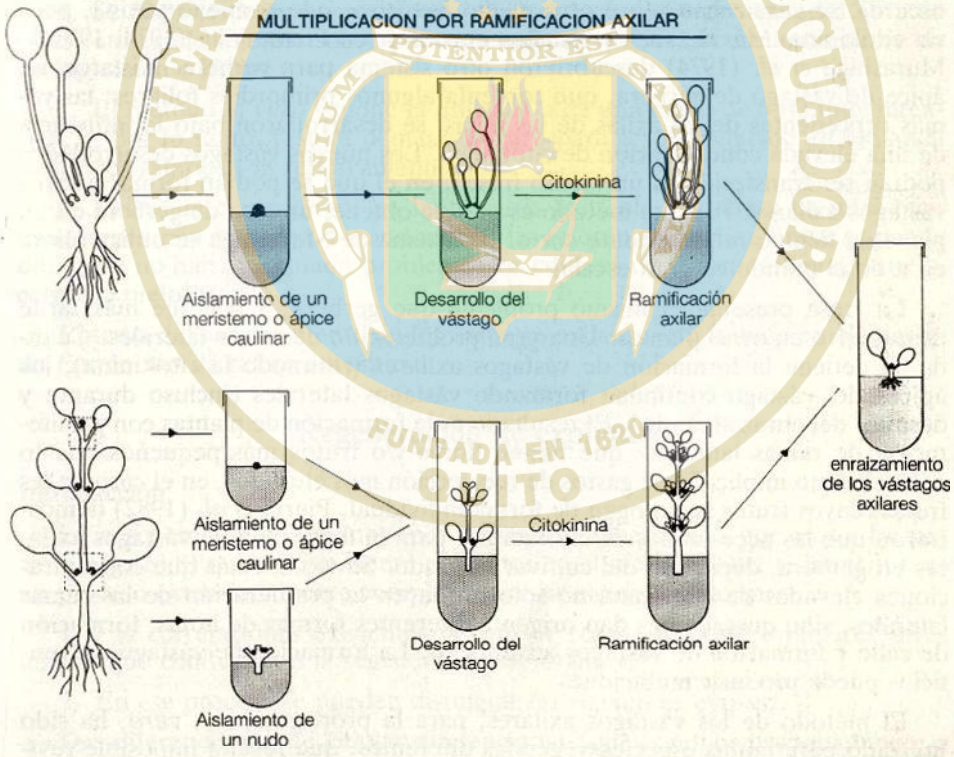


Figura 20.7 Representación esquemática del método de yemas axilares, para la propagación vegetativa de plantas. Línea superior: tal y como se aplica a plantas en roseta. Línea inferior: modo de aplicación en plantas con vástagos desarrollados

que se obtienen clones libres de virus, y, por tanto, se incrementa de forma notable la producción.

2. La producción se ve asimismo incrementada por el hecho de que el material se encuentra también libre de otros patógenos (nematodos y hongos del suelo).

3. La multiplicación es rápida, y esto también tiene importancia cuando se multiplican cultivares nuevos y libres de enfermedades.

4. La multiplicación, en estas condiciones no depende de la estación del año, por lo que resulta mucho más simple elaborar un calendario y plan de trabajo. Se pueden evitar los picos en la producción, ya que los cultivares se pueden almacenar a bajas temperaturas.

Las citokininas también tienen la capacidad de romper la dormición de las yemas de gerbera. En 1973 Pierik *et al.* observaron que si se aisla *in vitro* un explanto de capítulo con brácteas involucrales, se pueden desarrollar vástagos, a partir de los meristemos que se encuentran en las axilas de las brácteas. El desarrollo de los vástagos sólo se producía si se proporcionaba inicialmente un período oscuro de 4-6 semanas, junto con una alta concentración de citokinina. Los vástagos desarrollados en la luz (que se proporciona después del período oscuro), se enraizaban sobre otro medio nutritivo, que contiene auxina, pero sin citokinina. Más detalles se pueden encontrar en Pierik *et al.* (1974, 1975a). Murashige *et al.* (1974) descubrieron otro sistema para gerbera. Aislaron un ápice de vástago de gerbera, que contenía algunos primordios foliares; las yemas procedentes de las axilas de las hojas, se desarrollaron bajo la influencia de una elevada concentración de citokinina. Los nuevos vástagos desarrollados podían ser transferidos a un medio fresco, en el que se podían formar nuevos vástagos axilares. Por este método es posible obtener un clon de gerbera en un plazo de tiempo relativamente corto. El sistema de Murashige se utiliza ahora en todo el mundo en gran escala.

La fresa presenta el mismo problema que gerbera, y que fue más tarde descubierto en otras plantas: Una gran proliferación de ramas laterales. Cuando se detiene la formación de vástagos axilares (retirando la citokinina), los ápices del vástago continúan formando vástagos laterales (incluso durante y después del enraizamiento). El resultado es la formación de plantas con proliferación de ramas laterales, que tienen flores y/o frutos más pequeños que lo normal. Esto implica unos gastos de recolección más elevados, en el caso de las fresas, cuyos frutos se recogen de forma individual. Pierik *et al.* (1982) demostraron que las necesidades de citokininas, para la formación de vástagos axilares en gerbera, dependen del cultivar utilizado. Se vio además que concentraciones elevadas de citokinina no sólo producen la proliferación de las ramas laterales, sino que además dan origen a diferentes formas de hojas, formación de callo y formación de vástagos adventicios. La formación de vástagos adventicios puede producir mutaciones.

El método de los vástagos axilares, para la propagación *in vitro*, ha sido utilizado para tantas especies vegetales diferentes, que resulta imposible revisarlas todas aquí. Sin embargo, merece la pena decir, que el método de los vástagos axilares se ha hecho muy popular en la industria de producción de fruta, para la multiplicación de patrones y cultivares sobre su propio patrón,

especialmente en Inglaterra e Italia. Este método tiene las siguientes ventajas en la producción de frutos:

1. Se hace posible la propagación rápida de nuevos patrones y cultivares, y de material libre de enfermedades.

2. Haciendo la propagación de los cultivares sobre sus propias raíces, el injertado sobre patrones se hace así innecesario, ahorrando coste de mano de obra.

3. La propagación *in vitro* también disminuye la pérdida de material que se produce por fallos en el injertado, en la propagación *in vivo*. Sin embargo, no se debe olvidar que esta pérdida de material puede producirse también *in vitro*, por fallos en la transferencia de material al suelo.

4. La propagación se hace independiente de las estaciones del año, ya que el material vegetal puede ser almacenado a baja temperatura o plantado en invernadero.

Resulta sorprendente que la propagación *in vitro* de árboles frutales apenas se utilice en algunos países, como, por ejemplo, en Holanda; las razones para que así ocurra son las siguientes:

1. Se dispone de un buen sistema para producir y obtener material libre de virus, utilizando injertos sobre patrones radicales. Esta circunstancia no se da en Inglaterra e Italia.

2. El método *in vitro* supone la utilización de una mano de obra muy intensiva, y, por lo tanto, resulta demasiado caro para ser introducido en Holanda donde los salarios son relativamente altos.

3. Existe un cierto temor en la industria frutícola holandesa de introducir mutaciones. Sin embargo, basándonos en las referencias bibliográficas se puede decir que no han presentado problemas los cultivos de manzana, pera, ciruela, cereza o melocotón.

El tema del enraizamiento de los vástagos axilares será tratado en el apartado Formación de raíces adventicias.

Regeneración de explantos

Introducción

La regeneración de órganos (por formación adventicia o por nueva formación, Fig. 20.8) que no estuvieran presentes en el momento del aislamiento, es un proceso extremadamente complejo, por las siguientes razones:

1. Las correlaciones existentes deben ser rotas, antes de establecer otras nuevas que conduzcan a la regeneración de órganos.

2. En ese proceso se pueden distinguir las siguientes etapas:

— Des-diferenciación de células diferenciadas (que conduce probablemente a una redefinición y rejuvenecimiento de las células).

— División celular, generalmente seguida por formación de callo; cuando se dirige la división celular, puede comenzar la iniciación de órganos.

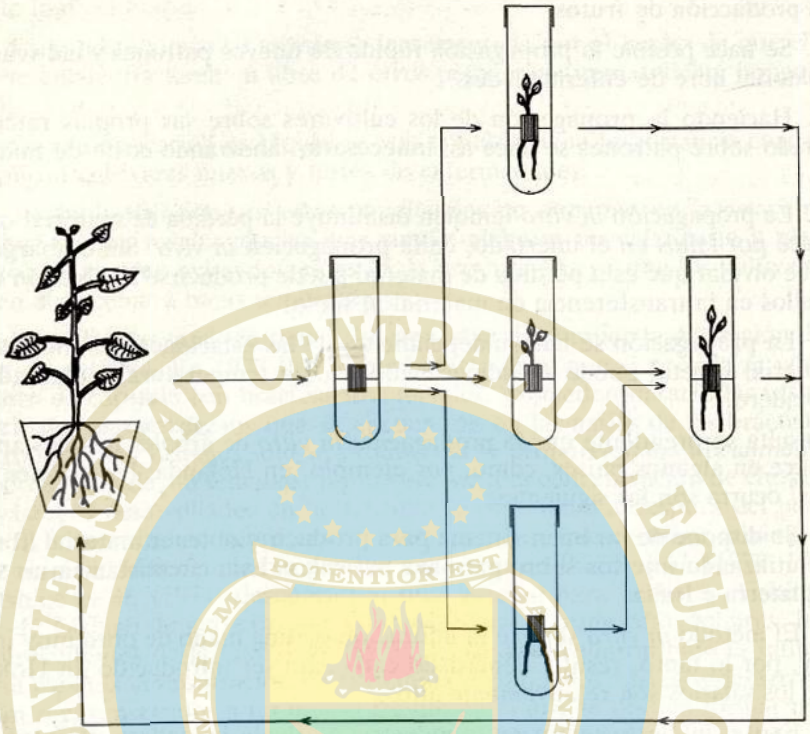


Figura 20.8 Ilustración esquemática de la propagación vegetativa por regeneración de vástagos y/o raíces adventicias. En el tubo de ensayo de más arriba, se produce la regeneración simultánea de un vástago y de una raíz, en el tubo de ensayo de la línea media sólo se regenera el vástago, y en el de la línea inferior sólo se regeneran raíces. En el caso de que sólo se obtengan raíces, o sólo vástagos, este material es repicado a otro medio, de diferente composición, de manera que finalmente se puede obtener la planta completa (derecha)

— Iniciación de órganos (formación).

— Desarrollo de órganos.

3. Existen limitaciones tanto cualitativas como cuantitativas debidas a un gran número de factores: Inherentes al material vegetal, debidos a las condiciones de crecimiento de los vegetales en el invernadero o en el campo, debidos a la posición del explanto sobre la planta, a la época del año, al nivel de hormonas endógenas, al tamaño del explanto, al método de siembra, a la disponibilidad de nutrientes y reguladores, a los factores físicos del crecimiento, a la presencia de otras sustancias en el medio, etc.

Teniendo en cuenta la complejidad de la regeneración, tal y como se ha indicado, resulta obvia la imposibilidad de revisar toda la literatura relevante. Hacer una revisión de este tipo resulta también complicado por lo que a continuación indicamos:

1. La bibliografía es tan extensa que resulta prácticamente imposible el condensarla; la mayor parte de las publicaciones sólo describen las condiciones necesarias para la regeneración, y cómo fueron conseguidas. Pero a la pregunta de por qué tiene lugar la regeneración, aún no se ha respondido (Street, 1979).

2. Es imposible la generalización, ya que cada especie, y en algunos casos cada cultivar en particular, tiene sus propias necesidades.

3. Algunas plantas tienen una capacidad de regeneración, tan alta o tan baja, que resulta difícil la regulación de la formación de órganos. Existen factores endógenos que predeterminan esta reacción (ya sea positiva o negativa). Los factores exógenos, como los reguladores, normalmente tienen poco efecto en estos casos.

4. La interacción de distintos factores (por ejemplo, luz y citokinina; oscuridad y temperatura; auxina y citokinina, etc.), hace difícil la comprensión del proceso. En el trabajo de Williams *et al.* (1985), utilizando especies leñosas de Australia, se muestra un buen ejemplo de la interacción entre auxina, luz y pH.

5. Si uno o más de los factores son limitantes para la formación de órganos adventicios, se podrán sacar pocas conclusiones acerca del papel de otros factores distintos.

6. La formación de raíces generalmente se opone a la formación de vástagos y viceversa (¡aunque esto no siempre ocurre!). Si ambos procesos se intentan de forma simultánea *in vitro,* frecuentemente se producen problemas. Para obtener plantas completas, es mejor al principio inducir la formación de vástagos adventicios, y posteriormente inducir la formación de las raíces.

7. Existe una falta casi completa del conocimiento fundamental, sobre el importante papel que juegan los reguladores en la regeneración. De hecho se conoce poco acerca de los mecanismos de funcionamiento de los reguladores a nivel molecular (Street, 1979).

8. Se conoce poco cuáles son las diferencias entre fase juvenil y fase adulta, que, por otro lado, son tan importantes en la regeneración.

A veces, con plantas en fase adulta, es casi imposible inducir la formación de órganos adventicios *in vitro;* siendo un buen ejemplo de esto el cultivo de explantos de gimnospermas adultas. David (1982) y Bonga (1982) proporcionaron algunos consejos, sobre cómo hacer posible la regeneración en estos casos:

1. Aislar el explanto de la zona basal (parte juvenil) de un árbol. Así la regeneración resulta a veces posible (Fig. 20.9); un ejemplo puede ser *Sequoia sempervirens.*

2. Se puede injertar un meristemo o ápice del vástago de una planta adulta sobre una plántula para conseguir rejuvenecimiento.

3. Utilizar un vástago rejuvenecido, que se puede originar sobre las raíces, sobre la herida de un árbol talado; o también se pueden utilizar esferoblastos (Fig. 20.9).

Formación de raíces adventicias

En este capítulo se hace una revisión de los factores que determinan la

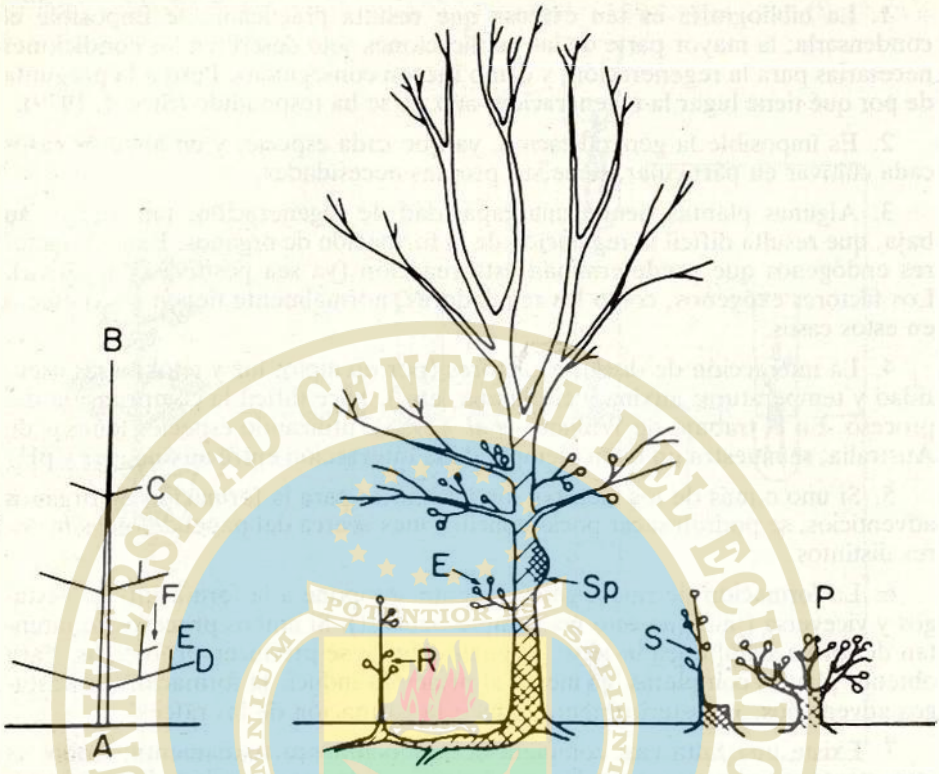


Figura 20.9 Diagrama de gradientes de juvenilidad en árboles. Izquierda: juvenilidad en una conífera de forma regular. El grado de juvenilidad de un meristemo apical es inversamente proporcional a la distancia (a lo largo del tronco y ramas) entre la unión raíz-vástago (A) y el meristemo. Debido a que las ramas laterales son más cortas que los entrenudos, a partir de los cuales se originan, si consideramos las distancias AB, AC, AD, AE, AF, el meristemo B es el más maduro, y el meristemo F es el más juvenil. Derecha: la juvenilidad en diferentes frondosas. La densidad de la trama indica el grado de juvenilidad. Los vástagos epicórmicos (E), esferoblastos (Sp), brotes de raíz o renuevos (R), brotes de cepa o retoños (S) y los árboles fuertemente podados (P) son juveniles. En la zona juvenil, porción del tronco no ramificado, se aprecia la retención de hojas cercanas al mismo, en invierno, y los ángulos obtusos de las ramas; en la zona madura, en cambio, tronco ramificado, se pueden apreciar los ángulos agudos de las ramas (Bonga, 1982)

formación de raíces adventicias, en el método de segmentos nodales y en vástagos axilares y explantos. No se da información detallada sobre el establecimiento *in vivo* de vástagos formados *in vitro,* ya que este tema ha sido tratado en el capítulo 14; el hecho de que este método de enraizamiento se está haciendo importante, puede comprobarse en el trabajo de Maene y Debergh (1983), que trasplantaron con éxito *in vivo* vástagos que habían sido producidos *in vitro,* de las siguientes especies: *Philodendron, Cordyline terminalis, Begonia* y *Ficus benjamina.* Este método se ha hecho importante también un muchos países, para vástagos de gerbera. La panorámica que a continuación se ofrece, se ha obtenido básicamente de los trabajos de los siguientes autores: Gautheret

(1969), Pierik y Steegmans (1975a), Pierik *et al.* (datos sin publicar), y Nemeth (1986).

Edad y estado de desarrollo de la planta

En la mayor parte de los casos, la formación de raíces se induce mucho más fácilmente en plantas juveniles que en plantas adultas, aunque las razones por las que esto es así, no están generalmente claras (Hackett, 1970). Las plantas en estado vegetativo responden mejor que las plantas en floración, aunque se pueden encontrar varias excepciones a esta regla. Los vástagos regeneran más fácilmente cuando se toman de la parte basal de un árbol, debido a que esta zona es la que posee el carácter juvenil. La capacidad regenerativa de los cotiledones es generalmente mucho más elevada que la de las hojas que se puedan formar más tarde. El primer par de hojas de un vástago (rejuvenecido) es capaz de regenerar más rápidamente que las hojas subsiguientes.

Sin embargo, aunque las plantas en estado vegetativo generalmente regeneran mejor que las que se encuentran en estado generativo, se pueden encontrar muchas excepciones: *Freesia* (Bajaj y Pierik, 1974), *Lunaria annua* (Pierik, 1967), tabaco (Paulet, 1965), *Nerine bowdenii* y *Eucharis grandiflora* (Pierik y Steegmans, 1986a), *Musa* (Cronauer y Krikorian, 1986) y *Phoenix dactylifera* (Drira *et al.*, 1986).

Posición del explanto sobre la planta

En algunas plantas cualquier segmento de un órgano cualquiera tiene aproximadamente la misma capacidad regenerativa. Si existen diferencias, pueden ser explicadas generalmente por el hecho de que en la hoja (o tallo), hay tejidos de diferentes edades. Por otro lado, también se han encontrado grandes diferencias, según las zonas, en capacidad de regeneración de algunos órganos: Por ejemplo, en el tallo floral de la bienal lunaria, se pueden encontrar dos gradientes de regeneración (uno de formación de raíces y otro de formación de vástagos), estos gradientes se encuentran en direcciones opuestas (Pierik, 1967). Este tipo de gradiente de regeneración se ha encontrado también en los tallos de tabaco (Aghion-Prat, 1965), y en los catafilos de los bulbos de azucena (Van Aartrijk, 1984) y de jacinto (Pierik y Ruibing, 1973). Los explantos basales de estos catafilos del bulbo, regeneran mucho mejor que los explantos terminales. En los árboles y arbustos, son también comunes los efectos de posición (topofísicos); sobre la regeneración, también se dan efectos ciclofísicos (la misma edad pero diferente posición), o perifísicos (la misma edad y posición, pero diferente exposición, por ejemplo al sol o la sombra).

Especies vegetales y cultivares

Como se mencionaba en la introducción a este apartado, la capacidad de regeneración de las plantas varía entre las distintas especies. Las plantas herbáceas regeneran mucho más fácilmente que los árboles y arbustos. La diferencia en la capacidad regenerativa de los distintos cultivares de las plantas herbáceas, resulta a veces tan difícil de explicar como las diferencias entre las especies. A veces las diferencias en la capacidad regenerativa se pueden explicar por la

presencia o ausencia de alguna barrera de tipo anatómico, como ocurre en *Rhododendron;* las lesiones pueden tener, muchas veces en estos casos, un efecto positivo.

Sexo

Se ha demostrado, en algunas especies vegetales (*Actinidia chinensis, Populus ciliata*), que las plantas femeninas tienen una mayor capacidad regenerativa que las plantas masculinas (George y Sherrington, 1984).

Tamaño del explanto

Los explantos mayores son a veces más fáciles de regenerar que los más pequeños, quizá debido a la presencia de una mayor cantidad de reservas alimenticias. Por otro lado los explantos pequeños presentan una superficie lesionada relativamente mayor, cosa que se ha demostrado que promueve la regeneración en el caso de los catafilos de azucena (Van Aartrijk, 1984).

Lesiones

Pierik y Steegmans (1975a) han demostrado en *Rhododendron* y Snir y Erez (1980) en patrones radicales de manzano, que el enraizamiento es estimulado por las lesiones.

Orientación del material que se siembra

Esta juega un papel importante en muchas plantas. Una inoculación apolar (con el órgano colocado del revés) estimula; en cambio, una inoculación polar (el órgano orientado de forma natural, con su base hacia abajo) inhibe la regeneración. Este hecho quizá se debe a un mejor suministro de oxígeno, por encima del medio, aunque puede también estar ligado a fenómenos de acumulación (Pierik y Steegmans, 1975a).

Número de repicados

La formación de raíces adventicias declinó, en seis especies de la familia Rosáceas, con repicados sucesivos, con la excepción de *Chaenomeles.* Esta disminución del potencial de enraizamiento fue menos rápida en medios que contenían 2iP, que en los que contenían BA (Norton y Norton, 1986a). Sin embargo, en cultivos de vástago, del cultivar de manzano Jonathan, que es difícil de enraizar, se ha demostrado (Noiton *et al.,* 1986), que con un número creciente de repicados, el porcentaje de enraizamiento aumentó, desde 0 para los explantos iniciales, hasta 100 después de 9 repicados. Esto puede ser explicado quizá por el proceso de rejuvenecimiento que tiene lugar, especialmente en las plantas leñosas, con repicados sucesivos.

Suministro de oxígeno

Como ya se ha mencionado antes, el suministro de oxígeno juega un papel importante. Esta es precisamente la razón por la que los vástagos enraizan

mejor *in vivo* que *in vitro;* en el agar se encuentra un suministro limitado de oxígeno (el oxígeno no es muy soluble en el agua). Las raíces formadas en agar, por lo general tienen pelos radicales escasamente desarrollados, debido a la falta de oxígeno. La aireación suele promover la formación de raíces y el enraizamiento es también mejor en un medio líquido.

Para estimular el alargamiento de los vástagos y para conseguir un mejor enraizamiento (sin transferir el material a un medio de enraizamiento), Maene y Debergh (1985) añadieron medio líquido a medios sólidos envejecidos.

Luz

La luz generalmente tiene un efecto negativo sobre la formación de raíces. Las plantas que han sido cultivadas en la oscuridad (etioladas), enraizan con más facilidad que las crecidas a la luz, como por ejemplo, ocurre en *Prunus cerasifera* (Hammerschlag, 1982). Algunas plantas como *Helianthus tuberosus* y la azucena reaccionan positivamente a la luz. Las irradiancias altas inhiben la formación de raíces, más que las irradiancias bajas, si bien gerbera constituye una excepción a esta regla (Murashige *et al.*, 1974). No se sabe todavía por qué la luz produce un efecto inhibidor sobre la formación de raíces (Pierik y Steegmans, 1975a).

Economou y Read (1986) demostraron, trabajando con híbridos de *Petunia,* que los vástagos desarrollados con luz roja desarrollaban raíces en mayor cantidad y más fuertes, que aquellos tratados con luz de longitud de onda del rojo-lejano; el efecto de la luz roja sobre el enraizamiento de los micro-vástagos es reversible si se hace una exposición subsiguiente a luz procedente del rojo-lejano.

Temperatura

La formación de raíces adventicias es estimulada generalmente por elevadas temperaturas. Solamente *Lunaria annua* (Pierik, 1967) y algunas plantas leñosas (Anónimo, 1978a) precisan frío para la formación de raíces. El momento en que se realiza el aislamiento puede tener también una gran influencia, especialmente en el caso de plantas leñosas: Resulta más difícil promover el crecimiento y la formación de órganos en plantas durmientes (que no han recibido tratamiento de frío para romper la dormición), que en plantas no durmientes.

Agar

Se conoce poco sobre la influencia del agar y su concentración en la formación de raíces. Una corta revisión bibliográfica se puede encontrar en el trabajo de Nemeth (1986). La formación de raíces adventicias, especialmente en las plantas leñosas, es pobre sobre medios sólidos, por esta razón se utilizan a veces medios líquidos para las plantas leñosas. Sobre medios sólidos las raíces pueden incluso presentar un geotropismo negativo.

Azúcar

Está claramente demostrado que el azúcar es necesario para la formación de raíces adventicias. Se comprende con facilidad su importante papel, si se tiene en cuenta que las raíces se forman sobre todo en la oscuridad. Sin embar-

go, lo anterior no lo explica todo, ya que la luz y el azúcar no son mutuamente reemplazables (Evers, 1984). Resulta sorprendente el que se necesite una elevada concentración de azúcar, para la formación de raíces adventicias, especialmente en el caso de las plantas leñosas; una excepción la constituye *Pseudotsuga menziesii,* que sólo necesita una concentración de azúcar baja (Cheng y Voqui, 1977).

Potencial osmótico

No se sabe apenas nada acerca del efecto del potencial osmótico sobre la formación de raíces. Pierik y Steegmans (1975a) demostraron en *Rhododendron,* que se impedía la formación de raíces bajando el potencial osmótico desde −2,5 a −6,0 bar.

pH

Se sabe poco sobre el efecto del pH en la formación de raíces, aunque unas pocas especies de *Prunus* prefieren valores bajos de pH (Nemeth, 1986).

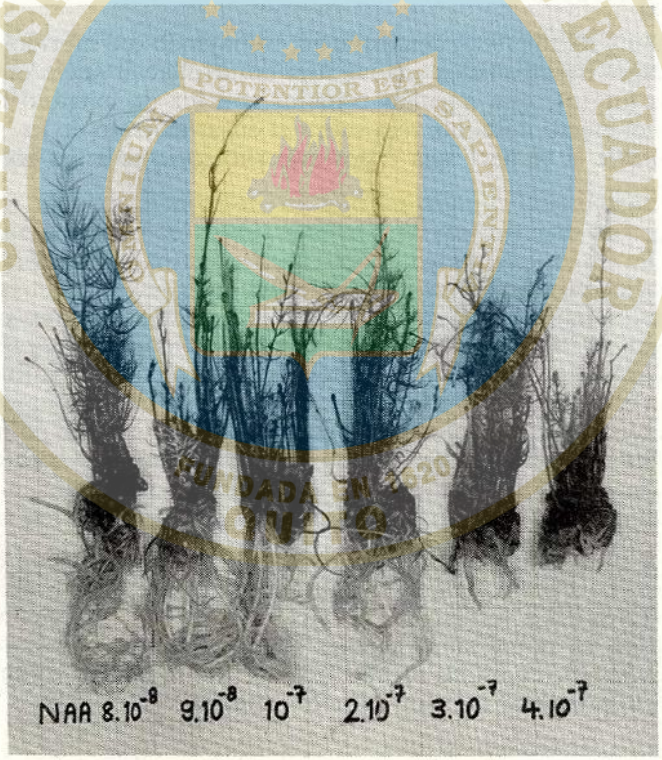


Figura 20.10 Efecto de la concentración de NAA sobre la formación de raíces adventicias en *Asparagus officinalis.* El alargamiento de las raíces adventicias disminuye, a medida que aumenta la concentración de NAA. Fotografía tomada 16 semanas después del aislamiento

Nutrientes minerales

El efecto de los nutrientes minerales sobre la formación de raíces es también poco conocido. La necesidad de macro- y micro-elementos depende en gran medida de la cantidad de reservas alimenticias disponibles en el explanto. Tripathi (1974) demostró que los nutrientes minerales pueden jugar un papel importante. Las plantas leñosas y especialmente las gimnospermas, prefieren una concentración salina baja para la formación de raíces adventicias (Anónimo, 1978a). Más información sobre este tema puede encontrarse en el trabajo de Nemeth (1986).

Auxinas

La mayor parte de las plantas necesitan auxinas para conseguir una regeneración radical eficaz. Esta necesidad no es constante, ya que después de la iniciación de la raíz (para la que se necesita elevada concentración de auxina), el desarrollo de los primordios radicales requiere una baja concentración (Fig. 20.10); por esta razón, a veces la iniciación radical se lleva a cabo *in vitro,* con una elevada concentración de auxina, y la iniciación de los primordios radicales se realiza *in vivo* (Staritsky, comunicación personal). La auxina débil IAA se utiliza frecuentemente para el enraizado de las plantas herbáceas. Con el tiempo el IAA se descompone a la luz, lo que significa que los primordios radicales producidos pueden desarrollarse posteriormente con facilidad. Las plantas leñosas requieren concentraciones de auxinas superiores que las plantas herbáceas. Las auxinas más eficaces son claramente el IBA y el NAA. En algunos casos se utilizan mezclas de auxinas (IBA y NAA). El IAA generalmente no es muy eficaz, cuando se utiliza con plantas difíciles de enraizar (Pierik y Sprenkels, 1984). Se debe evitar la formación de una cantidad excesiva de callo, que se puede producir por influjo de auxinas muy potentes como el 2,4-D y el NAA.

Otros reguladores

Las citokininas, giberelinas y el ácido abscísico inhiben generalmente la formación de raíces adventicias. En algunos casos las citokininas pueden producir un efecto estimulador como por ejemplo en: *Prunus* y *Cydonia* (Németh, 1986) y *Dalbergia sissoo* (Datta *et al.*, 1983). En algunos casos las giberelinas producen también un efecto estimulador. Para producir raíces adventicias, después de la multiplicación por vástagos axilares, generalmente se retiran las citokininas y se añaden auxinas. Se sabe poco sobre el efecto del etileno en la formación de raíces. En un discutido trabajo de investigación, Coleman y otros (1980) indicaron que en el caso de explantos de tomate, el etileno tenía un efecto inhibidor sobre la formación de raíces, en presencia de IAA; si se retiraba el etileno producido por la planta, se producía la formación de raíces, por la influencia del IAA. Si se considera el interesante trabajo de investigación llevado a cabo por Van Aartrijk (1984) con brácteas de azucena, y el importante papel que juega el etileno en la regeneración de los bulbos, este tema recibirá ciertamente más atención en el futuro.

Recientemente se ha descubierto que los oligosacáridos constituyen un nuevo grupo con funciones reguladoras (Albersheim y Darvill, 1985). Estas sustan-

cias influyen en la formación de órganos en tabaco, de la misma forma que las citokininas y auxinas.

Sustancias diversas

Cheema y Sharma (1983) y Preil y Engelhardt (1977) demostraron que el carbón activo juega un importante papel en la formación de raíces adventicias. Se le pueden atribuir dos efectos: La adsorción de todos los compuestos orgánicos, con excepción de los azúcares, y la falta de suministro de luz a los medios nutritivos.

El floroglucinol añadido al IAA, produce en algunas ocasiones un efecto sinérgico sobre la formación de raíces adventicias, y se puede añadir a las plantas leñosas (Anónimo, 1978a). De los trabajos de investigación de Jones y Hopgood (1979), se desprende que el fluroglucinol estimula la formación de raíces, sobre vástagos de *Malus* cultivados *in vitro*. Sin embargo, estas aseveraciones han sido discutidas por otros autores.

Formación de vástagos adventicios

La formación de vástagos adventicios se utiliza en la horticultura práctica, para algunas especies, como medio de propagación vegetativa; por ejemplo, *Saintpaulia, Begonia, Achimenes, Streptocarpus,* azucena, jacinto y *Nerine* se clonan actualmente utilizando este método.

El hecho de que la formación de vástagos adventicios no sea tan popular como el método de los vástagos axilares se debe a:

1. El número de plantas que pueden formar vástagos adventicios *in vivo* y/o *in vitro* es mucho más pequeño que el de aquellas capaces de formar raíces adventicias.

2. Las posibilidades de que surjan mutantes por este método son mucho más elevadas que utilizando los métodos de segmentos nodales o vástagos axilares.

Existen semejanzas considerables entre la formación de vástagos y raíces adventicias: Los factores que ejercen una influencia positiva sobre la formación de raíces, generalmente estimulan también la formación de los vástagos. Esto queda demostrado con los siguientes ejemplos:

1. Las plantas juveniles regeneran vástagos adventicios con relativa facilidad. Por ejemplo, en el caso de las gimnospermas, la formación de vástagos adventicios generalmente sólo es posible con embriones, plántulas o porciones de plántulas y no con plantas adultas (David, 1982; Anónimo, 1984). En el caso de los árboles un auténtico rejuvenecimiento ontogénico es esencial para la multiplicación.

2. El azúcar siempre juega un papel muy importante en la formación de órganos (raíz y vástago).

3. La formación tanto de la raíz como del vástago se inhibe generalmente por las giberelinas y el ácido abscísico.

En consideración a lo que acabamos de decir, solamente discutiremos en este apartado los factores que producen efectos diferentes a los indicados, sobre la formación de vástagos o raíces adventicias.

En muchas ocasiones la luz estimula la formación de vástagos adventicios. En el apartado *Discusión sobre factores físicos especiales*, se discute el papel que juegan la calidad y la irradiancia de la luz. Sin embargo, también conviene tener en cuenta que algunas plantas necesitan oscuridad, para la formación de vástagos adventicios: Las yemas florales de *Freesia* (Pierik y Steegmans, 1975b), los explantos de pedúnculo de *Eucharis grandiflora* y *Nerine bowdenii* (Pierik y Steegmans, 1986a; Pierik *et al.*, 1985). Economou y Read (1986) demostraron que los fragmentos de hoja de *Petunia hybrida,* cultivados en un medio libre de citokinina y tratados con luz roja, producían más vástagos, y con un mayor peso fresco, que los explantos de los cultivos tratados con luz procedente del rojo lejano. Sin embargo, en un medio con BA, tanto los tratamientos con luz roja como aquellos con luz del rojo lejano, produjeron un número similar de vástagos y con igual peso fresco, pero mayores que aquellos de los cultivos libres de citokinina.

Aunque generalmente se requiere una elevada temperatura para la formación de vástagos adventicios, existen algunas excepciones a esta regla: *Begonia* (Heide, 1965) y *Streptocarpus* (Appelgren y Heide, 1972).

Aunque la formación de raíces es estimulada frecuentemente por una inoculación apolar, no siempre ocurre esto en la formación de vástagos adventicios. Pierik y Zwart (datos no publicados) demostraron con explantos foliares de *Kalanchoë farinacea,* que la regeneración de los vástagos es estimulada fuertemente, si la epidermis inferior del explanto permanece en contacto con el medio, llegándose de esta forma a la conclusión de que una siembra horizontal, más que una vertical, produce una mejor regeneración del vástago.

Las necesidades de auxinas y citokininas, para la formación de vástagos adventicios, resultan complicadas por las razones que se indican:

1. Hay plantas que en principio no necesitan auxinas ni citokininas para la formación de vástagos adventicios. Como ejemplos se pueden citar, la bienal *Lunaria* (Pierik, 1967), la achicoria (Pierik, 1966), *Cardamine pratensis* (Pierik, 1967a), *Streptocarpus* (Appelgren y Heide, 1972; Rossini y Nitsch, 1966). No obstante, lo anterior no quiere decir que la adición de citokininas y/o auxinas no ejerce un efecto positivo o negativo sobre la formación de vástagos.

2. La mayor parte de las plantas necesitan citokininas para la formación de los vástagos, mientras que las auxinas impiden esa formación (Miller y Skoog, 1953; Paulet, 1965; Nitsch, 1968).

3. Existe, sin embargo, un grupo de plantas que requiere la adición de auxina exógena, para la formación del vástago: la azucena (Van Aartrijk, 1984), y el jacinto (Pierik y Steegmans, 1975d).

4. En muchas especies, para la formación del vástago, lo que se necesita es una elevada concentración de citokinina y una baja concentración de auxina (Fig. 20.11). Como ejemplos se pueden citar: *Begonia* (Ringe y Nitsch, 1968; Heide, 1965), rábano (Wurm, 1960; Sastri, 1963), digital (Dolfus y Nicolas-Prat, 1969), *Atropa belladonna* (Zenkteler, 1971) y coliflor (Margara, 1969).

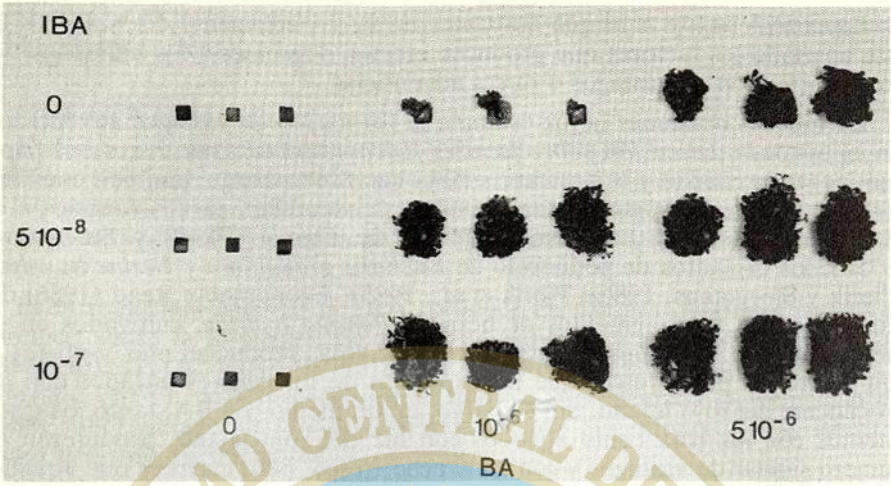


Figura 20.11 Influencia de diferentes concentraciones de IBA y BA, sobre la formación de brotes adventicios, en explantos foliares de *Kalanchoë* "Tessa". Se necesita la presencia de BA para la formación de los brotes adventicios, mientras que no es precisa la presencia de IBA. Sin embargo, la adición conjunta de BA e IBA produce un efecto sinérgico, sobre la formación de brotes adventicios (Pierik y Van Marrewijk, datos no publicados). Fotografía tomada 8 semanas después del aislamiento

Como conclusión se puede decir que, en aquellas plantas en las que se necesitan auxinas y citokininas, la concentración de esta última debe ser generalmente alta, mientras que la de auxina debe ser baja; siendo la proporción entre estos dos reguladores la que determina la formación del órgano (Skoog y Tsui, 1948; Miller y Skoog, 1953; Paulet, 1965; Gautheret, 1959). La citokinina BA, es posiblemente la más eficaz en promover la formación de vástagos adventicios en muchas plantas, y se usa de forma exclusiva en el caso de las gimnospermas. También se pueden usar otras citokininas (kinetina, 2iP, PBA y zeatina), pero en la práctica se hace menos frecuentemente. Generalmente resulta difícil predecir qué citokinina resultará más adecuada. Cuando se utiliza BA, se debe tener en cuenta, sobre todo cuando se utilizan concentraciones elevadas, que se pueden producir algunas anomalías, como vástagos anormales o malformados. Es recomendable transferir los vástagos adventicios, formados sobre un medio con elevada concentración de citokinina, a otro medio con baja concentración de citokinina, con el fin de estimular el posterior crecimiento y desarrollo.

En algunos casos resulta favorable, para la formación de vástagos, la combinación de citokinina y adenina (sulfato), (Skoog y Miller, 1957; Nitsch *et al.* 1969a; Nitsch, 1968; Dolfus y Nicolas-Prat, 1969). La adenina (sulfato) sola puede ser suficiente en algunos casos para inducir la formación de vástagos, por ejemplo, en *Begonia* (Ringe y Nitsch, 1968), tabaco (Skoog y Tsui, 1948; Paulet, 1965), olmo (Jacquiot, 1951), *Plumbago indica* (Nitsch, 1968). No se encontró un efecto positivo, de la adenina (sulfato), sobre la formación de vástagos adventicios, a partir de explantos foliares de *Kalanchoë farinacea* (Pierik y Zwart, datos sin publicar).

Generalmente un incremento en la concentración de giberelinas detiene la

formación de vástagos adventicios, por ejemplo: en jacinto (Pierik y Steegmans, 1975d), lunaria bienal (Pierik, 1967), achicoria (Paulet, 1965; Bouriquet y Vasseur, 1965), tabaco (Aghion-Prat, 1965; Murashige, 1961, 1964), *Streptocarpus* (Ringe y Nitsch, 1968; Appelgren y Heide, 1972), *Begonia rex* (Schraudolf y Reinert, 1959; Reinert y Besemer, 1967; Bigot y Nitsch, 1968), *Plumbago indica* (Nitsch, 1968).

El ácido abscísico normalmente inhibe la formación de vástagos adventicios, aunque puede producir inducción en el caso de *Ipomoea batatas* (Yamaguchi y Nakajima, 1974).

En trabajos recientes, realizados con explantos de bráctea de azucena (Van Aartrijk, 1984; Van Aartrijk *et al.*, 1986), se ha podido demostrar que la producción de etileno juega un papel importante en la producción de bulbos adventicios. También se ha demostrado que estimulan la formación de bulbos las siguientes sustancias o circunstancias: Auxina (NAA), alta temperatura, lesiones y el TIBA (un inhibidor del transporte auxínico). Todos estos factores influyen sobre la biosíntesis del etileno. También se ha observado un efecto positivo, sobre la formación de vástagos adventicios, en tabaco, por acción de antiauxinas como el ácido N-1-naftil-ftálico (Feng y Link, 1970).

También se ha demostrado que las vitaminas pueden ejercer un efecto estimulador, sobre la formación de vástagos adventicios en: Ciclamen (Mayer, 1956; Stichel, 1959), olmo (Jacquiot, 1951), rábano (Wurm, 1960) y *Robinia* (Seeliger, 1959).

En el futuro puede tener gran importancia la capacidad de cambiar la producción de hormonas en las plantas, con la ayuda de *A. tumefaciens*, posibilitando de esta manera la formación de vástagos adventicios. Muchas plantas que son incapaces de formar vástagos adventicios, por ejemplo, como consecuencia de su edad adulta (especialmente árboles y arbustos), son estimuladas por este medio a producir vástagos adventicios. En definitiva, así se produce un rejuvenecimiento (Ver el capítulo 11), fenómeno que es particularmente importante en la propagación vegetativa. Ooms *et al.* (1983) dieron algunos ejemplos interesantes, en el caso de patata y de otras plantas, de la formación de vástagos adventicios, como resultado de la infección por *A. tumefaciens*. Fillati *et al.* (1986) demostraron que la cepa silvestre C58, de *A. tumefaciens*, mejoraba la capacidad de regeneración en *Populus*, como resultado de un proceso de transformación. También se ha utilizado *A. tumefaciens*, para conseguir la formación de vástagos adventicios en *Nicotiana tabacum* (Steffen *et al.*, 1986).

Inducción de callos, cultivos de callos y regeneración de órganos y embriones

Introducción

Un callo es básicamente un tejido tumoral, más o menos organizado, que generalmente surge sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados. Se llama inducción del callo al inicio de su formación. Es posible la formación de callos con muchas especies diferentes, posteriormente los callos se cultivan en un medio diferente, y nos referimos a ellos como subcultivos de callo. En condicio-

nes excepcionales, y a veces de forma espontánea, se puede producir la regeneración de órganos adventicios y/o embriones, a partir de callos. En un medio líquido, un callo puede formar agregados (masas de células), o células individuales. Se pueden regenerar plantas completas incluso a partir de células individuales.

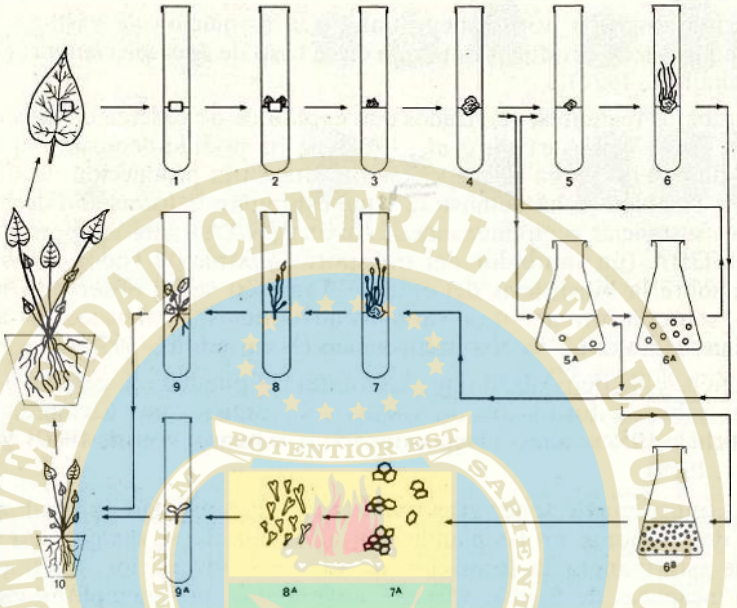


Figura 20.12 Representación esquemática de la inducción de callo, cultivo de callos, regeneración de órganos y embriones somáticos, y formación de plantas. Consultar el texto para una explicación más detallada

En la Figura 20.12 se ofrece una ilustración esquemática del proceso completo de regeneración de una planta, desde el aislamiento del explanto a la regeneración propiamente dicha, a partir de un callo o agregado de células. Se comienza retirando una hoja joven de una planta, posteriormente se esteriliza y después se obtienen a partir de ella los explantos. En el tubo 1 se ha producido el aislamiento de un explanto foliar, sobre un medio sólido, para obtener tejido calloso sobre las superficies lesionadas. Esto último se consigue en el tubo 2. En el tubo 3 se realiza un subcultivo del callo, sobre un medio sólido; para ello, el callo formado en el tubo 2 es troceado y sembrado en el tubo 3; consiguiéndose un gran desarrollo en el tubo 4. El desarrollo posterior al del tubo 4 puede tener lugar sobre un medio sólido, pero también se puede desarrollar en el seno de un medio líquido (por ejemplo, en matraces Erlenmeyer colocados en un agitador). En el matraz 5a se han sembrado algunos agregados de células del callo, que han sido capaces de multiplicarse en el transcurso de algunas semanas (matraz 6a). Si se necesita, la multiplicación en un medio líquido puede llevarse a cabo repetidamente. Si en un momento determinado se precisa la regeneración de órganos o embriones a partir de un callo, entonces éste debe ser inoculado en otro medio. La formación de órganos se desarrolla

normalmente sobre un medio sólido; para ello el tejido calloso del tubo 4 o del matraz 6a se siembra sobre un medio formador de órganos en el tubo 5. En el tubo 6 se pueden observar los vástagos adventicios obtenidos a partir de un callo. Aunque los embriones se pueden originar a partir de callos cultivados sobre un medio sólido, la embriogénesis se produce más frecuentemente en medio líquido, como se muestra en las Figuras 7a y 8a. Los embriones se transforman en plantas, sobre un medio sólido, tubo 9a, que posteriormente se trasplantan al suelo, para su posterior desarrollo (10). Cuando se producen vástagos adventicios, sobre un medio sólido, tubos 6 y 7, se pueden obtener esquejes, como en el tubo 8, que se enraizan, tubo 9, y finalmente pueden ser trasplantados al suelo (10).

Existen tantas referencias bibliográficas, en relación con la inducción de callos, cultivo de callos, cultivo de células, organogénesis y embriogénesis, que resulta imposible, en este libro, poder ofrecer una visión concisa del problema. En este capítulo se consideran los aspectos más importantes; se han tomado las siguientes referencias para el mismo: Street (1973, 1979), King y Street (1973), Thomas y Davey (1975), Thomas *et al.* (1979), Tisserat *et al.* (1979), Kohlenbach (1978), David (1982), Sharp *et al.* (1982), y Evans *et al.* (1981).

Inducción del callo

Si en el explanto aislado sólo existen células diferenciadas, es necesario producir una desdiferenciación, antes de que tenga lugar la división celular, siendo las células parenquimáticas las que generalmente pueden sufrir este proceso (Halperin, 1969). Si un explanto contiene tejido meristemático en el momento de su aislamiento, este se puede dividir de forma inmediata, sin necesidad de que se produzca una desdiferenciación. La desdiferenciación juega un papel muy importante, ya que permite, a las células maduras de un explanto, de una planta adulta, presentar una redefinición. En este proceso, las células adultas son capaces, de forma temporal, de pasar desde su forma adulta a su forma juvenil (rejuvenecimiento). Este rejuvenecimiento puede tener consecuencias muy importantes: Las células son inducidas a dividirse de forma intensiva; las células rejuvenecidas, si se comparan con las células adultas, presentan un mayor crecimiento y potencial de división; las células rejuvenecidas son capaces, en circunstancias especiales, de regenerar órganos y/o embriones.

Después de la desdiferenciación, las células pueden empezar a dividirse de forma intensiva, bajo la influencia de algunos factores como los reguladores de crecimiento que puedan existir en el medio; así se forma un tumor que recibe el nombre de callo. Un callo es en principio un tejido no organizado y poco diferenciado; sin embargo, se pueden encontrar tejidos diferenciados en agregados grandes de tejido calloso. Cuando se examina de forma crítica un tejido de callo, puede verse que está lejos de ser algo homogéneo, ya que generalmente está constituido por dos tipos de tejidos: Uno diferenciado y otro no diferenciado.

Cualquier tipo de órgano (raíz, tallo, hoja, flor, etc.) o tejido puede ser utilizado como material inicial para la inducción de callo. Si ésta resulta difícil o se precisa un callo juvenil, se utilizan embriones (inmaduros) o fragmentos de plántulas. Debe tenerse en cuenta, que tanto el material inicial (adulto o

juvenil), como la posición del explanto sobre la planta (que refleja el nivel de hormonas endógenas), pueden tener una gran influencia en procesos como la división celular y la formación de órganos y embriones.

Las monocotiledóneas reaccionan de una forma diferente, en lo que se refiere a la inducción de callos, si se comparan con las dicotiledóneas, siendo en las primeras menos probable la formación de tejido calloso. Generalmente, la simple adición de auxina constituye un estímulo hormonal suficiente para la inducción del callo (Fig. 20.13). En el caso de las monocotiledóneas, debido a que la iniciación del callo resulta a veces difícil, si se parte de embriones, se suele utilizar como material inicial hojas jóvenes, plántulas o primordios florales muy jóvenes.

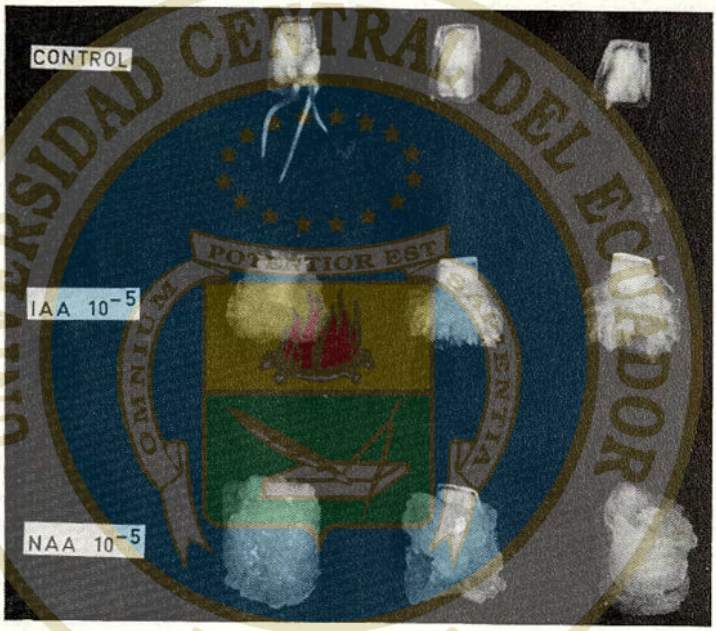


Figura 20.13 En ausencia de auxina (control), sólo se forman raíces adventicias y bulbillos, sobre explantos de los catafilos de bulbos de jacinto. La adición de 10^{-5} g ml^{-1} de IAA induce la formación de callo y de raíces, mientras que la adición de 10^{-5} g ml^{-1} de NAA sólo induce una pronunciada formación de callo. Fotografía tomada 8 semanas después del aislamiento

Para iniciar la formación de callos a partir de un explanto, se recomienda frecuentemente el suministro de reguladores exógenos. Las exigencias de regulador exógeno (tipo de regulador, concentración, proporción auxina/citokinina), dependen en gran manera del genotipo y de su contenido en hormonas endógenas. Estas necesidades en principio puede dividirse en tres categorías:

1. Sólo se necesitan auxinas (especialmente monocotiledóneas).
2. No se requieren más que citokininas.
3. Se precisan tanto auxinas como citokininas.

Antes del descubrimiento de las citokininas, ya se había observado la extre-

mada eficacia para inducir la formación de callo, de una combinación de la auxina 2,4-D con la leche de coco, este extremo fue demostrado por Steward *et al.* (1964), con zanahoria. Después del descubrimiento de la citokinina kinetina, se pudo ver que, en la mayor parte de los casos, aunque no en todos, la leche de coco podía ser reemplazada por la citokinina. Las excepciones se deben al hecho de que la leche de coco contiene otros muchos componentes, además de la citokinina. El hecho de que la auxina y la citokinina son esenciales para la formación de callo, fue comprendido al descubrirse la presencia de citokinina en la leche de coco.

También son importantes para la formación de callo otros muchos factores y reguladores, como por ejemplo: el genotipo, la composición del medio nutritivo, factores físicos del crecimiento (luz, temperatura, etc.). Como medio mineral se suele utilizar el de Murashige y Skoog (1962), o alguna modificación del mismo. Como fuente de azúcar se suele usar sacarosa o glucosa al 2-4%. Si no se conocen las exigencias nutritivas exactas, para la formación de callo, se pueden añadir al medio otros compuestos como: Hidrolizado de caseína, extracto de malta, extracto de levaduras o leche de coco. El efecto de la irradiancia sobre la formación de callo depende de la especie vegetal; en algunos casos es necesaria la presencia de luz mientras que en otros se precisa oscuridad. Para la formación de callo resulta generalmente ventajosa la temperatura elevada (22-28°C).

Cultivo de callos

Introducción

Después de conseguida la inducción, el callo se cultiva sobre un medio nuevo. El primer repicado suele llevarse a cabo sobre un medio sólido, aunque en algunos casos es posible empezar directamente sobre un medio líquido. Si el callo presenta un crecimiento pobre en el primer repicado, puede ser necesario repicar también una porción del explanto. Las condiciones de crecimiento (medio nutritivo, factores físicos del crecimiento) son generalmente semejantes a las que se utilizan para la inducción del callo, sólo las concentraciones de auxina y citokinina son normalmente más bajas. Si el crecimiento del callo se detiene después del repicado, nos indica que el medio de repicado no resulta adecuado. En algunas ocasiones el crecimiento del callo no es viable sobre medios sintéticos, añadiéndose en estos casos mezclas complejas de sustancias, como leche de coco, hidrolizado de caseína, extracto de malta, extracto de levadura, etc.

El tejido calloso procedente de diferentes especies vegetales, puede presentar diferencias en estructura y hábito de crecimiento; puede ser: Blanco o coloreado, libre (que se separa fácilmente) o fijo, blando (acuoso) o duro, fácil o difícil para dividirse en células o agregados en medio líquido. El crecimiento de un callo dentro de una misma especie vegetal puede depender también de factores como la posición original del explanto sobre la planta, y las condiciones de crecimiento. Por otro lado, a veces se pueden ver diferencias en color y estructura en un callo, que no pueden ser atribuiídas a los factores anteriores, debiéndose considerar en estos casos la posibilidad de que se hayan producido algunas mutaciones.

La habituación puede jugar un papel en el cultivo de callos: los callos pueden perder sus exigencias en auxina y/o citokinina, después de repicados sucesivos; de esta manera el callo se hace autotrofo con respecto a los reguladores. Existe gran controversia en la bibliografía para definir qué proporción de este cambio se debe a las mutaciones y qué proporción se debe al ambiente.

Se considera que un callo es un tejido de crecimiento rápido y fácil de cultivar. Si se van a utilizar los callos como medio para la multiplicación vegetativa de las plantas, aquéllos deben reunir los siguientes requisitos:

1. El potencial regenerativo no se debe perder después de sucesivos repicados, ya que puede desaparecer el potencial de un callo, para formar órganos y embriones (Thomas y Street, 1970), en particular este hecho ha sido demostrado en zanahoria (Syono, 1965a, 1965b, 1965c).

2. Estabilidad genética: El material obtenido debe ser idéntico al inicial. Esto, claramente, no siempre es posible; más detalles acerca de este tema se pueden encontrar en el capítulo 21.

Sobre medios sólidos

En las referencias bibliográficas antiguas, el cultivo de callos estaba casi siempre descrito, sobre medio sólido, ya que los medios líquidos no se habían desarrollado. El cultivo de los callos es generalmente mucho más lento sobre un medio sólido, que sobre un medio líquido que puede ser agitado. Las razones para que existan estas diferencias son:

1. La porción de callo presenta sólo un contacto limitado con el medio sólido y, por lo tanto, puede absorber menos compuestos del medio.

2. El suministro de oxígeno es mejor sobre medios líquidos.

3. Los callos pueden fragmentarse cuando se encuentran en medio líquido, incrementando así su superficie, y, por lo tanto, la de absorción de materiales del medio.

4. En los medios sólidos se producen gradientes, que pueden ser causa de diferenciaciones tempranas, y, por consiguiente, de la inhibición del crecimiento del callo.

En medios líquidos

Los matraces Erlenmeyer colocados sobre un agitador rotatorio se han convertido en un medio muy usual para la propagación de callos. El crecimiento de los callos en medio líquido y las condiciones que se requieren para el mismo, han sido descritos en detalle en el manual escrito por Street en 1973. En lugar de intentar resumir la extensa literatura que existe sobre el cultivo de callos en medio líquido, hemos preferido indicar algunas reglas generales:

1. Normalmente se utilizan agitadores rotativos, para impedir la pérdida del medio de crecimiento líquido, cuando los matraces alcanzan altas velocidades.

2. Los matraces nunca se deben llenar más de un 20-30% de su capacidad total.

3. La cantidad de medio en el matraz se puede reducir, siempre que se siembren menos células o agregados celulares.

4. En general se considera que la velocidad de giro debe situarse entre 80 y 100 rpm, aunque a veces se utilizan velocidades más bajas (40) o más altas (120).

5. El crecimiento de las células, callos, etc., generalmente se produce de la siguiente forma: Inicialmente (fase de latencia) no existe prácticamente crecimiento. Después éste aumenta de forma exponencial, para hacerse después lineal, y caer posteriormente hasta detenerse (Street, 1973).

6. La producción rápida de células en los cultivos en suspensión es proporcional a la densidad celular, en el momento de inicio del cultivo.

Se puede encontrar más información sobre el crecimiento en medios líquidos (cultivos de carga intermitente, renovación del medio, cultivos continuos, tiempo de retención de las células), en el capítulo 11. El cultivo en medio líquido puede ser un cultivo en suspensión (mezcla de células separadas y agregados celulares) o un cultivo de porciones de callo. El que sea de uno u otro tipo, depende en gran manera de la especie vegetal y del tipo de células que se consideren: En el caso de *Anthurium andreanum*, el callo se desarrolla en forma de porciones en el seno del medio líquido (Pierik y Steegmans, 1975c), y resulta muy difícil obtener una suspensión (Fig. 20.14). En cambio el callo de zanahoria se disgrega fácilmente en células y agregados. Tanto unos cultivos como otros son morfológica y/o citogenéticamente heterogéneos.

Figura 20.14 El callo de *Anthurium andreanum* cultivado en un medio líquido, sigue desarrollándose en forma de agregados. Izquierda: genotipo en el que el callo se fragmenta; Derecha: genotipo con una fragmentación más moderada. Fotografía tomada 12 semanas después del aislamiento

Regeneración de órganos y embriones

Introducción

Dependiendo de la especie vegetal y de donde se ha originado el callo, se puede producir la formación de órganos adventicios y/o la formación de embriones que reciben el nombre de somáticos. El tejido calloso que se origina de material juvenil y/o herbáceo, se regenera mucho mejor que el que procede de material adulto y/o leñoso. En el caso de las gimnospermas, de hecho, sólo se puede utilizar material juvenil para la regeneración (David, 1982). Thomas *et al.* (1979), en su artículo de revisión, indican una larga lista de plantas que pueden producir regeneración a partir de protoplastos, células o tejido calloso. También existe un gran número de plantas leñosas que son capaces de producir regeneración, por ejemplo *Coffea canephora* (Staritsky y Van Hasselt, 1980; Pierson *et al.*, 1983), *Ilex aquifolium, Coffea arabica, Corylus avellana, Populus sp.* (Pierik, 1979), *Citrus sp.* (Litz, 1985).

Como ya se ha mencionado antes, la capacidad regenerativa de las células y del tejido calloso, se puede reducir o perder completamente, si el crecimiento continúa durante mucho tiempo. No se conoce la razón por la que ocurre esto, como tampoco se sabe por qué algunas plantas son capaces de formar órganos adventicios, pero no embriones, mientras que otras se comportan exactamente de manera opuesta. Algunas especies son capaces de regeneración, bien por vástagos, bien por embriones adventicios (Thomas y Davey, 1975).

No resulta fácil dar unas orientaciones rápidas en el caso de la regeneración de órganos. En algunos casos, los reguladores juegan el papel principal en la regeneración, mientras que en otros la regeneración puede comenzar de forma espontánea o puede ser inducida por la ausencia de reguladores.

Regeneración de órganos

Los callos son generalmente más capaces de regenerar raíces, que los vástagos adventicios (Thomas y Davey, 1975). La formación de raíces generalmente tiene lugar en medios con concentraciones de auxina relativamente altas, pero concentraciones de citokinina bajas (Fig. 20.15). Esto concuerda con las condiciones de regeneración de explantos, tal y como se describen en el apartado Regeneración de explantos. La iniciación de los primordios radicales generalmente requiere una concentración de auxina más alta que la que se necesita para el posterior crecimiento de los mismos primordios. Las raíces y los vástagos se forman por lo general de forma completamente independiente unos con respecto a los otros, es decir, no existe conexión entre ellos, aunque se originen a partir de un callo, al mismo tiempo.

La formación de vástagos adventicios puede producirse sobre el callo, si existe una baja concentración de auxina y una alta concentración de citokinina. La citokinina BA es la más eficaz a la hora de inducir la formación de vástagos adventicios. En algunas ocasiones se producen raíces adventicias en la base de los vástagos adventicios.

La formación de vástagos adventicios sobre el callo, posiblemente está influida por factores mucho más complejos que los que hasta ahora se conocen. En algunos casos una elevada concentración de sal (¿que inhibe el crecimien-

Figura 20.15 Arriba: cultivo de callo de *Freesia* "Ballerina", sobre un medio nutritivo conteniendo 5 mg l^{-1} de PBA y 0,1 mg l^{-1} de NAA (no hay formación de órganos). Abajo: cultivo sobre un medio conteniendo 0,5 mg l^{-1} de PBA y 1 mg l^{-1} de NAA (se produce una abundante formación de raíces). Tomado de Bajaj y Pierik (1974). Fotografía tomada 12 semanas después del aislamiento

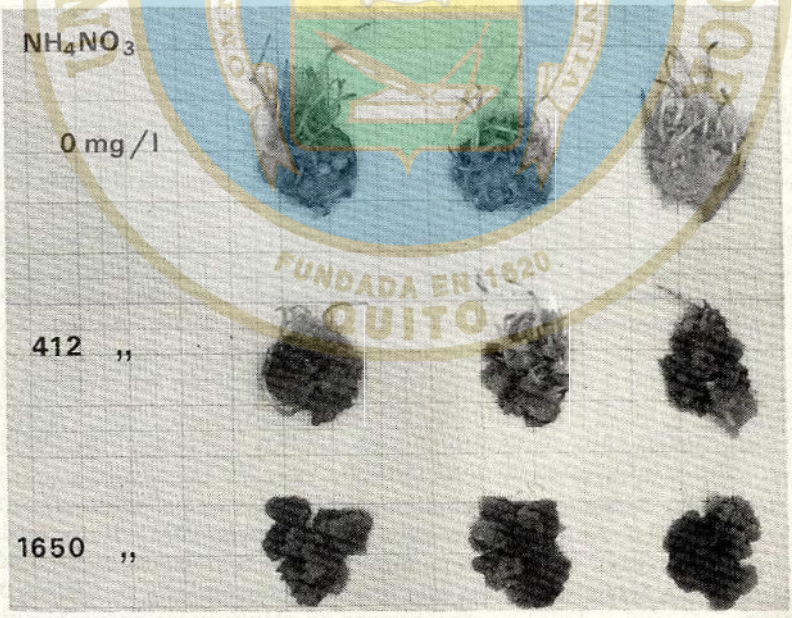


Figura 20.16 Estímulo de formación de brotes adventicios sobre callos de *Anthurium andraeanum* por la acción de bajos niveles de nitrato amónico, en el medio de cultivo (Pierik, 1976a). Fotografía tomada 14 semanas después del aislamiento

to?), puede inducir la regeneración. La elevación en la concentración de amonio puede estimular la organogénesis; Pierik y Steegmans (1976) demostraron que en el caso de *Anthurium andreanum* una disminución de la concentración de amonio estimuló la formación de vástagos adventicios, sobre callo (Fig. 20.16)

Recientemente, Rathore y Goldsworthy (1985) demostraron que corrientes eléctricas del orden de 1-2 A, multiplican por cinco la capacidad de diferenciación de vástagos, en los cultivos de callo de *Nicotiana tabacum*; los mismos autores observaron también que la corriente eléctrica estimula el crecimiento de la raíz y el vástago. Se ha sugerido que este efecto se puede deber a que las corrientes artificiales controlen a las corrientes naturales, que fluyen a través de las células vegetales.

Regeneración de embriones

Cuando los embriones se regeneran a partir de células o tejidos somáticos (haploides, diploides, etc.), se habla de una embriogénesis somática; ésta puede considerarse como opuesta a la embriogénesis cigótica, que es el resultado de la fertilización de una célula gamética. En la literatura, los embriones somáticos son denominados de diferentes formas: estructuras de tipo embrionario, embriones vegetativos o adventicios, embrioides; y al proceso de su formación se le denomina embriogénesis adventicia, asexual o somática (Sharp *et al.*, 1982).

En 1958 Reinert y Steward mostraron por primera vez una embriogénesis somática, sobre callos y cultivos en suspensión de *Daucus carota* (zanahoria). Steward (1958) descubrió que el desarrollo *in vitro* del embrión somático, presentaba grandes semejanzas con la embriogénesis cigótica, que se produce en un endospermo líquido; el mismo autor propuso la idea de que la expresión de la totipotencia era el resultado del aislamiento, tanto espacial como fisiológico de una célula o grupo de células. El vio un paralelismo entre el aislamiento del gameto femenino fertilizado, y el de una célula somática *in vitro*. El efecto estimulante sobre la embriogénesis somática, del endospermo líquido del coco (leche de coco), encaja bien con la idea anterior: el gameto femenino se encuentra situado en el centro del endospermo, que constituye su medio nutritivo (Steward *et al.*, 1964). Además de la zanahoria, otros miembros de la familia de las Umbelíferas (apio y comino) se han utilizado tradicionalmente para estudiar la embriogénesis somática *in vitro* (Thomas *et al.*, 1979). Aunque Steward (1958) utilizó la leche de coco para la inducción de la embriogénesis somática en zanahoria, Reinert (1959) demostró que podía también ser inducida de forma satisfactoria, utilizando un medio sintético. A pesar de las múltiples semejanzas que existen entre la embriogénesis cigótica y la somática, también se puede encontrar diferencias obvias (Tisserat *et al.*, 1979).

El desarrollo de embriones somáticos y plántulas, a partir de un explanto (Fig. 20.17) se puede resumir como sigue (Kohlenbach, 1977). En primer lugar se deben desdiferenciar las células ya diferenciadas, y posteriormente iniciar la división. De esta forma se origina una masa no diferenciada de células parenquimáticas vacuoladas. Estas se transforman en células ricas en citoplasma que se hacen embriogénicas por la influencia de la auxina. Las células, embriogénicas, a partir de las cuales se originan los embriones, muestran una serie de

características comunes, típicas de las células en proceso de división rápida. Entre ellas se pueden citar, un tamaño pequeño, contenido citoplásmico denso, núcleo grande, con nucleolos grandes y prominentes, vacuolas pequeñas, y una gran cantidad de granos de almidón. Su histoquímica y ultraestructura sugieren una actividad metabólica y una síntesis de RNA intensas (Williams y Maheswaran, 1986). El desarrollo de un embrión, a partir de una célula embriogénica, se consigue generalmente sin la presencia de auxinas en el medio.

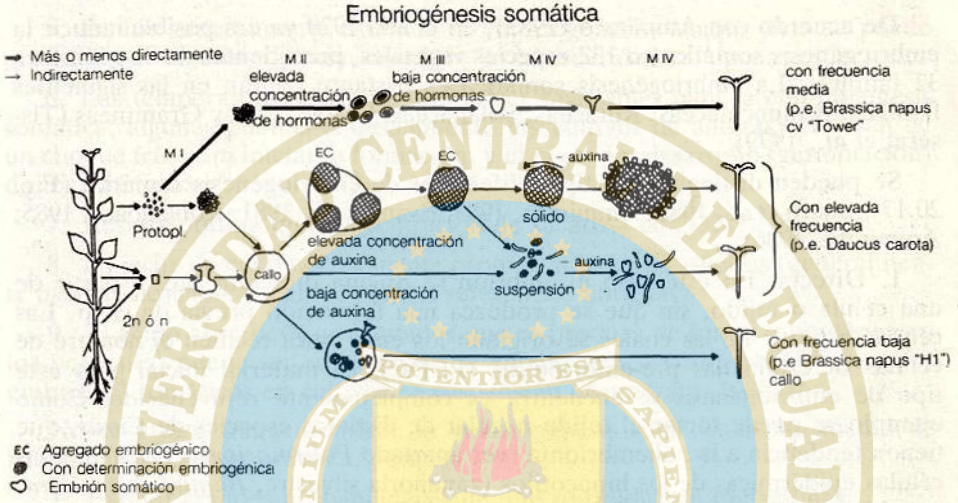


Figura 20.17 Ilustración esquemática de la embriogénesis somática (Kohlenbach, 1985). En la primera línea (MI-MIV), los embriones somáticos se forman más o menos directamente (sin que aparezca una fase de callo), a partir de protoplastos foliares (protopl.) embriogénicamente no determinados; la formación de los embriones es inducida por una elevada concentración de hormonas (MII), mientras que su desarrollo (MIII) se produce con una concentración hormonal baja. Las notaciones MI-MIV corresponden a cuatro etapas, con medios específicos diferentes. En la parte inferior de la figura, el callo (originado a partir de protoplastos, o de un cultivo de explantos) es el punto de arranque de la embriogénesis; la concentración de auxina regula la inducción de los llamados agregados embriogénicos (EC); la embriogénesis puede ser inducida por baja o alta concentración de auxinas, o como resultado de un cultivo en suspensión; el desarrollo de los embriones, a partir de los agregados embriogénicos, generalmente tiene lugar reduciendo o eliminando la concentración de auxina

La producción de embriones somáticos en suspensiones celulares y callos (Kohlenbach, 1978; Tisserat *et al.*, 1979) puede tener lugar endógenamente (en el interior), o de forma exógena (en la periferia); también se ha descrito la embriogénesis a partir de tejido nucelar, hipocotilos de plantas en germinación y embriones somáticos. Tisserat *et al.* (1979) y Sharp *et al.* (1982) encontraron que los materiales que a continuación se indican, constituían un buen material inicial para la embriogénesis somática: porciones de flores, embriones cigóticos, anteras, granos de polen y tejidos de endospermo. Partiendo de la base de que los embriones se originan de masas de tejido nodulares o con aspecto de yemas, se llegó a la conclusión de que la embriogénesis somática no era unicelular en su origen. Sin embargo, estudios críticos posteriores han demostrado que la embriogénesis somática tiene lugar partiendo de una célula única,

que se divide para originar un complejo celular de tipo pro-embrionario (Haccius, 1978). De esta forma, tanto los embriones cigóticos como los somáticos quedan incluidos en la definición de Haccius (1978): un embrión vegetal es un individuo nuevo, que se origina a partir de una única célula y que no tiene conexiones vasculares con el tejido materno. Sin embargo, esta afirmación de Haccius de que los embriones somáticos son unicelulares en su origen, se ha convertido nuevamente en objeto de controversia. Para un mayor detalle sobre este tema, consultar la obra de Williams y Maheswaran (1986).

De acuerdo con Ammirato (1983), en el año 1979 ya era posible inducir la embriogénesis somática en 132 especies vegetales, procedentes de 81 géneros y 32 familias. La embriogénesis somática es bastante común en las siguientes familias: Ranunculáceas, Rutáceas, Solanáceas, Umbelíferas y Gramíneas (Tisserat *et al.*, 1979).

Se pueden distinguir dos tipos diferentes de embriogénesis somática (Fig. 20.17) (Sharp *et al.*, 1982; Ammirato, 1983; Evans *et al.*, 1981; Kohlenbach, 1985; Ammirato, 1986):

1. Directa: En este caso el embrión se origina directamente, a partir de una célula o tejido, sin que se produzca una formación previa de callo. Las células a partir de las cuales se originan los embriones reciben el nombre de células determinadas pre-embriónicas (PEDC). El material inicial para este tipo de embriogénesis se encuentra ya completamente rejuvenecido. Como ejemplo se puede tomar el tejido nucelar de distintas especies de *Citrus*, que tienen tendencia a la poliembrionía (ver apartado *Poliembrionía nucelar*), y las células epidérmicas de los hipocotilos (zanahoria silvestre, *Ranunculus sceleratus, Linum usitatissimum, Brassica napus "TOWER"*).

2. Indirecta: En este tipo de embriogénesis, primero se forma un callo, a partir del cual se forman después los embriones. Las células a partir de las cuales se forman los embriones, reciben el nombre de células determinadas embriogénicas, y producen embriones cuando son inducidas a ello (células determinadas embriogénicamente inducidas IEDS). En este tipo de embriogénesis, las células diferenciadas deben ser primero desdiferenciadas, para ser redeterminadas como células embriogénicas después de la división celular. Las auxinas (y a veces las citokininas) tienen una gran importancia en este proceso. Con este método, en primer lugar se debe producir un rejuvenecimiento completo. Ejemplos de este caso son: el floema secundario de la zanahoria, los explantos foliares de *Coffea arabica, Petunia hybrida* y *Asparagus officinalis*.

A continuación se dan algunas reglas generales para la inducción de embriones somáticos (Thomas *et al.*, 1979; Ammirato, 1983; Kohlenbach, 1978; Sharp *et al.*, 1982; Tisserat *et al.*, 1979; Raghavan, 1986).

1. Con frecuencia se precisa una elevada concentración de auxina para la inducción embrionaria; sin embargo, para el desarrollo del embrión, se debe bajar la concentración de auxina, y en algunos casos retirar completamente este regulador del medio. La auxina 2,4-D juega un papel especialmente importante, sobre todo en el caso de las gramíneas, y en particular en los cereales. Las citokininas no juegan un papel importante en este proceso.

2. Las giberelinas y el etileno por lo general inhiben la embriogénesis.

3. Las posibilidades de conseguir la embriogénesis son mayores cuando se utilizan callos que proceden de plantas juveniles. En el caso de los *Citrus*, solamente es posible realizar el proceso a partir de tejido nucelar.

4. El nitrógeno reducido, en la forma de iones amonio, puede ser un factor importante en la embriogénesis. El potasio estimula la embriogénesis, especialmente si falta nitrógeno. Las concentraciones elevadas en calcio son inhibidoras, mientras que concentraciones elevadas en sal son estimulantes, para la formación de embriones.

5. La luz generalmente estimula la embriogénesis, aunque ésta se puede producir con baja irradiancia, o incluso en la oscuridad en algunas especies.

6. Las temperaturas elevadas suelen ser favorables para la embriogénesis somática; algunas plantas (especialmente los cultivos de anteras) precisan de un choque frío para iniciar la formación, y el posterior desarrollo (germinación) de los embriones.

7. Resulta óptima una concentración de sacarosa de 2-3%.

8. La leche de coco normalmente promueve la embriogénesis (generalmente estas indicaciones aparecen en las referencias antiguas).

9. El ácido abscísico, un inhibidor que se produce de forma espontánea en los vegetales, puede ser responsable de algunos efectos sorprendentes, en los embriones somáticos en cultivos en suspensión (Ammirato, 1986a).

No se utiliza frecuentemente la embriogénesis somática como medio de multiplicación, en la práctica, porque:

1. Existen grandes probabilidades de que se produzcan mutaciones.

2. El método es generalmente difícil.

3. Con repicados sucesivos, la posibilidad de perder la capacidad regenerativa se hace mayor.

4. La inducción de embriogénesis es con frecuencia muy difícil, si no imposible en el caso de muchas especies vegetales.

5. Cuando se produce la embriogénesis somática, es frecuente que se presente una profunda dormición, que puede resultar muy difícil de romper. (Vilaplana-Marshall y Mullins, 1986).

La embriogénesis somática se ha llevado a cabo con un elevado índice de éxito en una serie de plantas. Por ejemplo, se puede clonar la palmera de aceite (Jones, 1983; Blake, 1983; Litz *et al.*, 1985), en gran escala, en el momento actual, por formación de callos, embriones y vástagos. Las palmeras así obtenidas no muestran una variabilidad genética digna de ser tenida en cuenta. Aunque se pueden encontrar células poliploides en algunas ocasiones, lo cierto es que la embriogénesis tiene lugar, casi exclusivamente, a partir de células diploides. Sin embargo, no todos los genotipos de la palmera del aceite pueden ser clonados *in vitro*. La propagación *in vitro* tiene importantes ventajas en el caso de la palmera del aceite, ya que en esta especie es imposible la clonación *in vivo*. Gracias a la multiplicación *in vitro*, se pueden iniciar plantaciones, a partir de plantas seleccionadas por su elevada productividad y resistencia a las enfermedades (Carantino, 1983); por otro lado también se debe tener en cuen-

ta el interés de las plantaciones multiclonales de palmera de aceite (Staritsky, comunicación personal). Teniendo en cuenta la cantidad de investigación que se está desarrollando en este momento, es de esperar que pronto se disponga de métodos para la propagación *in vitro* de otras palmeras, como la palmera datilera, el cocotero, o el sagú, los métodos que se empleen, probablemente serán semejantes a los utilizados hasta ahora.

La embriogénesis somática a partir de células haploides y tejidos se trata ampliamente en el capítulo 23. La investigación reciente sobre embriogénesis somática se encuentra resumida en el libro de Henke *et al.* (1985), y en un artículo de revisión de Williams y Maheswaran (1986). El cultivo de células y protoplastos y la embriogénesis somática en los cereales se encuentran resumidos en un libro de Bright y Jones (1985).

Poliembrionía nucelar

La poliembrionía muchas veces se produce *in vivo*, en muchas especies de *Citrus*: En la semilla se encuentra un embrión cigótico (procedente de la fusión de los gametos) y también una serie de embriones, formados vegetativamente (los llamados embriones adventicios). Estos embriones adventicios se producen a partir de células del tejido nucelar y/o de los tegumentos, por lo que se les denomina embriones nucelares. (Button y Kochba, 1977; Pierik, 1975; Rangan *et al.*, 1968; Rangaswamy, 1981; Sharp *et al.*, 1982). En el género *Citrus*, la nucela puede ser descrita como una masa de tejido juvenil, que posee una elevada capacidad de regeneración. La poliembrionía nucelar ha sido descrita hasta ahora en 16 familias (Rangaswamy, 1981).

En 1958 Rangaswamy (1981) descubrió que los tejidos de la nucela de *Citrus* aislados *in vitro*, se obtienen casi siempre después de que el callo ha sido inducido a formar embriones adventicios, a partir de los cuales se desarrollan las plántulas. El género *Citrus* es el más importante, por lo que se refiere a la producción de poliembrionía nucelar *in vitro* (una forma de embriogénesis somática). Actualmente se ha descubierto que la poliembrionía nucelar no sólo se produce en aquellas especies que exhiben una poliembrionía natural, sino también en las especies monoembrionarias, que solamente producen un embrión en condiciones naturales. Sin embargo, las especies monoembrionarias de *Citrus*, como la naranja Shamouti, reaccionan peor que las especies que normalmente son poliembrionarias (Sharp *et al.*, 1982). La inducción *in vitro* de poliembrionía en *Citrus* es posible tanto con primordios seminales fertilizados como sin fertilizar, y la embriogénesis puede tener lugar directa o indirectamente. La formación del embrión en *Citrus* es estimulada por el NAA, Kinetina y mezclas complejas de sustancias (leche de coco, extracto de levadura y extracto de malta). Litz y colaboradores han escrito recientemente una revisión sobre la propagación de las plantas del género *Citrus*.

La propagación vegetativa de *Citrus* por poliembrionía nucelar tiene las siguientes ventajas (Button y Kochba, 1977; Button y Borman, 1971a, b, c):

1. Se consigue la propagación masiva de especies monoembrionarias.

2. Se pueden conseguir plantas libres de virus, ya que los virus generalmente no se transmiten durante la poliembrionía.

3. El cultivo *in vitro* puede ser ventajoso, ya que se puede producir la inducción y selección de mutantes.

4. Si el rejuvenecimiento se produce como resultado de la embriogénesis, esto se traduce generalmente en un crecimiento más vigoroso. El rejuvenecimiento se puede considerar a veces como una desventaja, ya que frecuentemente se precisan muchos años, antes de que se produzca la floración.

El mango (*Mangifera indica*) también puede presentar embriogénesis somática, a partir de la nucela de primordios seminales poliembrionarios. La regeneración de embriones somáticos resulta fácil para los cultivares altamente poliembrionarios, aunque también se puede realizar con cultivares monoembrionarios (Litz *et al.*, 1985), pero en este caso el porcentaje de éxito no es tan elevado. Litz *et al.* (1985) indicaron también que otros árboles frutales tropicales pueden demostrar el potencial morfogenético de la nucela de especies con poliembrionía natural.

Regeneración de plantas a partir de células aisladas

Inicialmente resultaba muy difícil inducir la división celular en células aisladas *in vitro*. Muir *et al.* (1954, 1958) fueron los primeros en cultivar con éxito células aisladas de tabaco; colocaban las células aisladas sobre papel de filtro, que a su vez se situaba sobre un callo madre. A este método se le denomina en la literatura cultivo nodriza, ya que el callo madre suministra a la célula aislada las hormonas y nutrientes necesarios, a través del papel de filtro, facilitando el crecimiento y división celulares. Casi inmediatamente después de este descubrimiento, Bergmann (1960) desarrolló un método mucho mejor. Filtró un cultivo en suspensión, para obtener una población de células separadas, sobre las que podía ejercer un cierto control. Estas células se mezclaban con un medio nutritivo y agar; el medio aún caliente (y fluido) se vertía en forma de una capa fina sobre una caja de Petri. Utilizando este método Bergmann (1960) fue capaz de conseguir la división celular y la formación de callo, en aproximadamente el 20% de las células de tabaco y de judía. Este método enseguida se hizo muy popular, y aún hoy se encuentra en uso. En los trabajos primitivos, los medios nutritivos utilizados para el cultivo de células aisladas, contenían generalmente dos poderosos estimuladores de la división celular: 2,4-D y leche de coco. En trabajos posteriores se han utilizado medios sintéticos.

Benbadis (1968) logró también el cultivo de células aisladas, en el seno de una gota suspendida del porta-objetos de un microscopio. Sin embargo, este método presentó dificultades, y se recurrió a hacer crecer las células en las llamadas micro-cámaras, en las cuales las células se siembran sobre agar, que a su vez está próximo a un callo madre, que induce la división celular (Street, 1973).

Se utilizan los siguientes sistemas como material inicial para el cultivo de células aisladas (Thomas y Davey, 1975; Thomas *et al.*, 1979):

1. Cultivos en suspensión, filtrados a través de un tamiz fino, tejido de nylon o gasa, para conseguir una suspensión celular.

2. Callo de otros tejidos, que se separa en células individuales, de forma

mecánica o con la ayuda de la enzima pectinasa. Este método no se utiliza mucho en la actualidad.

3. Tejidos como la epidermis inferior, que depués de un tratamiento con enzimas originan protoplastos (células sin pared celular). Posteriormente aquellos forman la pared celular. En el capítulo 24 se trata el tema del aislamiento y cultivo de los protoplastos.

4. Granos de polen.

El fraccionamiento de las células cultivadas se consigue, bien utilizando sus diferencias de tamaño (por ejemplo tamizando a través de lechos de esferas de vidrio o tamices de nylon o acero inoxidable), o bien diferencias en peso específico (por ejemplo utilizando centrifugación en grandiente de densidad discontinuo, en solución de potencial osmótico adecuado). Estos dos métodos han sido descritos recientemente por Fujimura y Komamine (1984).

La eficiencia de placa (establecimiento del cultivo a partir de células aisladas) viene dada por el porcentaje de células sembradas que originan una colonia de callo. Este proceso depende de muchos factores: genotipo, densidad celular de las células separadas, velocidad de división celular del material inicial, edad del cultivo en suspensión, presencia del callo madre, composición del medio nutritivo, etc.

La regeneración de una planta a partir de una célula aislada se realiza de la forma que se indica a continuación. En primer lugar se debe originar una colonia de callo, a partir de la célula. A partir del callo se forman embriones o vástagos adventicios. Se dan más detalles en el apartado Regeneración de órganos y embriones. A continuación se indican algunas plantas importantes, a partir de las cuales se han regenerado plantas completas, partiendo de una célula aislada: *Nicotiana tabacum, Daucus carota, Cichorium endivia, Asparagus officinalis, Brassica napus* (Kartha *et al.*, 1974) y *Citrus sinensis* (Button y Kochba, 1977). Cuando falla la regeneración de una planta, a partir de una célula aislada, se debe generalmente a alguna de las causas siguientes (Thomas *et al.*, 1979):

1. Las células no se desdiferencian y rejuvenecen en suficiente medida.

2. Las células no son totipotentes, cosa que está por lo general genéticamente determinada.

3. Se desconocen los factores que inducen la embriogénesis y la formación de órganos.

Semillas sintéticas

Para conseguir que la producción de embriones somáticos sea aplicable en la práctica, se debe proveer un sistema de presentación, que permita la supervivencia después de la "siembra", el desarrollo posterior (para el que se precisan nutrientes), y finalmente la germinación. Para conseguir esto, los embriones formados *in vitro* son protegidos por una cubierta, y en estas condiciones se les denomina semillas artificiales (Demarly, 1986; Redenbaugh *et al.*, 1986; Gray, 1981, 1986).

Se han desarrollado dos sistemas para el manejo automático de estas semillas sintéticas.

1. Encapsulación (Redenbaugh *et al.*, 1986). El embrión somático se recubre con un gel que contiene nutrientes. Se ha desarrollado ya una máquina de encapsular, que puede producir y clasificar 6.000 cápsulas por hora, conteniendo cada una de ellas un único embrión.

2. Sembrando los embriones somáticos por el método de siembra fluida (Gray, 1981, 1986). Este proceso ha sido desarrollado por casas productoras de semillas, para poder sembrar éstas pre-germinadas, con lo que se consigue una germinación más homogénea en el campo. En este caso, los embriones son también envueltos en un gel, que contiene algunos aditivos, antes de ser sembrados en el suelo.

La producción de "semillas" a base de recubrir los embriones, y la consiguiente obtención de plantas, a partir de dichos embriones encapsulados, no resulta sencilla, por las razones que exponemos a continuación (Demarly, 1986; Redenbaugh *et al.*, 1986; Gray, 1986):

1. El desarrollo de una semilla artificial, estable durante varios meses, implica la utilización de procedimientos físicos y químicos para conseguir un embrión quiescente.

2. La semilla artificial necesita protección contra la desecación, cuando se almacena en condiciones de sequedad. Si se produce una deshidratación la semilla puede entrar en dormición. Los embriones deben ser protegidos también, y estabilizados durante el transporte, almacenaje y siembra (cosa que ocurre también con las semillas normales).

3. La obtención de plantas, a partir de embriones somáticos encapsulados, se realiza frecuentemente en baja proporción, debido a:

— Formación incompleta de los embriones.
— Dificultad para frenar el crecimiento.
— Dificultad para producir un endospermo artificial en el interior de la cápsula (el embrión precisa nutrientes). Kitto y Janic (1985, 1985a) han descrito tratamientos endurecedores (pretratamiento de los cultivos embriogénicos en suspensión con sacarosa 12%, alta densidad de inóculo, baja temperatura y ABA), para aumentar la supervivencia de embriones de zanahoria encapsulados.

4. El embrión debe estar protegido (por ejemplo, contra micro-organismos) por antibióticos y fungicidas. Sin embargo, en estadios posteriores del desarrollo, la presencia de micro-organismos puede constituir una ventaja (micorrizas).

Los problemas inherentes a la producción y aplicación de semillas sintéticas están aún lejos de ser resueltos. Las semillas sintéticas, además, son más caras que las semillas ordinarias, aunque esa diferencia de precio inicial puede ser más tarde compensada (Demarly, 1986):

1. Por la obtención de un producto de mayor valor, debido a la selección de genotipos de gran valor.

2. Porque de esta manera no es necesario mantener las dos líneas, masculina y femenina, para la obtención de la semilla.

3. Puede hacerse innecesaria la investigación para obtener esterilidad masculina.

4. Se hace posible la "producción de semillas" en especies vegetales donde no se forman (auténticas) semillas.

5. Porque la mejora vegetal está cambiando profundamente (por ejemplo, por la aplicación de la manipulación genética).

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

21
VARIACION SOMACLONAL

La mayor desventaja de algunos métodos de propagación vegetativa *in vitro* (formación de vástagos adventicios, cultivo de callos, cultivo de células en suspensión, cultivo de protoplastos) consiste en el riesgo de que se produzcan mutaciones y variaciones genéticas. El término variación genética se utiliza para describir la variación heredable, que se transmite por vía sexual a la descendencia de plantas obtenidas a partir de cultivos de células; el término mutante se reserva para el caso especial, en el que un carácter se transmite meióticamente, de acuerdo con las leyes, bien conocidas, de la herencia; se utiliza el término variante cuando no se conoce la naturaleza del cambio(s) heredable(s) (Meins, 1983). Cuando se observa una variación genética en plantas que han sido regeneradas *in vitro* (generalmente como resultado de inestabilidad genética), se utiliza el término de variación somaclonal (Scowcroft, 1985). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la variación y las mutaciones se pueden producir también en la propagación *in vivo* (Orton, 1984). En el caso de *Saintpaulia ionantha* y *Begonia* × *hiemalis* (un triploide) se pueden producir mutaciones, por la formación de vástagos adventicios, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Si se añade citokinina, como ocurre generalmente *in vitro*, se incrementan las posibilidades de que se produzcan mutaciones (Scowcroft, 1985; Ando *et al.*, 1986).

La aparición de mutaciones no resulta siempre fácil de determinar, ya que:

1. La expresión de las mutaciones depende a menudo, en gran medida, de las condiciones ambientales.

2. Frecuentemente ocurren micro-mutaciones que son difíciles de identificar.

3. Con frecuencia se necesitan métodos citológicos para la identificación de los mutantes, lo que implica técnicas especializadas y laboriosas. Las técnicas citológicas aisladas pueden no ser adecuadas para la identificación de algunas micro-mutaciones, y entonces es preciso utilizar otras técnicas, como la electroforesis para identificar iso-enzimas.

Además de la variación somaclonal, se puede presentar también una variación epigenética (como resultado de un cambio en la expresión genética), esta

última es reversible y no hereditaria. Indicamos algunos ejemplos de variación epigenética:

1. En el caso de la propagación *in vitro* existe la posibilidad de obtener plantas libres de virus, bien por el cultivo de meristemos o por la formación de vástagos adventicios. Las plantas libres de virus pueden ser completamente diferentes en su aspecto externo de las plantas que contienen virus.

2. Se pueden obtener diferentes fenotipos como consecuencia de la utilización de citokininas o auxinas (un elevado grado de ramificación, fasciación, engrosamiento, etc.); estos cambios no suponen la existencia de mutaciones, aunque sí tienen su apariencia.

3. Las plantas pueden presentar un aspecto poco normal, como resultado de la enfermedad fisiológica denominada vitrificación.

4. Las plantas pueden sufrir cambios (por ejemplo, en el número y morfología de los estomas, o en la composición de las ceras cuticulares), debido al ambiente que se produce en las condiciones *in vitro* (por ejemplo, una elevada humedad relativa).

5. También hay que tener en cuenta que, una vez producida la regeneración, pueden aparecer fenotipos con características morfológicas diferentes de las del material inicial, y que tienen la apariencia de mutaciones; dependiendo de la posición del explanto sobre la planta madre se pueden regenerar vástagos generativos o vegetativos (Pierik, 1967), a veces los vástagos presentan características juveniles y otras veces adultas (Beauchesne, 1982).

En los últimos años, tanto los investigadores en el área básica, como en la aplicada, están de acuerdo en que los siguientes factores determinan la probabilidad de mutación y su frecuencia durante el cultivo *in vitro*:

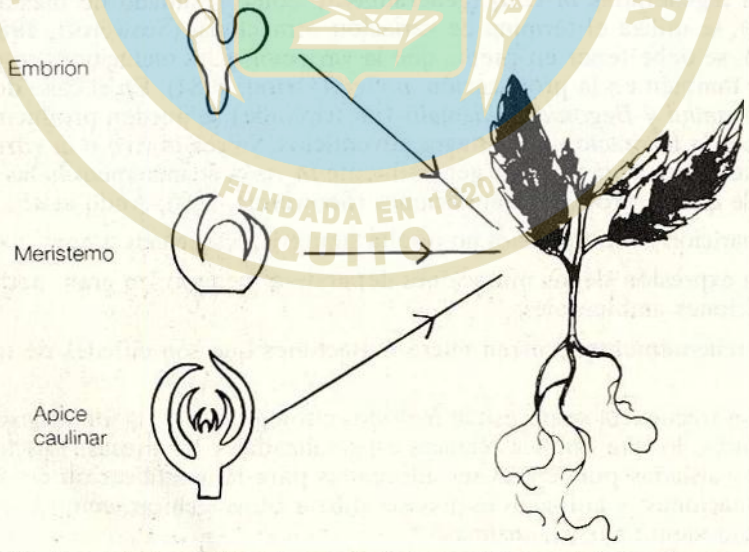


Figura 21.1 La estabilidad genética de una planta se mantiene cuando ésta se forma a partir de un embrión, meristemo, ápice caulinar o yema axilar, y cuando no se produce formación de brotes adventicios o embriogénesis somática

1. El método utilizado en la propagación vegetativa (Fig. 21.1).
2. El que la planta utilizada sea una quimera.
3. El tipo de regulador que se utilice.
4. El tipo de tejido con el que se trabaje.
5. El material inicial.
6. El número de repicados.

Estos puntos se tratan con más detalle a continuación.

El método de propagación vegetativa

En términos generales se puede decir que, cuanto más se rompe la estructura organizativa de una planta, mayor es la posibilidad de que se produzca una mutación. La estabilidad genética es casi seguro que permanece intacta, si la propagación *in vitro* se lleva a cabo utilizando el método de explantos nodales o de yemas axilares. Si se producen vástagos adventicios, como resultado del uso de reguladores, se incrementan las posibilidades de que se produzcan mutaciones; en este hecho influyen los siguientes factores:

1. La forma de producción de los vástagos adventicios. Si un vástago se origina a partir de una única célula, las posibilidades de mutación son mayores que si se origina de un grupo de células. Este hecho ha sido demostrado en el caso de la cebolla (Hussey y Falavigna, 1980) y en *Saintpaulia* (Norris *et al.*, 1983).

2. Si se utiliza una quimera, generalmente se obtienen características diferentes de aquélla, debido al hecho de que los vástagos adventicios suelen originarse a partir de una única célula. Algunos ejemplos clásicos de esto son: La

Figura 21.2 Multiplicación vegetativa *in vitro* de *Neoregelia carolinae* "Flandria". Izquierda: planta experimental quimérica. Derecha: planta obtenida por formación de brotes adventicios *in vitro*, en la que se han perdido las características de la quimera. Se trata de una planta que ya no muestra tres colores, sino que presenta un único color verde homogéneo (Pierik y Steegmans, resultados no publicados)

caña de azúcar (D'Amato, 1978; Tangley, 1986), *Yucca elephantipes* cv. *variegata* (Pierik y Steegmans, 1983a), *Chrysanthemum morifolium* (Earle y Langhans, 1974a, b; Bush *et al.*, 1976; Poisson y Maia, 1974), los tipos Sim de *Dianthus caryophyllus* (Hackett y Anderson, 1967; Dommergues y Guillot, 1973), *Neoregelia carolinae "Flandria"* (Fig. 21.2), *Ananas comosus "variegatus"* (Pierik, Steegmans y Sprenkels, datos no publicados) y *Begonia* "Aphrodite Radiant" (Hakkaart y Versluijs, 1984). George y Sherrington (1984) también indicaron que las siguientes plantas pierden sus características quiméricas *in vitro: Crypthanthus tricolor, Dracaena marginata tricolor, Dracaena warneckii, Cordyline terminalis* "Celestine Queen" y *Hosta decorata.*

3. Existen indicios de que hay una mayor probabilidad de variación somaclonal, especialmente en el caso de las gramíneas, cuando se originan vástagos adventicios en tejido calloso, mientras que existe una probabilidad mucho más pequeña, en el caso de embriogénesis somática a partir de cultivos de callos (Vasil, 1986).

4. El genotipo. Algunas plantas rara vez muestran tendencia a mutar, después de la formación de vástagos adventicios: Muchas plantas bulbosas (azucena, jacinto, *Ornithogalum,* etc.) y la mayor parte de los cultivares de *Saintpaulia.* Sin embargo, en el caso de otras plantas, como los híbridos de *Freesia* (Fig. 21.3, Pierik, datos sin publicar) y *Begonia* "Aphrodite radiant" (Hakkaart y Versluijs, 1984) la proporción de mutantes es elevada. Además ciertos cultivares de algunas plantas (avena, patata, *Begonia* × *hiemalis)* mutan con gran facilidad (Scowcroft, 1985; Evans y Bravo, 1986). Con la formación de vástagos adventicios se puede ver que los tetraploides también pueden producir regeneración, por ejemplo en los híbridos de *Solanum* (Hermsen *et al.*, 1981), *Nico-*

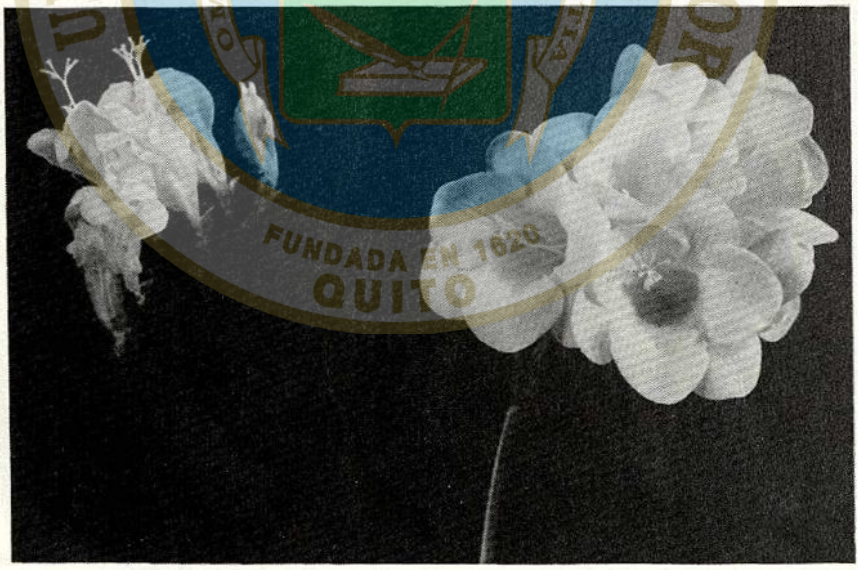


Figura 21.3 Izquierda: inflorescencia de un híbrido de *Freesia* mutado, obtenida por formación de un brote adventicio, sobre un callo, procedente de una yema floral de la planta de *Freesia* que se muestra a la derecha (Van Der Meys, resultados no publicados)

tiana tabacum "Samson" (Dulieu, 1972) y *Kalanchoë blossfeldiana* (Pierik y Karper, datos sin publicar). La variación somaclonal ha sido estudiada extensamente en las siguientes especies de importancia agronómica: maíz, tomate, patata y caña de azúcar (Scowcroft, 1985).

Las mutaciones aparecen frecuentemente durante el cultivo de callos, células y protoplastos (Bayliss, 1980; D'Amato, 1978). Resulta sorprendente que los cultivos de callos son extremadamente estables, desde el punto de vista genético, en algunos casos como la palmera del aceite (Jones, 1983) y *Anthurium andreanum* (Pierik y Steegmans, datos sin publicar). Muy rara vez aparecen mutaciones en *Anthurium andreanum,* incluso después del tratamiento con rayos X. Merece la pena hacer notar que en el cultivo de callos de *Daucus carota, Oryza sativa* y *Triticum aestivum* se producen poliploides y aneuploides, aunque se pueden producir diploides normales por regeneración (D'Amato, 1978); esto demuestra que en el caso de estas plantas, la regeneración puede tener lugar de forma selectiva, a partir de células normales.

Un ejemplo muy notable de inestabilidad genética se puede ver en el cultivar de patata "Russet Burbank"; las plantas que se originan a partir de protoplastos de hoja de este cultivar, se encuentran prácticamente siempre mutadas (Shepard *et al.*, 1980). Se encontraron los mismos resultados con el cultivar de patata Bintje (Ramula *et al.*, 1984). También se ha encontrado inestabilidad genética en *Nicotiana tabacum,* cuando las plantas se regeneran a partir de protoplastos derivados de tejido cotiledonar (Dulieu y Barbier, 1982).

Reguladores

En la bibliografía se ha indicado que el uso de algunos reguladores como el 2,4-D, NAA y citokininas sintéticas produce un fuerte incremento de mutaciones. La kinetina induce de forma selectiva la división celular en células, que son poliploides en su forma natural (*in vivo*) (D'Amato, 1977). El uso de elevadas concentraciones de BA induce fuertes variaciones somaclonales en el tabaco (Evans y Sharp, 1986).

Tipo de tejidos y material inicial utilizado

La probabilidad de que aparezcan mutaciones es menor cuando el material inicial es un tejido indiferenciado (periciclo, procambium y cambium) si se compara con tejido diferenciado como la médula. La diferenciación *in vivo* puede conducir a la producción de células poliploides (D'Amato, 1977).

Se puede decir que el material inicial tiene un efecto importante sobre la producción de mutaciones. Las especies poliploides presentan anormalidades cromosómicas con más frecuencia que las diploides (Scowcroft, 1985).

Número de repicados

El repicado repetido *in vitro* incrementa la posibilidad de que se produzcan mutaciones; esto es así en el cultivo del protocormo de las orquídeas, en la formación de vástagos axilares y adventicios, y especialmente en los cultivos de callos, cultivos en suspensión y de células aisladas. Por esta razón, en la práctica, se evita *in vitro* el repicado sucesivo. Aún no se ha respondido de forma satisfactoria a la pregunta de cuál es el origen de la variante de hoja estriada,

que aparece en *Saintpaulia,* cuando los cultivos de hoja se reciclan de forma continuada. ¿Se trata de una variación genética o epigenética? (Cassells y Plunkett, 1986).

Hasta qué punto la pérdida del potencial regenerativo *in vitro,* especialmente cuando se produce por repicados sucesivos, es la consecuencia de una mutación, es otra pregunta de difícil contestación. A veces existe una correlación importante entre la pérdida del potencial regenerativo y la producción de mutaciones; en el caso de *Daucus carota* se ha demostrado que los cultivos en suspensión se mantienen diploides, no desviándose en el número de cromosomas y permaneciendo totipotentes, mientras que los cultivos de callos son aneuploides y pierden su capacidad regenerativa (Thomas y Davey, 1975). Sin embargo, en otros muchos casos no se encuentra correlación entre la pérdida de la capacidad regenerativa y la producción de mutaciones; por ejemplo, el tabaco mantiene un alto poder regenerativo, a pesar de su inestabilidad genética *in vitro.*

En conclusión debemos admitir que se sabe relativamente poco acerca de las causas de la inestabilidad genética, especialmente en los casos de cultivos de protoplastos, células, cultivos en suspensión y de callos. Es obvio que cuando se induce la división celular, en tejidos diferenciados, para producir cultivos de callos, se incrementan notablemente las posibilidades de mutación. D'Amato resume de la siguiente forma la variabilidad citogenética en el cultivo de callos (cf. Reuther, 1985):

1. Circunstancias del núcleo *in vivo.*
   1.1. Aparición de polisomía debido a endo-reduplicación.
   1.2. Aneusomía, una causa poco frecuente de variación en el número de cromosomas.
   1.3. Mosaicos y quimeras que aparecen de forma natural.
   1.4. Cambios estructurales en los cromosomas y otros cambios genéticos.
2. Procesos nucleares en el momento de la inducción del callo.
   2.1. Mitosis en células diploides y endo-reduplicadas.
   2.2. Endo-reduplicación seguida por mitosis.
   2.3. Fragmentación nuclear (amitosis), seguida de mitosis.
   2.4. Replicación diferencial del DNA (amplificación).
3. Circunstancias del núcleo en los cultivos de callo y en suspensión.
   3.1. Diploidía y estabilidad en el estado diploide.
   3.2. Poliploidía, ya sea pre-existente u originada en el callo.
   3.3. Aneuploidía y ventajas selectivas de algunos cariotipos.
   3.4. Mutaciones cromosómicas y génicas, ya pre-existentes, en principio no originadas en el cultivo.
   3.5. Haploidía. Las células y tejidos haploides son susceptibles de la duplicación de sus cromosomas.

La inestabilidad genética puede ser producida por las siguientes causas (Bayliss, 1980; D'Amato, 1978; Sunderland, 1973; Scowcroft, 1985):

1. Las células poliploides pueden aparecer de forma natural (*in vivo*) en las plantas, posiblemente debido a la endomitosis y/o a la fusión nuclear. Esta endopoliploidía, que ha sido demostrada en tejido medular de tabaco, así como en guisante, puede convertirse, *in vitro,* en una mezcla de células diploides y poliploides. Si se produce una división selectiva en las células poliploides, éstas

llegan a dominar sobre las diploides en sucesivos repicados. Debemos tener en cuenta que la poliploidía también se presenta en cultivos de callos de otras especies como *Crepis capillaris, Daucus carota* y *Helianthus annuus,* en las cuales no se presentan las células poliploides *in vivo.* En otras palabras: La poliploidía se puede producir también *in vitro.* Ejemplos bien conocidos de esto son *Pelargonium zonale, Nicotiana tabacum, Nicotiana alatum, Lycopersicon lycopersicum* y *Medicago sativa* (Evans *et al.,* 1984).

2. Utilizando auxinas y citokininas las células poliploides pueden ser inducidas de forma selectiva a la división (ver 1), este hecho ha sido demostrado en el caso del guisante. Por otro lado las auxinas sintéticas como el NAA y el 2,4-D, cuya acción más importante es producir una proliferación de células no organizadas, pueden dar origen a anormalidades durante la división celular.

3. Cuando se producen células aneuploides (por ejemplo, en *Nicotiana tabacum* y en los híbridos de caña de azúcar), se asume que son el resultado del cultivo *in vitro,* ya que se producen muy pocos aneuploides *in vivo.* Generalmente se entiende que las auxinas NAA y 2,4-D son las responsables de la aparición de aneuploidía *in vitro,* aunque esto aún debe ser verificado.

4. Una explicación sobre la formación de haploides, triploides, pentaploides, etc., puede encontrarse en D'Amato (1977).

La variación somaclonal es especialmente interesante en plantas que muestran poca variación de forma natural, o en las que la variación es difícil o imposible de inducir. La frecuencia de poliploides y aneuploides debe ser mantenida tan baja como sea posible, si se va a utilizar la variación somaclonal como un medio de variación (Hermsen, comunicación personal). Hasta ahora no se ha conseguido una mejora genética importante por medio del cultivo de tejidos, en ningún cultivo de importancia económica, utilizando variantes somaclonales (Vasil, 1986). Los mejoradores vegetales "utilizan" ya la variación somaclonal en algunas especies vegetales, como la caña de azúcar, el tomate y la patata); Orton (1984) dio una lista de plantas de importancia comercial, en las cuales la investigación indica la posibilidad de utilizar la variación somaclonal para la mejora del cultivo. Vilaplana y Mullins (1986) produjeron vides, a partir de embriones somáticos, que exhibían una variación somaclonal de potencial interés en viticultura, sin embargo, los bajos rendimientos dificultaron su utilización.

Se puede encontrar más información sobre variación somaclonal en los siguientes artículos de revisión: Flick y Evans (1983a); Larkin y Scowcroft (1981, 1985); Maliga (1984); Orton (1983, 1984); Thomas (1984); D'Amato (1977, 1978, 1985); Bayliss (1980); Earle y Demarly (1982); Evans *et al.* (1983); Flick *et al.* (1983); George y Sherrington (1984); Reisch (1983); Mestre y Benbadis (1985); Cassells (1985); Evans y Sharp (1986).

En los últimos años los investigadores han dedicado un creciente esfuerzo al aislamiento de mutantes, a partir del cultivo de tejidos vegetales (sin aplicar ninguna selección), como resultado de la variación somaclonal. Daub (1986) ha enumerado una serie de estudios, en los que se han obtenido plantas resistentes a determinadas enfermedades sin necesidad de selección. Para obtener mayores detalles, sobre el aislamiento de mutantes, a partir de cultivos preseleccionados con toxinas o patógenos, el lector debe consultar el Apartado Inducción de mutación *in vitro.*

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

22
FERTILIZACION EN TUBO DE ENSAYO

La tarea del mejorador puede encontrar dificultades por alguna de las siguientes causas: el grano de polen no llega a germinar sobre el estigma, el crecimiento del tubo polínico en el estilo se detiene de forma total o parcial, no se lleva a cabo la fertilización, la célula huevo no se desarrolla *in vivo*, produciéndose el aborto, o finalmente se produce la abscisión del ovario de forma prematura (Rao, 1965; Rao y Rangaswamy, 1972). Si no se produce la fertilización, después de la autopolinización o de la polinización cruzada, se habla de autoincompatibilidad o de incompatibilidad cruzada respectivamente. En algunos casos el mejorador debe recurrir a procedimientos especiales, para conseguir la fertilización, por ejemplo, fertilización del primordio seminal (el polen se pone en contacto de forma artificial con el primordio seminal).

Hasta 1962 no se pensó en la fertilización *in vitro*, en los casos en los que ésta no era posible *in vivo*. A pesar de que la investigación desarrollada en este área no ha sido muy extensa, se han encontrado algunos ejemplos interesantes de fertilización en tubo de ensayo. Damos a continuación una breve panorámica de este trabajo, basándonos en los siguientes artículos de revisión: Rao, 1965; Rao y Rangaswamy, 1972; Rangaswamy, 1977; Yeung *et al.*, 1981; Zenkteler, 1980; Collins *et al.*, 1984. Se puede encontrar una lista extensa de las especies y géneros vegetales, en los que se ha llevado a cabo la fertilización *in vitro* en los trabajos siguientes: Pierik (1979), Collins *et al.* (1984), y Bhojwani *et al.*, (1986).

La fertilización *in vitro* es de especial importancia si la incompatibilidad se encuentra en el estigma o en el estilo. La fertilización *in vitro* puede tener lugar de tres formas diferentes:

1. Fertilización estigmática (Fig. 22.1). En este método, una flor emasculada se aisla *in vitro*, después de ser esterilizada externamente. Se sitúa entonces sobre el estigma polen procedente de una antera madura (previamente esterilizada en su exterior). Este método, que es semejante a la fertilización *in vivo*, se puede utilizar, por ejemplo, si los ovarios se desprenden de forma prematura, produciéndose así la falta de descendencia. Con este tipo de fertilización se han conseguido éxitos en las especies siguientes: *Nicotiana rustica, Nicotiana*

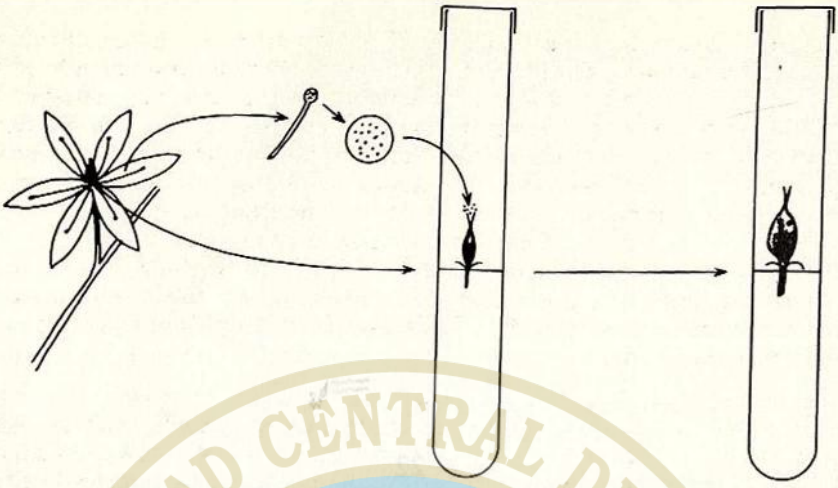


Figura 22.1 Ilustración esquemática de una polinización estigmática *in vitro*. Consultar el texto para una explicación más detallada

tabacum, Petunia violacea, Antirrhinum majus, Pisum sativum, Lathyrus odoratus, Zea mays (Zenkteler, 1980; Pierik, 1979; Sladky y Havel, 1976), y también con algunas especies de *Glycine* (Silvoy *et al.*, 1984).

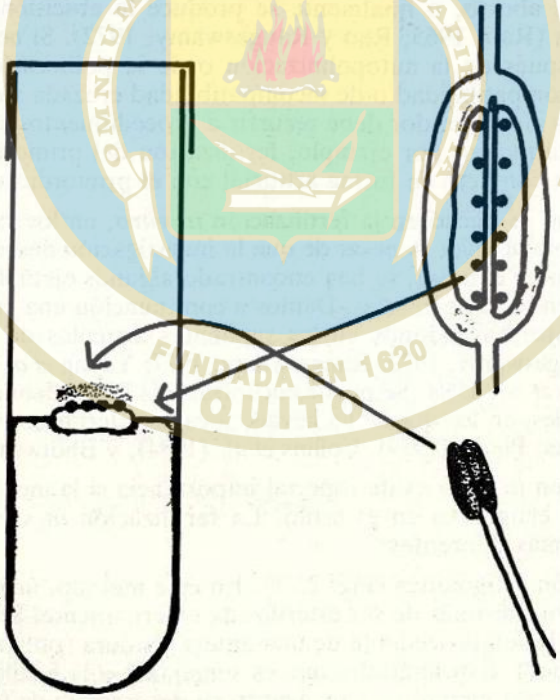


Figura 22.2 Ilustración esquemática de la polinización placentaria *in vitro*. Consultar el texto para una explicación más detallada

2. Fertilización de la placenta (Fig. 22.2). A partir de una flor intacta, esterilizada externamente, se obtienen explantos de placenta conteniendo primordios seminales no fertilizados, que se siembran sobre un medio nutritivo (esta operación se realiza con la ayuda de un estereomicroscopio). Al mismo tiempo, se toman unas anteras, aún cerradas, pero a punto de abrirse, y se esterilizan externamente. Posteriormente las anteras se abren en condiciones estériles, colocándose los granos de polen cerca de los primordios seminales. Después de esto se necesita un cierto tiempo para ver si se produce la germinación de los granos de polen, su penetración en el saco embrionario y la consiguiente fertilización. Esta fertilización sobre la placenta se realiza con miembros de la familia Cariofiláceas, con *Gossypium* (Refaat *et al.*, 1984) y *Zea mays* (Truong-André y Demarly, 1984).

3. Fertilización de un primordio seminal aislado, sin placenta. Este método es semejante al anterior, a partir del momento en que el primordio seminal queda aislado *in vitro*. Ha tenido poco éxito, ya que resulta extremadamente difícil inducir la formación embrionaria sobre primordios seminales fertilizados *in vitro*. Lo anterior concuerda con la información sobre cultivo de embriones, que se contiene en el capítulo 16. Por esta razón, prácticamente siempre se utiliza la fertilización sobre la placenta.

La fertilización *in vitro* se usa en los siguientes casos:

1. La polinización placentaria resulta a veces posible, cuando las plantas son completamente autoincompatibles *in vivo*. Como ejemplos podemos citar: *Petunia axilaris* (Rangaswamy y Shivanna, 1967), e híbridos de *Petunia* (Niimi, 1970).

2. La fertilización cruzada puede ser posible *in vitro*, aunque resulte imposible *in vivo*. Iwai y Kishi (1986) fueron capaces de producir plantas híbridas, fertilizando en tubo de ensayo primordios seminales de *Nicotiana alata* con polen de *Nicotiana tabacum*. También se pueden conseguir *in vitro* cruces intergenéricos, como se ha hecho por ejemplo con distintos miembros de la familia de las Cariofiláceas. En el caso de esta familia se ha observado que los granos de polen germinan mejor si la fertilización es sobre la placenta, *in vitro*, que si se realiza sobre el estigma *in vivo*.

3. Producción de haploides por partenogénesis. Hess y Wagner (1974) consiguieron un haploide de *Mimulus luteus*, utilizando en la polinización granos de polen de *Torenia fournieri*; a través de esta polinización dirigida se consiguió el desarrollo de gametos de *Mimulus* no fertilizados. Se desconoce si este método se podrá aplicar a otras especies.

4. A veces resulta inevitable la abscisión de flores u ovarios. En estos casos puede ser eficaz la fertilización estigmática.

5. En ocasiones la fertilización *in vitro* se puede realizar simplemente para estudiar la fisiología de la fertilización.

En general se conocen mal las condiciones necesarias para la fertilización *in vitro*. Sin embargo, se pueden aseverar los siguientes puntos:

1. Los granos de polen y los primordios seminales deben encontrarse en el estado morfológico y fisiológico adecuado.

2. La elección del medio nutritivo es de gran importancia. No resulta sorprendente que esta elección sea difícil, ya que se deben producir de forma consecutiva los siguientes procesos: germinación de los granos de polen, fertilización y crecimiento del embrión hasta constituir la semilla. Generalmente se utiliza una mezcla compleja de compuestos para inducir el crecimiento del embrión.

3. Cuando se esterilizan flores para realizar la polinización sobre el estigma, se debe tener cuidado de que este último no permanezca durante demasiado tiempo en contacto con el agente esterilizante, ya que el exudado del estigma puede ser disuelto.

4. Cuando se realiza la fertilización estigmática es mejor no retirar los sépalos de la flor, ya que aquéllos estimulan el crecimiento del ovario.

5. Rao (1965) y Rao y Rangaswamy (1972) demostraron con *Nicotiana rustica*, que la fertilización a través del estigma puede ser posible aunque fracase la fertilización placental.

6. La temperatura puede constituir un factor decisivo. Balatkova *et al.* (1977) comprobaron que la fertilización de *Narcissus in vitro* precisaba de una baja temperatura, no produciéndose nunca a 25°C. Sin embargo, en el caso de *Papaver somniferum* las bajas temperaturas son desfavorables.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

23
PRODUCCION DE HAPLOIDES

Introducción general

Cuando se produce reproducción sexual (generativa), el número de cromosomas, reducido a la mitad como consecuencia de la meiosis, se ve duplicado nuevamente en la fertilización (fusión de los gametos masculino y femenino). Si la meiosis tiene lugar en una planta diploide (con dos juegos de cromosomas denominados por 2n = 2x), se originan células con un número de cromosomas n = x; si una célula de este tipo da origen a una planta, sin fertilización, ésta recibe el nombre de monohaploide, es decir, que sólo tiene un juego de cromosomas (x). Del mismo modo, en una célula tetraploide (4 juegos de cromosomas, denominados por 2n = 4x), la meiosis origina células con un número 2n = 2x cromosomas. Si se originan plantas, sin fertilización, a partir de ese tipo de células, reciben el nombre de dihaploides. En términos generales se llaman células o individuos haploides a aquéllos que poseen un número de cromosomas mitad del original.

Si se duplica el número de cromosomas de una planta monoploide (n = x), bien sea de forma espontánea o por inducción (con ayuda de colchicina), se forma un individuo homocigótico diploide con dos juegos idénticos de cromosomas (2n = 2x); esta duplicación es muy importante, ya que los monoploides son estériles. Si como resultado de la fertilización se produce la fusión de dos células, cada una con n = x, pero con juegos no idénticos de cromosomas, se obtiene un individuo diploide heterocigótico. Los individuos homocigóticos originan células sexuales (gametos) idénticas por meiosis. Si se cruzan dos individuos homocigotos muy diferentes entre sí, la descendencia que se produce es totalmente homogénea, aunque heterocigota. Este último punto es de vital importancia para los mejoradores y cultivadores, como ya se ha indicado en el capítulo 20 (la propagación vegetativa como medio para producir una descendencia homogénea).

Obviamente los mejoradores han buscado haploides de forma intensiva, ya fuesen originados de forma espontánea u obtenidos de forma artificial. El número de especies vegetales, que se sabe en el momento actual que es capaz de

producir haploides de forma espontánea *in vivo*, es superior a 100. Pero en principio se puede decir que la frecuencia es muy baja. La fuente más importante de estos haploides la constituyen las "semillas gemelas" (semillas con dos embriones). En una semilla gemela se pueden encontrar dos embriones cada uno con n cromosomas, como consecuencia del crecimiento sin fertilización de la oosfera y una sinérgida. También puede ser que un embrión sea 2n y otro sea n, el primero sería el resultado del desarrollo de una oosfera fertilizada y el segundo de otra célula que actúa como gameto, pero no es fertilizada.

Se pueden utilizar diferentes técnicas para incrementar la producción y frecuencia de haploides *in vivo* (Hermsen, 1977, 1984; Hermsen y Ramanna, 1981; Sneep, 1983; Wenzel, 1980).

1. *Ginogénesis.* Consiste en el desarrollo de una oosfera, sin que se haya producido fertilización, como resultado de una polinización tardía (o retrasada), o cuando el polen resulta inviable (por ejemplo si ha estado expuesto a radiación ionizante) o también cuando el polen es extraño, desde el punto de vista filogenético, aunque a veces se produce con polen de la misma especie). La ginogénesis se produce especialmente en los cruces interespecíficos, por ejemplo, en el cruce entre *Solanum tuberosum* y *Solanum phureja*, mediante el que se obtienen patatas dihaploides (2n = 2x), a partir de las que originariamente eran tetraploides (2n = 4x). En los casos de ginogénesis resulta de vital importancia la producción de endospermo, ya que de otra manera el embrión aborta *in vivo*.

2. *Androgénesis.* En este caso el núcleo de la oosfera es eliminado o inactivado antes de la fertilización, por tanto, se origina un individuo haploide por desarrollo de uno de los gametos, que contiene el grano de polen.

3. *Eliminación del genoma.* Se produce como resultado de ciertos cruces intergenéricos o interespecíficos. En ellos se produce la fertilización, pero poco después de que ésta ocurra uno de los genomas es eliminado, originándose un embrión que contiene un único genoma, y que, por lo tanto, es haploide. Un ejemplo significativo de esto es el cruce interespecífico entre *Hordeum vulgare* y *H. bulbosum*, del que se obtiene *H. vulgare* haploide. A este caso nos referiremos más adelante.

4. *Semigamia.* En este caso, el núcleo de la oosfera y el núcleo generativo del grano de polen germinado se dividen independientemente, produciéndose una quimera haploide.

5. *Tratamiento químico.* Por ejemplo, con azul de tolueno, hidracida maleíca, óxido nitroso y colchicina. Si se añade cloramfenicol y para-fluor-fenilalanina se puede inducir la eliminación de cromosomas.

6. *Choque por altas o bajas temperaturas.*

7. *Irradiación con rayos-X o luz UV.*

El aspecto más importante de este capítulo es la inducción de haploides *in vitro*: la estimulación de los gametos femeninos (ginogénesis) o masculinos (androgénesis), para que se transformen de forma autónoma en individuos haploides (Hermsen, 1977). En la ginogénesis, que fundamentalmente se produce *in vivo*, la oosfera o una sinérgida es estimulada para crecer, sin haber sido fertilizada. En la androgénesis, que en la práctica sólo se produce *in vitro*, el núcleo

generativo o vegetativo de un grano de polen es estimulado para convertirse en un individuo haploide, sin que se lleve a cabo la fertilización.

En la bibliografía referente a androgénesis *in vitro* (Pierik, 1979; Bhojwani *et al.*, 1986), se desprende claramente que los miembros de la familia de las Solanáceas tienen especial facilidad, y son capaces de regenerar haploides, a partir de anteras aisladas (Fig. 23.1), o de granos de polen. En las familias de las Crucíferas, Gramíneas y Ranunculáceas existen también distintos géneros, que pueden originar haploides (Bajaj, 1983; Rashid, 1983); también se han encontrado resultados sorprendentes en los últimos años, con el cultivo de anteras de arroz (Reeves, 1986). Se encuentra una notable correlación entre el potencial regenerativo, que se encuentra en la propagación vegetativa (capítulo 20) y el de las anteras. Maheswari y colaboradores (1983) han indicado que la inducción haploide es posible, sobre todo en las Angiospermas: 247 especies e híbridos, de 88 géneros y 34 familias son capaces de producir haploides *in vitro*. A veces se encuentran diferencias sorprendentes, en cuanto a la facilidad para la inducción de haploides, incluso dentro de un mismo género, variando entre resultar fácil, a ser imposible. Se pueden encontrar diferencias típicas dentro de un mismo género en *Oryza* (arroz), *Lycopersicon* (tomate), *Arabidopsis*, *Solanum*, *Triticum* y *Nicotiana*. Hasta ahora se han conseguido pocos éxitos con árboles y arbustos (Mott, 1981). Se puede obtener más información, en relación con la inducción de haploides en árboles, en el trabajo de Radojevic y Kovoor (1986).

Figura 23.1 Diferentes estadios del desarrollo de haploides, a partir de anteras aisladas de *Nicotiana tabacum*. De izquierda a derecha: anteras recién aisladas; plántulas desarrolladas durante seis semanas en la oscuridad; plántulas desarrolladas seis semanas en la oscuridad y una semana a la luz; plántulas desarrolladas durante seis semanas en la oscuridad y tres semanas a la luz. Temperatura de crecimiento 25° C

Resulta curioso que la inducción de haploides fuese descubierta tarde, en el desarrollo del cultivo de tejidos. Guha y Maheswari (1964, 1966), trabajando en la India, fueron los primeros que demostraron que las anteras aisladas *in*

vitro de *Datura innoxia* eran capaces de formar embriones haploides. Bourgin y Nitsch (1967) obtuvieron las primeras plantas haploides, a partir de anteras aisladas de *Nicotiana*. A partir de 1964 se pueden encontrar muchas publicaciones en relación con la producción de haploides *in vitro*; indicando la importancia que tiene para mejoradores y genetistas. A continuación pasamos revista a las ventajas que presentan los haploides (Sunderland, 1973; Hermsen, 1977, 1984; Hermsen y Ramanna, 1981; Jensen, 1977; Reinert y Bajaj, 1977a; Debergh, 1974, 1978; Wenzel, 1980; Raghavan, 1986):

1. Como resultado de la inducción de haploides y posterior duplicación cromosómica, se consigue la homocigosidad de la forma más rápida posible, haciendo que la investigación genética y de mejora sea más fácil. La segregación genética se simplifica en el caso de los homocigotos, no apareciendo los genes recesivos enmascarados por los dominantes. La producción de homocigotos resulta especialmente importante en el caso de las plantas con polinización cruzada obligada, como son las dioicas y las autoincompatibles. Con la polinización cruzada se mejora la heterocigosidad. Si la autopolinización es posible en plantas con polinización cruzada, los homocigotos son difíciles de obtener debido a la endogamia. El conseguir la homocigosidad es también deseable en el caso de las plantas con autopolinización, aunque ésta produce como norma la homocigosis. Sin embargo, pueden ser necesarias entre 5 y 7 generaciones de autopolinización, antes de conseguir la homocigosis completa.

2. La homocigosis es aún más importante en aquellas plantas que presentan una fase juvenil muy larga (desde el estado de semilla a la floración), como los árboles frutales, plantas bulbosas y los árboles forestales. En este grupo de plantas, aunque la autopolinización repetida sea posible, el conseguir la homocigosis constituye un proceso extremadamente largo.

3. Como resultado de la homocigosis se consiguen líneas que hacen posible la producción de híbridos-F_1 puros; una población F_1 debería ser en principio completamente homogénea.

4. Cuando se trabaja con plantas que son normalmente poliploides, resulta muy útil, por inducción de haploides, trabajar con un nivel de ploidía más bajo; el estudio de la herencia y la combinación de caracteres deseables resulta más fácil en el nivel diploide que en el tetraploide, lo que nos indica que esta técnica es particularmente eficaz en el caso de autotetraploides.

5. Los monohaploides poseen la ventaja para el mejorador, de que las mutaciones recesivas (A → a) se pueden distinguir de forma inmediata. Esto no ocurre en el caso de un diploide que sufre una mutación del tipo AA →Aa; la autopolinización de Aa produce sólo uno de cada cuatro individuos doble recesivo. Si se dispone de una gran población de células haploides, la inducción de mutaciones y la selección se hace posible en gran escala; de esta forma por ejemplo, se puede seleccionar la resistencia contra fitotoxinas en una población de células haploides. Otra ventaja de la inducción de mutaciones sobre células haploides, consiste en que se evita la aparición de quimeras. Se dan ejemplos de la inducción de mutaciones sobre haploides en los siguientes trabajos: Nitsch *et al.* (1969a), Sunderland (1973a) y Bajaj (1983).

6. La inducción de haploides, seguida de la duplicación de cromosomas puede permitir en algunos casos la obtención de plantas sólo masculinas. Un

importante ejemplo lo constituye la especie *Asparagus officinalis*, en la que las plantas masculinas presentan una productividad más alta y son más precoces que las femeninas. Las plantas hembra de *Asparagus* se designan como XX y los machos como XY; por el cruce de un individuo XX por otro XY se obtiene el cincuenta por ciento de machos y el cincuenta por ciento de hembras. Si se obtienen haploides a partir de las anteras de plantas masculinas, éstos serán X o Y, la duplicación de cromosomas en individuos del tipo Y, produce super-machos YY, que posteriormente pueden ser propagados de forma vegetativa. Si se cruzan individuos XX por individuos YY, se producen exclusivamente plantas masculinas del tipo XY (Hondelmann y Wilberg, 1973; Thevenin y Doré, 1976).

7. Cuando los homocigotos se transforman, de forma artificial, en diploides, por el uso de la colchicina, se pueden producir problemas que no se encuentran normalmente *in vitro*. Los haploides *in vitro* se duplican, con frecuencia de forma espontánea; originando homocigotos de forma espontánea, además, la aplicación de colchicina es mucho más fácil *in vitro* que *in vivo*.

8. Es mucho mejor trabajar con protoplastos haploides, que con diploides, para la hibridación somática. La fusión de dos protoplastos haploides produce uno diploide, mientras que la fusión de dos diploides produce uno tetraploide.

Se debe hacer notar que la obtención de monoploides, en sí misma, no es importante para los mejoradores, ya que éstos son estériles. Es precisa la duplicación para conseguir la fertilidad. Existen dos métodos *in vitro*, para duplicar el número de cromosomas de un haploide. De forma espontánea, por endomitosis, generalmente por la formación de un vástago o un embrión adventicio; o también por tratamiento con colchicina. Si se obtienen homocigotos por duplicación de los cromosomas, no se debe considerar esto como una meta definitiva, ya que éstos no son más que el material inicial para cruces posteriores, que producirán híbridos valiosos cualitativa y cuantitativamente.

Obtención de haploides *in vitro*

En la bibliografía se describen los siguientes materiales iniciales para la obtención de haploides (Debergh, 1978; Sunderland, 1978, 1980):

1. *Anteras.* Con diferencia, la mayor parte de la investigación se ha realizado con anteras aisladas (Fig. 23.2), sobre medios sólidos o líquidos. En algunas ocasiones se esterilizan los capullos florales, aún cerrados, en otros casos se esterilizan las anteras cerradas, que se obtienen de flores ya abiertas.

2. *Granos de polen individuales.* Es esta una técnica poco utilizada (debido a problemas técnicos), que se trata brevemente, más adelante.

3. *Inflorescencias, cultivadas habitualmente en medio líquido.* Este método, que se utilizó inicialmente con *Hordeum* es especialmente útil con gramíneas y otras especies que tengan flores pequeñas o flores con un periantio reducido.

4. *Cultivo de embriones.* Si, por ejemplo, se hace un cruce entre *Hordeum vulgare* y *H. bulbosum*, se produce la fertilización, aunque poco después los cromosomas de *H. bulbosum* son eliminados. De esta manera se produce un embrión haploide de *H. vulgare,* en el que no se desarrolla el endospermo; si

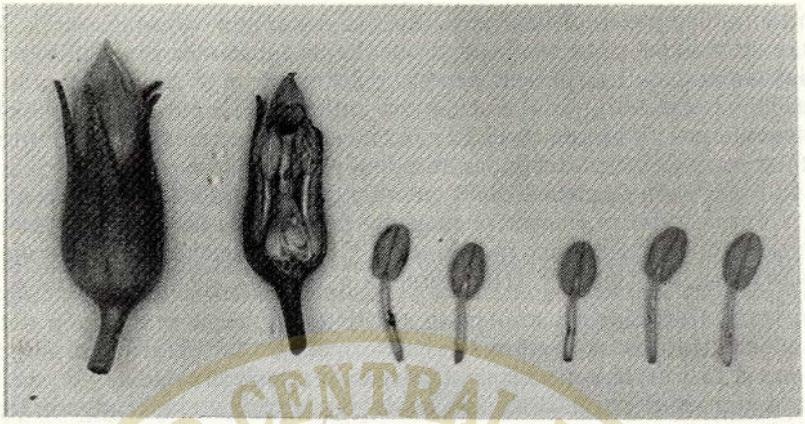


Figura 23.2 Una yema floral cerrada de *Nicotiana tabacum* (izquierda) se esteriliza externamente, y posteriormente se abre en la cámara de flujo laminar (segunda figura por la izquierda). De esta manera se pueden retirar los estambres (a la derecha). Se eliminan los filamentos, para impedir que regeneren nuevas plantas y posteriormente se siembra la antera aislada, sobre el medio nutritivo

no existiese el cultivo de embriones, el nuevo embrión no podría desarrollarse (Jensen, 1977).

Otro ejemplo semejante al de más arriba, lo constituye el cruce entre *Triticum aestivum* y *H. bulbosum,* a partir del cual se obtiene un embrión haploide de *Triticum aestivum*; en este caso el cultivo de embriones es también necesario (Barclay, 1975; Zenkteler y Straub, 1979).

Kott y Kasha (1985) han publicado un artículo de revisión completo, sobre la producción de plantas haploides y el cultivo de embriones.

5. *Seudo-fertilización.* Hess y Wagner (1974) polinizaron plantas de *Mimulus luteus, in vitro*, con polen de *Torenia fournieri*, obteniendo una planta haploide, por desarrollo de una célula haploide de *Mimulus*.

6. *Desarrollo de primordios seminales sin seudo-polinización*. La principal ventaja del cultivo de primordios seminales consiste en que la mayoría de las plantas que se obtienen son verdes y genéticamente más estables (Dunwell, 1985). San Noeum (1976) consiguió el primer éxito con *Hordeum vulgare*, en la obtención de haploides, a partir de células del saco embrionario, que se convirtieron en diploides mediante el uso de colchicina. También se han obtenido haploides, a partir de cultivos de primordios seminales, con otros tres cereales (trigo, arroz y maíz). Preil *et al.* (1977), utilizando el método del capítulo de Pierik *et al.* (1973), con gerbera, obtuvieron una planta haploide de flores amarillas, quizá debida al desarrollo de un primordio seminal no fertilizado. Posteriormente Meynat y Sibi (1984) obtuvieron también haploides, a partir de cultivos de primordios seminales de gerbera. Verna y Collins (1984) obtuvieron plantas haploides de *Petunia axillaris* a partir de primordios seminales, aislados *in vitro*, que tenían unida una porción de la placenta. Keller (1986) ha indicado que el cultivo de primordios seminales para la producción de haploides, puede ser mejor que el cultivo de anteras (microesporas), en el caso de algunos grupos taxonómicos como las Compuestas.

Otro método para inducir haploides es una combinación de irradiación gametofítica y cultivo de ovarios; en *Petunia* el cultivo *in vitro* de ovarios, de plantas polinizadas con polen irradiado, es hasta ahora la técnica más eficaz para la producción de haploides. El polen irradiado no sólo actúa como estimulador de la ginogénesis, sino que también juega un papel en la fertilización (Raquin, 1986).

En resumen se puede decir que la mayor parte de las plantas haploides que se obtienen *in vitro*, se producen a partir de anteras aisladas o a veces a partir de polen. La androgénesis es con diferencia la fuente más importante de haploides *in vitro*. Esto tiene una extraordinaria importancia, ya que los granos de polen se producen en grandes cantidades, y cada uno puede convertirse en un individuo haploide. Se sabe relativamente poco sobre el desarrollo de primordios seminales y ovarios (no) fertilizados, para transformarse en haploides.

El crecimiento de granos de polen aislados, a pesar de las dificultades técnicas que pueda tener, y la consiguiente regeneración de haploides, tiene un número de ventajas determinadas sobre el cultivo de anteras (Debergh, 1978; Sunderland, 1978; Nitsch, 1977; Wenzel, 1980; Bajaj, 1983):

1. La posibilidad de regeneración de diploides queda fuertemente limitada, al eliminar los tejidos diploides (septum, pared de la antera, tapete).

2. La antera no actúa como barrera en el transporte de nutrientes desde el medio hasta los granos de polen.

3. Al prescindir de la antera se eliminan sustancias inhibidoras como el ABA, o sustancias tóxicas.

4. Se puede evitar la formación de callos a partir de las anteras, con lo que se consiguen muchas menos quimeras; si se obtiene un callo a partir de un único grano de polen, el primero tiene un único genotipo, mientras que si se desarrolla a partir de muchos granos de polen, se pueden producir quimeras.

5. Frecuentemente se produce una transformación directa del polen, en un embrión como resultado del aislamiento del polen.

6. Los granos de polen son más apropiados que las anteras como material inicial para la investigación sobre mutaciones y manipulación genética.

7. La formación de embriones se puede observar mejor con granos de polen que con anteras.

A pesar de las ventajas del cultivo de polen (Fig. 23.3), y la gran cantidad de investigación desarrollada en esta área, resulta todavía muy difícil la inducción de haploides a partir de granos de polen aislados. Se necesita un medio nutritivo mucho más complicado que para el cultivo de anteras, y el número de haploides obtenido es con diferencia más pequeño. El cultivo de polen ha fracasado en la mayor parte de las plantas, pero se puede conseguir en las siguientes especies: *Petunia hybrida, Lycopersicon lycopersicum, Brassica oleracea, Nicotiana tabacum* y *Datura innoxia*. En los últimos años se han hecho grandes avances en el desarrollo de la técnica del cultivo de microesporas aisladas, especialmente en el caso de *Brassica napus* (Keller, 1986).

El crecimiento del polen requiere técnicas muy especializadas:

1. El crecimiento inicial de las anteras cerradas, antes del cultivo de los granos de polen.

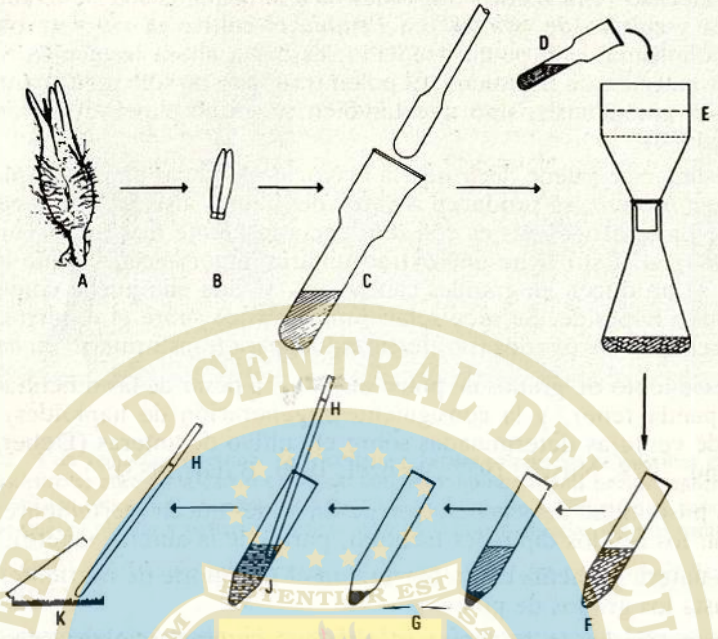


Figura 23.3 La antera (B), que ha sido retirada de la yema floral (A), se homogeniza, utilizando el homogenizador de Potter (C). De esta forma se obtiene una suspensión grosera de polen (D), que posteriormente es purificada. Se hace pasar a la suspensión por un tamiz (E), se centrifuga (F), decanta (G), y finalmente se siembra con la ayuda de una pipeta (H,J), sobre el medio de cultivo en una caja de Petri (K). Tomado de Debergh (1974)

2. La extracción de los granos de polen (filtrado, lavado, centrifugado, etc.).

3. La aplicación de un procedimiento para lograr la nutrición.

Los haploides se pueden producir, en principio, de dos maneras a partir de anteras aisladas (Debergh, 1978; Reinert y Bajaj, 1977a):

1. Directamente. El embrión se diferencia directamente a partir del grano de polen (microespora).

2. Indirectamente. Primero se desarrolla un callo a partir del grano de polen, y posteriormente se regenera un embrión o un vástago adventicio. No se favorece este tipo de desarrollo, ya que generalmente se produce una mezcla de niveles de ploidía, debido a: la naturaleza heterogénea del material inicial (haploide y diploide), la adición de reguladores, el cambio espontáneo de haploide a diploide. Los haploides frecuentemente no pueden competir con los tejidos con niveles de ploidía superiores.

Resulta de vital importancia el estadio en el que se encuentra la antera, en el momento de su aislamiento, para lograr la inducción de haploides. La mayor parte de los autores (Debergh, 1978; Reinert y Bajaj, 1977a; Sunderland y Dunwell, 1977) están de acuerdo en que las anteras deberían ser aisladas, cuando los granos de polen (microesporas) que se encuentran en su interior no han sufrido todavía su primera división. Dunwell (1985) definió el aislamiento co-

rrecto de la siguiente forma: las anteras más productivas son aquellas que contienen microesporas uninucleadas, a mitad de camino entre la formación de la tetrada y la primera división del grano de polen, deben estar en el anterior estadio en el momento de la recolección. La primera división celular, en la que se produce un pequeño núcleo generativo y un gran núcleo vegetativo, se puede identificar por medio de la tinción de Feulgen, que pone de manifiesto los núcleos celulares. En algunos casos las anteras tienen que ser aisladas en un estadio posterior, a veces durante y a veces después de la primera división de la microespora (Nitsch, 1981; Sunderland, 1980). Una amplia discusión, sobre cuándo se deben aislar las anteras y los granos de polen, se puede encontrar en Heberle-Bors (1985). Esta autora llegó a la conclusión de que el estado de desarrollo es un factor muy complejo, que se compone al menos de tres etapas: Maduración del grano-P (grano de polen embrionario), maduración del grano de polen normal, y maduración de la pared de la antera.

Muchas veces se puede reconocer el estado de desarrollo ideal, teniendo en cuenta las características morfológicas. En el tabaco, se eligen los botones florales, en los que los pétalos empiezan a hacerse visibles (Fig. 23.4). Este método ofrece el peligro de que no siempre la primera división de la microespora se corresponde con un determinado estadio morfológico. Se debe también tener en cuenta que en cualquier antera el desarrollo de todas las microesporas no está sincronizado; las que se encuentran en el centro están en estado más avanzado que las de la periferia.

Figura 23.4 Material inicial para el cultivo de anteras de tabaco. Izquierda: inflorescencia. Debajo: flores en distintos estadios de desarrollo. Las anteras del tipo de flor indicado con una flecha, se utilizan generalmente como material inicial para la inducción de haploides. Consultar el texto para una explicación más detallada

En el caso del cultivo de anteras, además de haploides se obtienen quimeras y/o plantas con diferentes niveles de ploidía. Las razones por las que esto ocurre se indican a continuación: (McComb, 1978; Thomas y Davey, 1975; Wenzel, 1980):

1. Por endomitosis (desde x a 2x y desde 2x a 4x), se obtienen diploides y tetraploides homocigotos, en lugar de haploides.

2. Cuando se produce la fusión nuclear, de dos núcleos idénticos dentro de una microespora haploide (x + x = 2x; 2x + x = 3x), se obtienen diploides, triploides, etc., que son homocigotos.

3. La regeneración del septum y de la pared de la antera origina individuos 2n, que son heterocigotos.

4. Se obtienen diploides heterocigotos por regeneración de microesporas no reducidas.

5. Se originan diploides homocigotos siempre que se produce la duplicación espontánea de un haploide (Stringham, 1977).

6. Se pueden producir aberraciones durante la meiosis, que conducen a diferentes niveles de ploidía.

Si se obtienen haploides a partir de las anteras (mostrado esquemáticamente en las figuras 23.5 y 23.6), estos haploides que se originan a partir de una microespora con un único núcleo, se pueden producir de diferentes maneras (Sunderland y Dunwell, 1974; Reinert y Bajaj, 1977a):

1. En muchos casos después de la primera división nuclear (que en principio produce un núcleo generativo y uno vegetativo) de la microespora, el núcleo generativo degenera o permanece durmiente y sólo se divide el núcleo vegetativo.

2. En algunos casos el núcleo vegetativo degenera o se hace durmiente, después de la primera división de la microespora, y sólo se divide el núcleo generativo. Este hecho, poco usual, se puede observar en *Hyoscyamus* (Raghavan, 1976).

3. Se forman dos núcleos idénticos en la primera división, y ambos se dividen. Cuando esto sucede, se habla de microesporogénesis simétrica.

4. En la práctica generalmente se produce una mezcla de todos los procesos indicados arriba.

Los pretratamientos, en especial las bajas temperaturas, son muy importantes en la producción de haploides. Las temperaturas bajas, aplicadas sobre la planta madre, sobre yemas florales jóvenes o sobre las anteras, generalmente estimulan la embriogénesis. En algunas ocasiones se pueden sustituir por temperaturas altas. El frío consigue que por la primera división de la microespora se formen dos núcleos idénticos, en lugar de formarse uno generativo y otro vegetativo. Otros pretratamientos pueden también estimular la androgénesis (centrifugado de las anteras, incisión de la parte superior de la inflorescencia de la planta donante). A veces es aconsejable dar un corte en la pared de la antera, de manera que los embriones o el callo puedan salir con mayor facilidad. Se pueden encontrar detalles sobre pretratamientos en: Debergh (1978), Rashid (1983), Sunderland (1978, 1980), Nitsch (1981).

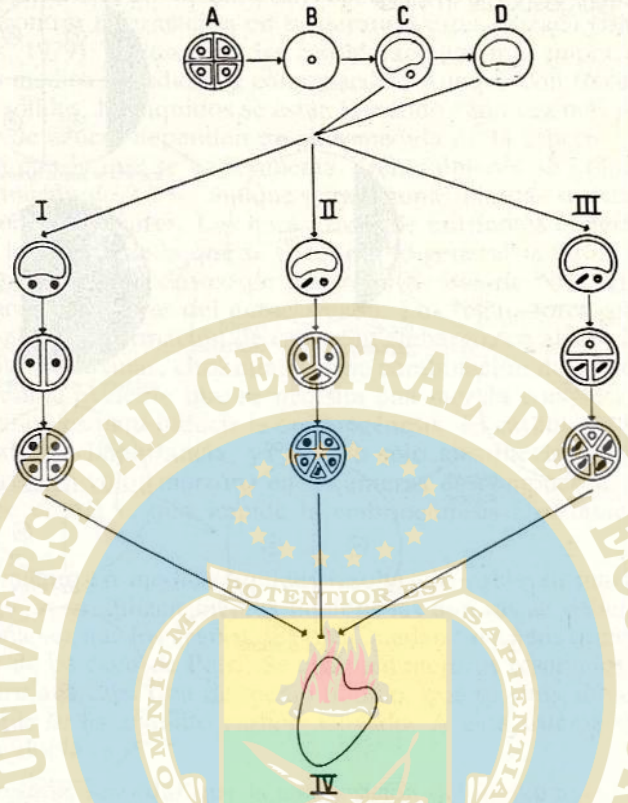


Figura 23.5 Ilustración esquemática de la formación *in vitro* de un embrión haploide, a partir de una microespora haploide (Debergh, 1974)
A: Tetrada con 4 microesporas (obtenida después de la 1ª y 2ª divisiones meióticas)
B: Microespora aislada, justo antes de la primera división mitótica del polen
C: La vacuolación hace que el núcleo se desplace hacia la pared celular
D: Primera mitosis del polen
I: Primera mitosis del polen, que origina dos núcleos simétricos, que vuelven a dividirse
II: Primera división mitótica del polen, que produce dos núcleos asimétricos (uno vegetativo y otro generativo), de los cuales sólo el vegetativo se divide, abortando el generativo
III: En este caso se forman también dos núcleos asimétricos, pero sólo el generativo se divide, abortando el vegetativo
IV: Formación de embriones haploides

El material inicial (plantas donantes) y su acondicionamiento resultan esenciales para la androgénesis. Como se indicó anteriormente, la familia botánica, la especie e incluso el cultivar son todos factores importantes. Heberle-Bors (1985) trata el papel del genotipo sobre la inducción haploide. En principio se deben utilizar plantas sanas y vigorosas. Tanto la edad de la planta donante, como la de la yema floral juegan un papel. En la mayor parte de las especies de cereales sobre las que se ha investigado, resulta que las anteras de los vástagos primarios son más productivas que las de los laterales, solamente se deja de encontrar diferencia en el caso del arroz (Dunwell, 1985). En un importante artículo de revisión, Heberle-Bors (1985) se plantea la pregunta de cómo se

Figura 23.6 Ilustración esquemática del desarrollo de microesporas *in vitro*. Después de la primera mitosis no idéntica (asimétrica), o idéntica (simétrica) se originan núcleos. Después de la segunda mitosis los núcleos pueden ser haploides o diploides. Las células diploides se pueden originar por fusión celular

originan los granos-P (granos de polen embriogénicos), por influencia dél pretratamiento sobre el material inicial (por ejemplo, longitud del día, inducción floral, baja temperatura, desplazamiento del balance sexual hacia la "feminidad" e incremento de la esterilidad del polen). Heberle-Bors (1985) llegó a la conclusión de que los granos-P representan una forma particular de esterilidad masculina, que se origina por una desviación del desarrollo masculino normal, en el momento de la transición esporofito-gametofito, en las células madre de las microesporas.

Existe la evidencia de que las poblaciones de polen son dimorfas. Por un lado existe una pequeña fracción de granos de polen que forma haploides (granos-P) en una baja proporción, y por otro lado existe una gran fracción que no origina haploides (Rashid, 1983). Para el aislamiento *in vitro,* obviamente se seleccionan anteras embriogénicas dentro de la población que de una alta proporción de haploides (Heberle-Bors, 1985). Schmidt y Keller (1986) aplicando el gametocida CGA_1 fueron capaces de prospectar polen dimorfo, con buena respuesta androgenética.

Sobre la influencia del medio nutritivo, que puede tener tanta importancia, se puede encontrar información en la literatura especializada (Bhojwani *et al.*, 1986; Pierik, 1979). Algunas de las consideraciones más importantes en relación con los medios se indican a continuación. Aunque con frecuencia se utilizan medios sólidos, los líquidos se están haciendo cada vez más populares. Las necesidades de azúcar dependen en gran medida de la especie y de la familia de la planta con la que se experimenta. Generalmente se utiliza sacarosa en una concentración de 2-4%, aunque para algunas plantas se pueden necesitar concentraciones superiores. Las necesidades de nutrientes minerales dependen también de la especie de la que se trate; por lo general se utiliza un medio MS modificado, o el medio clásico de macro-nutrientes de Nitsch (1969). El pH suele ajustarse a 5,8 antes del autoclaveado. Los reguladores generalmente se evitan para eludir la formación de callo. Sin embargo, en algunas veces pueden ser necesarias las auxinas, citokininas o una combinación de ambas. En muchas ocasiones resulta evidente que se necesita una mezcla compleja de sustancias vegetales naturales para inducir la embriogénesis. El carbón activado juega un papel de extrema importancia, ya que no sólo absorbe las sustancias tóxicas (que producen un color marrón) en las anteras descompuestas, sino que además absorbe el ABA, que impide la embriogénesis (Johansson y Eriksson, 1982).

El crecimiento en medios líquidos resulta favorable en muchas ocasiones. Sin embargo, si se utilizan medios líquidos las anteras se deben mantener en flotación; una vez que los granos de polen quedan liberados originan embriones en el fondo de las cajas de Petri. Se obtienen mejores resultados cultivando las anteras sobre una capa fina de medio líquido, que se sitúa sobre una placa de agar, a la que se ha añadido carbón activado. A este sistema se le denomina "método de doble capa".

Es interesante recordar que la composición del medio nutritivo a veces necesita ser modificada, de acuerdo con los estadios de desarrollo del cultivo de anteras. Este hecho fue demostrado por Wenzel y Fouroughi-Wehr (1985), para la patata, debiéndose introducir variaciones en los siguientes componentes del medio: macro-nutrientes, sacarosa, auxina, citokinina, carbón activado y leche de coco.

Algunos factores físicos (como la longitud del día, irradiancia, calidad de la luz, fotoperíodo, termoperíodo y suministro de CO_2) pueden jugar un papel importante, en la androgénesis, en el cultivo *in vitro* (Nitsch, 1977, 1981; Bajaj, 1983; Wenzel, 1980; Debergh, 1978; Dunwell, 1985).

Problemas asociados a la inducción de haploides

Se pueden encontrar muchos problemas en la inducción de haploides, y el porcentaje de anteras (granos de polen) que llegan a formar embriones viables haploides es (muy) pequeño, en una gran cantidad de plantas. Otros muchos factores pueden también complicar este panorama. Los problemas más importantes son:

1. Con frecuencia no se produce crecimiento o desarrollo en las condiciones *in vitro,* o a un crecimiento inicial se sucede el aborto de los embriones.

2. Frecuentemente, al mismo tiempo que se regeneran los haploides, lo hacen también diploides y tetraploides.

3. La regeneración de diploides, etc., puede, en principio, ser obviada cultivando granos de polen aislados. Pero esta técnica ha sido desarrollada para un número restringido de especies.

4. Se debe producir una división selectiva en las microesporas haploides y no en los tejidos diploides. Esta división selectiva resulta muchas veces imposible.

5. La regeneración de albinos es, con frecuencia, difícil de evitar, en especial en el caso de los cereales.

6. La inducción *in vitro* de haploides es, con frecuencia, insostenible, desde el punto de vista económico, debido a la baja proporción de éxitos. Un ejemplo clásico es el de *Solanum tuberosum* que se puede obtener, con más facilidad, en su forma haploide por "fertilización" con *Solanum phureja*.

7. La formación de callo, ya se produzca de forma espontánea, o inducida por reguladores, es generalmente perjudicial.

8. Existen pocas posibilidades de aislar un haploide, de una mezcla de haploides con individuos con otros niveles de ploidía, ya que en esas circunstancias los haploides son eliminados por los poliploides más fuertes.

9. La selección de haploides y la consecuente producción de homocigotos requiere una gran cantidad de tiempo, ya que a menudo es necesaria una investigación citogenética. A veces la selección es posible utilizando los llamados marcadores genéticos (bioquímicos).

10. La duplicación de un haploide no siempre produce como resultado un homocigoto. Existen a veces "homocigotos" diploides que presentan segregación en su descendencia.

FUNDADA EN 1620
QUITO

24
MANIPULACION GENETICA

Introducción general

Hasta 1970, la transferencia de material genético de un individuo a otro, en el caso de las plantas superiores, sólo era posible por medios sexuales: por fusión de la oosfera con el núcleo generativo de un grano de polen, para originar una célula huevo o cigoto, a partir de la cual se desarrollará un nuevo individuo, con características heredadas de su padre y de su madre. Durante la reproducción sexual sólo se unen células específicas, en las que el número de cromosomas se ha reducido a la mitad, como resultado de la meiosis. El número de cromosomas después de la fertilización procede en un 50% del padre y en la misma proporción de la madre. Las características hereditarias se localizan en el núcleo (siendo los cromosomas los portadores: genes cromosómicos) y en el citoplasma (dentro de los cloroplastos y las mitocondrias: genes citoplásmicos). En el caso de reproducción sexual, las características hereditarias localizadas en el citoplasma se heredan generalmente sólo de la madre.

Una forma totalmente diferente de transmisión de material genético (que conduce, por lo tanto, a un posible incremento en la variación genética), se produce cuando se unen dos protoplastos (células en las que la pared ha sido digerida, dejando exclusivamente la membrana celular como barrera); generalmente se originan a partir de células somáticas. Este proceso recibe el nombre de hibridación somática (Fig. 24.1). En este caso el número de cromosomas del híbrido somático es la suma del de sus "progenitores" (participantes en la fusión). En la hibridación somática, en contraste con la fertilización sexual, tanto la información nuclear como la citoplásmica es transmitida a partir de los dos participantes.

Power *et al.* (1970) y Power y Cocking (1971) unieron células somáticas por primera vez utilizando protoplastos de maíz y avena. A pesar de que no consiguieron híbridos de esta fusión, su aproximación al problema fue desde luego muy ingeniosa. Consiguieron la fusión de las células, utilizando protoplastos obtenidos por digestión enzimática de la pared celular.

En 1971 Takebe *et al.* obtuvieron plantas normales, a partir de protoplastos,

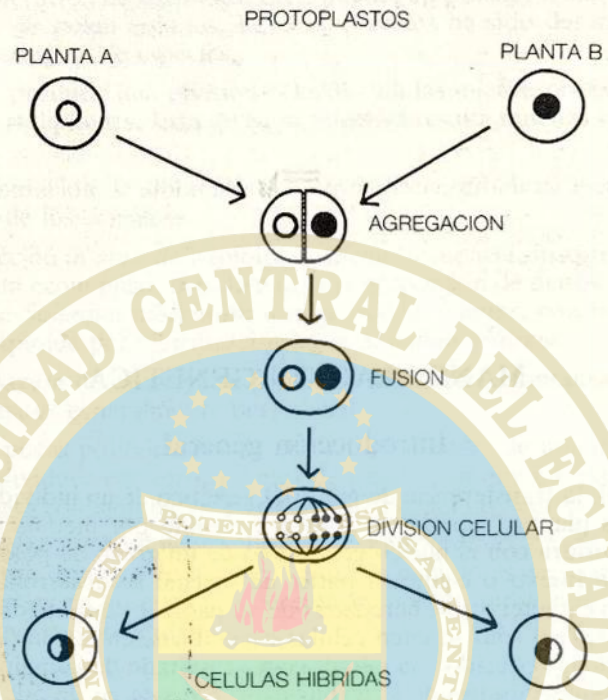


Figura 24.1 Ilustración esquemática de la hibridación somática de protoplastos, de dos especies vegetales diferentes

utilizando tabaco. La hibridación somática fue conseguida por primera vez por Carlson *et al.* (1972), que lograron la fusión de protoplastos aislados de *Nicotiana glauca* y *Nicotiana langedorffii,* obteniendo el primer híbrido somático vegetal.

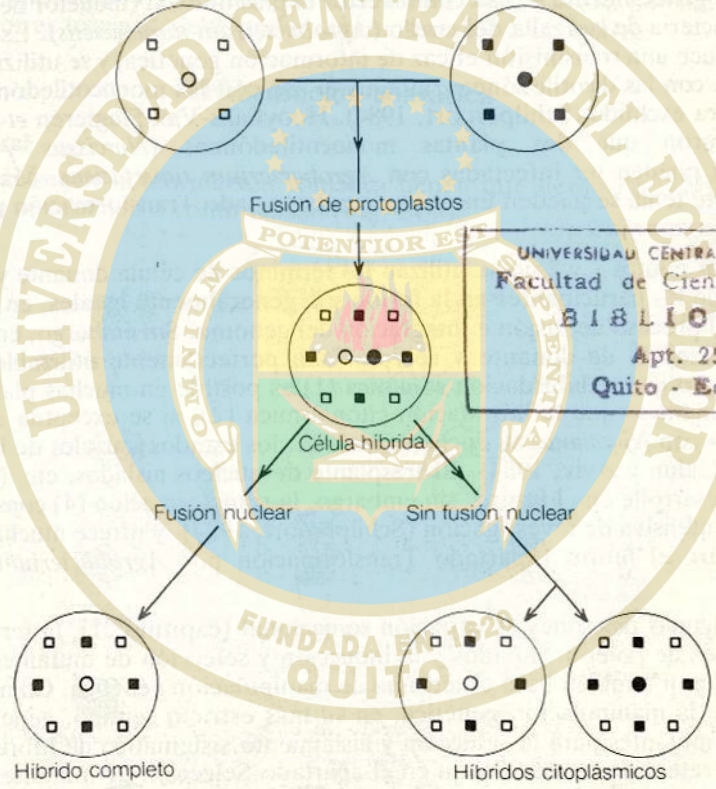
En contraste con la genética clásica, la hibridación de protoplastos hace uso de células somáticas, en lugar de utilizar plantas intactas y sus células sexuales. Sin embargo, el término de "hibridación somática" no es especialmente adecuado, ya que la fusión de protoplastos *in vitro* y la consecuente hibridación puede también ser inducida en células sexuales (como los protoplastos de polen). En los últimos diez años se han obtenido resultados científicos espectaculares e importantes avances técnicos, en el campo de la hibridación celular, aunque aún no se utilizan en la práctica en la mejora vegetal (Wenzel, 1983).

La transmisión asexual de material genético sólo resulta posible utilizando protoplastos. La pared celular constituye una barrera impenetrable para la fusión de las células y la transmisión, por ejemplo, de sus orgánulos. Se pueden obtener grandes cantidades de protoplastos, a partir de tejidos, suspensiones celulares, etc., por tratamiento con mezclas de enzimas, que dejan sólo el contenido celular rodeado por el plasmalema.

Descripción

La manipulación genética (De Groot *et al.*, 1982) es el método genético molecular de transmitir material genético, *in vitro,* desde una célula (protoplasto) a otra, sin intervención de la fase generativa (ciclo sexual). Se indican a continuación los diferentes tipos de manipulación genética posible (De Groot *et al.*, 1982; Sneep, 1982; Schilperoort, 1983, 1984):

1. Hibridación somática (también conocida como hibridación parasexual). Consiste en la fusión completa del núcleo y citoplasma de dos protoplastos (Fig. 24.2). A veces se produce una transmisión parcial de material genético, por ejemplo, cuando uno de los protoplastos ha sido pre-irradiado (produciéndose pérdida de cromosomas), o también cuando se produce una eliminación cromosómica espontánea.



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
Facultad de Ciencias Agrícolas
BIBLIOTECA
Apt. 25-20
Quito - Ecuador

Figura 24.2 Ilustración esquemática de la hibridación somática, que puede producir híbridos completos (izquierda) o híbridos citoplásmicos (derecha)

2. Hibridación citoplásmica. Implica la fusión del núcleo y el citoplasma de un protoplasto (A) con el citoplasma de otro protoplasto (B). Este tipo de hibridación es especialmente interesante en relación con la transmisión, por ejemplo, de la esterilidad masculina citoplásmica, que se localiza principalmente en las mitocondrias. La hibridación citoplásmica (Fig. 24.2), que produce los

llamados híbridos citoplásmicos o cíbridos, sólo se produce en un número limitado de casos (Galun y Aviv, 1984; Pelletier y Chupeau, 1984).

3. Trasplante y asimilación de núcleos aislados, cromosomas, fragmentos de cromosoma y orgánulos (plastidios y mitocondrias). Por ejemplo, sería interesante implantar (introducir en el genoma) una porción de cromosoma, en la que se encuentre el gen de resistencia a una enfermedad. Recientemente se ha conseguido la incorporación de núcleos aislados de células de *Vicia hajastana*, a protoplastos de una línea celular autotrofa de *Datura innoxia* (Saxena *et al.*, 1986).

4. Transformación. La adición de genes específicos a un protoplasto celular, utilizando DNA recombinante, precisa de un vector (un plásmido o un virus) y también de genes aislados (de plantas, bacterias o virus). En esta investigación generalmente se usa como vector el plásmido-Ti (inductor de tumores) de la bacteria de la agalla del cuello (*Agrobacterium tumefaciens*). Este plásmido produce una transmisión eficaz de información genética, y se utiliza frecuentemente con las dicotiledóneas, aunque el uso con las monocotiledóneas no se encuentra excluido (Schilperoort, 1984). Hooykaas-Van Slogteren *et al.* (1984) demostraron que dos plantas monocotiledóneas (*Narcissus* y *Chlorophytum*) pueden ser infectadas con *Agrobacterium tumefaciens*. Más detalles sobre este tema se pueden encontrar en el apartado Transformación por *Agrobacterium tumefaciens*.

En los puntos 1 y 2 no se utilizan los términos de célula donante y receptora, ya que las participantes en la fusión son generalmente iguales, en lo que se refiere al proceso de fusión e integración del genoma. Sin embargo, en el punto 3 los conceptos de donante y receptor son perfectamente utilizables. Se ha demostrado que la hibridación somática (1) es posible en muchas plantas diferentes, mientras que la hibridación citoplásmica (2), si se exceptúa el trabajo realizado con *Nicotiana*, se encuentra aún en los estados iniciales de la investigación (Galun y Aviv, 1984). El trasplante de núcleos aislados, etc. (3) puede que se desarrolle en el futuro, sin embargo, la transformación (4) constituye ya un área intensiva de investigación (Schilperoort, 1984), y ofrece muchas posibidades para el futuro (apartado Transformación por *Agrobacterium tumefaciens*).

En algunas ocasiones la variación somaclonal (capítulo 21), la fertilización con granos de polen irradiados y la inducción y selección de mutantes *in vitro* se consideran también bajo el término de manipulación genética. Como la aplicación de la manipulación genética, en su más estricto sentido, generalmente requiere mutantes para la selección y aislamiento sistemático de híbridos, este tema se tratará de forma sucinta en el apartado Selección de mutantes.

Existe un gran número de artículos y manuales (que han sido consultados para escribir este capítulo), que contienen información sobre manipulación genética, los más importantes se indican a continuación: Gleba y Sytnik (1984); Harms (1983); Potrykus *et al.* (1983); Linskens *et al.* (1983); Davey y Kumar (1983); Pelletier y Chupeau (1984); Sneep (1982); De Groot *et al.* (1982); Binding *et al.* (1981, 1982); Evans y Bravo (1983a); Ahuja (1982); Wenzel (1983); Thomas *et al.* (1979); Vasil (1978, 1980a); Schieder (1980); Widholm (1978, 1982); Schilperoort (1984); Cocking (1978); Thorpe (1981); Bajaj (1974); Gam-

borg y Wetter (1975); Dodds (1985); Potrykus *et al.* (1983); Shillito *et al.* (1986); Power y Chapman (1985).

Prerrequisitos para el uso de la manipulación genética

Los mejoradores vegetales establecen los siguientes prerrequisitos para la manipulación genética (Sneep, 1982):

1. Las células híbridas deberían, en principio, ser genéticamente estables.
2. Debe ser posible regenerar plantas a partir de protoplastos y células.
3. Las plantas obtenidas no deberían tener en principio esterilidad femenina.
4. La información genética que se transmite a otra célula por hibridación celular u otras técnicas, debe poder ser transmisible a un cultivo.

Hibridación somática

Idea general

Para conseguir la hibridación somática tienen que llevarse a cabo muchas fases, que se resumen a continuación (Fig. 24.3):

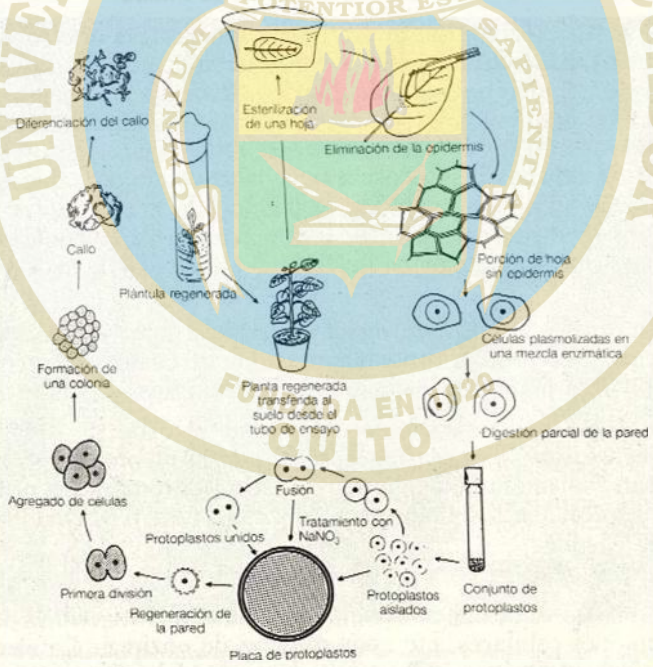


Figura 24.3 Ilustración esquemática del aislamiento, fusión y cultivo de protoplastos de hoja, seguido de la formación de callo y regeneración de plantas. Consultar el texto para una explicación más detallada. Dibujo de Bajaj (1974). La fusión de protoplastos es estimulada por el PEG, y no sólo por el $NaNO_3$

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST SAPIENTIA
FACULTAD EN QUITO

1. Selección y crecimiento del material vegetal.

2. Esterilización del material vegetal, en el caso de que no haya sido cultivado *in vitro*.

3. Tratamiento enzimático para la obtención de protoplastos, y su subsiguiente purificación.

4. Fusión, seguida directamente por la selección de los híbridos somáticos. La selección directa solamente es posible si los productos de fusión son identificables de forma inmediata.

5. Cultivo de los protoplastos, regeneración de la pared celular e inducción de división celular. Los micro-callos se producen como consecuencia de la división celular, y la selección se puede realizar sobre ellos, con la ayuda de mutantes bioquímicos.

6. Regeneración de plantas.

7. Verificación y control de los productos de fusión.

8. Prueba de su utilidad en la mejora vegetal.

Discusión de las diferentes fases

Crecimiento, selección y esterilización del material inicial

El crecimiento del material inicial puede tener lugar *in vivo* o *in vitro*. El material cultivado *in vitro* tiene la ventaja de que no precisa esterilización, como es el caso del material cultivado *in vivo*. Cuando se esterilizan hojas, etc. se debe tener un gran cuidado, ya que este proceso puede afectar a la calidad de los protoplastos. El tejido que se usa generalmente es el mesofilo. La utilización de callos y cultivos en suspensión tiene la desventaja de que son genéticamente inestables, y, por lo tanto, existe un elevado grado de variación. En el caso de material cultivado en invernadero o cámara de crecimiento, se deben mantener condiciones óptimas para el cultivo (Evans y Bravo, 1983a; Binding *et al.*, 1981).

Binding y otros (1981) indicaron su preferencia por los ápices del vástago, para la obtención de protoplastos, mientras que otros autores (ver Potrykus *et al.*, 1983) prefieren plántulas, cotiledones o hipocotilos.

La elección del genotipo puede determinar el éxito de todo el proceso, desde los protoplastos, hasta la regeneración de la planta. Por ejemplo, en el caso del tomate, solamente un genotipo de cada 14 produce una planta completa, después del aislamiento de los protoplastos (Evans y Bravo, 1983a).

Obtención de protoplastos

Los protoplastos se obtienen tratando enzimáticamente células del mesofilo, callo, suspensiones celulares, etc., con mezclas de enzimas. La elección de las enzimas, la concentración a utilizar y la duración del tratamiento pueden encontrarse en los trabajos especializados, que se citan en el apartado Descripción. Generalmente se utiliza una mezcla de celulasa, pectinasa y a veces hemicelulasa, esta última originada principalmente a partir de fuentes microbiológicas. Estas enzimas disuelven respectivamente la celulosa, la pectina (lámina

media) y la hemicelulosa. Si se utiliza como material inicial para la preparación de protoplastos una suspensión celular, se deben utilizar células que se encuentren en la fase exponencial de crecimiento, ya que éstas tienen paredes celulares más finas. Durante el tratamiento enzimático, los protoplastos obtenidos deben ser estabilizados. Por esta razón se añade una sustancia osmóticamente activa, para evitar que los protoplastos puedan reventar. Para estos fines se utiliza glucosa, manitol y sorbitol. Debe tenerse en cuenta que en la medida que el tratamiento afecte de forma negativa a los protoplastos, éstos presentarán una vitalidad más reducida. Por esta razón el tratamiento enzimático debe ser lo más corto posible.

También se debe prestar atención a otras circunstancias del aislamiento, como son: La temperatura, el pH, las condiciones de iluminación, velocidad de la agitación, etc. El tratamiento enzimático se realiza generalmente en la oscuridad.

Una vez que se obtienen los protoplastos es preciso purificarlos. Esto se realiza por: Filtración (a través de tamices de acero inoxidable o nylon) para retirar las impurezas, como paredes celulares, restos de células, etc. (Fig. 24.4), a continuación se realizan repetidas centrifugaciones en una solución azucarada para concentrar los protoplastos. Esto último es con frecuencia difícil, debido a que son muy delicados, en ese caso se hace una centrifugación a baja velocidad, y en esas condiciones se consigue la flotación de los protoplastos intactos, utilizando una solución de 15-20% de azúcar.

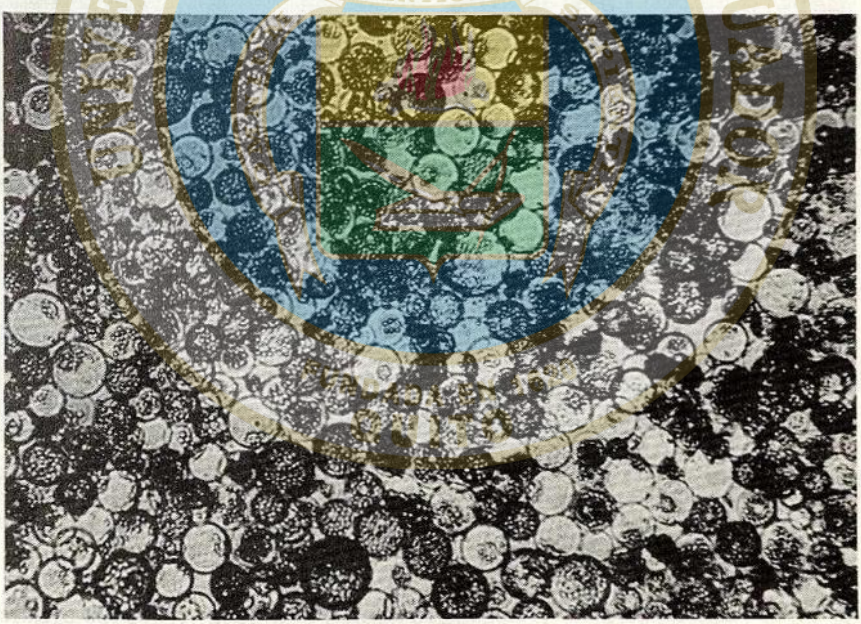


Figura 24.4 Protoplastos purificados de *Nicotiana tabacum*. Fotografía cedida por Koornneef, Departamento de Genética, Universidad Agraria, Wageningen

Fusión de protoplastos

Para obtener una fusión eficaz es preciso trabajar con un elevado número de protoplastos viables. La fusión generalmente se induce incubando el mate-

rial en una alta concentración de PEG, alta concentración de iones Ca^{+2} y con un pH relativamente alto (Menczel, 1983). Este tratamiento es necesario para eliminar las cargas negativas de los protoplastos (Schilperoort, 1983). Tanto el PEG como los iones calcio se retiran por lavado una vez que se ha producido la fusión. En los últimos años se ha hecho popular la electrofusión (Zimmermann, 1982). Este último autor prevé grandes posibilidades para esta técnica, con la que se obtienen protoplastos más viables que con la utilización de PEG. Kameya (1984) realizó la fusión de los protoplastos utilizando dextrano y un estímulo eléctrico.

Si se unen protoplastos diferentes (que provienen de dos genotipos, o especies vegetales diferentes) se produce un heterocarionte (Fig. 24.5), y si la fusión es entre protoplastos semejantes, entonces el resultado es un homocarionte. Una vez que se ha producido la fusión celular, se puede producir la nuclear cuando los núcleos se dividen de forma simultánea.

Figura 24.5 Fusión de un protoplasto blanco y grande (con hebras citoplásmicas), obtenido de un cultivo en suspensión de *Nicotiana tabacum*, con un protoplasto pequeño y verde (conteniendo clorofila) de *Lycopersicon lycopersicum*. Fotografía cedida por Koornneef, Departamento de Genética, Universidad Agraria de Wageningen

Una vez que se ha producido la hibridación somática, el mayor problema consiste en seleccionar los híbridos somáticos en la población celular. Por ejemplo, si la hibridación tiene lugar entre protoplastos de dos clases A y B, la población que se obtiene contendrá protoplastos A y B no fusionados, homocariontes AA y BB, heterocariontes AB y diversos cariontes múltiples (producto de las fusiones). Se han desarrollado muchos procedimientos de selección para separar de una forma eficaz los heterocariontes AB de las mezclas, de aquéllos

se trata en el apartado Procedimientos de selección después de la hibridación somática.

Se han obtenido muchos híbridos somáticos durante los últimos años, especialmente entre miembros de la familia de las Solanáceas (Pelletier y Chupeau, 1984).

El hecho de que la hibridación somática haya tenido éxito entre *Solanum tuberosum* y *Lycopersicon lycopersicum*, entre *Brassica* y *Arabidopsis* y entre *Daucus carota* y *Aegopodium podagraria*, demuestra que también es posible la hibridación intergenérica. Esta es especialmente interesante, ya que los híbridos son imposibles de obtener por métodos sexuales (Vasil, 1978; Thomas *et al.*, 1979). Sin embargo, la utilidad práctica de estos híbridos es muy dudosa, debido a su esterilidad.

La hibridación somática es interesante desde el punto de vista de la agricultura, especialmente para plantas importantes, de las que es posible regenerar plantas completas funcionales a partir de protoplastos (Wenzel, 1983). Ejemplos de lo anterior lo constituyen: *Brassica napus*, *Brassica campestris* × *Brassica oleracea*, *Medicago sativa*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Pennisetum americanum*, *Solanum tuberosum*, *Trifolium repens*, *Daucus carota*, y especies de *Nicotiana* y *Petunia*.

El cultivo de protoplastos

El cultivo de protoplastos tiene unos requerimientos muy específicos, ya que comprende procesos muy diferentes: Regeneración de la pared celular, división celular, formación de callo, y finalmente diferenciación de órganos y/o embriones. Durante la regeneración de la pared celular, la concentración de Ca^{+2} debe ser elevada y el potencial osmótico (negativo) del medio nutritivo debe ser bajo, en estas circunstancias la densidad celular juega un importante papel (cosa que ocurre también en los cultivos celulares en suspensión). Después de la regeneración de la pared celular (durante los primeros días), el potencial osmótico (negativo) del medio debe ser incrementado poco a poco (Burgess, 1983). Las primeras divisiones celulares tienen lugar 2-7 días después del aislamiento de los protoplastos (Fig. 24.6).

El cultivo de los protoplastos se puede realizar de diferentes formas (Vasil, 1980a; Ahuja, 1982). En los medios sólidos generalmente se utiliza agarosa como agente coagulante (se recomienda el producto "Sea Plaque Agarose" de la casa "Marine Colloids", ya que es mucho menos tóxico que el agar). Los protoplastos se cultivan de la siguiente forma:

1. Suspendidos en una capa fina de medio líquido, en una caja de Petri.

2. Sobre medio sólido, de acuerdo con la técnica de Bergmann (1960).

3. Cultivados en micro-cámaras, entre dos láminas de vidrio, o en gotas suspendidas.

4. En gotas de medio líquido (método de micro-gota), que se sitúan en una placa de Petri.

5. En "cultivos nodriza", especialmente cuando la densidad de los protoplastos es baja. También se puede utilizar en su lugar la técnica de capa alimen-

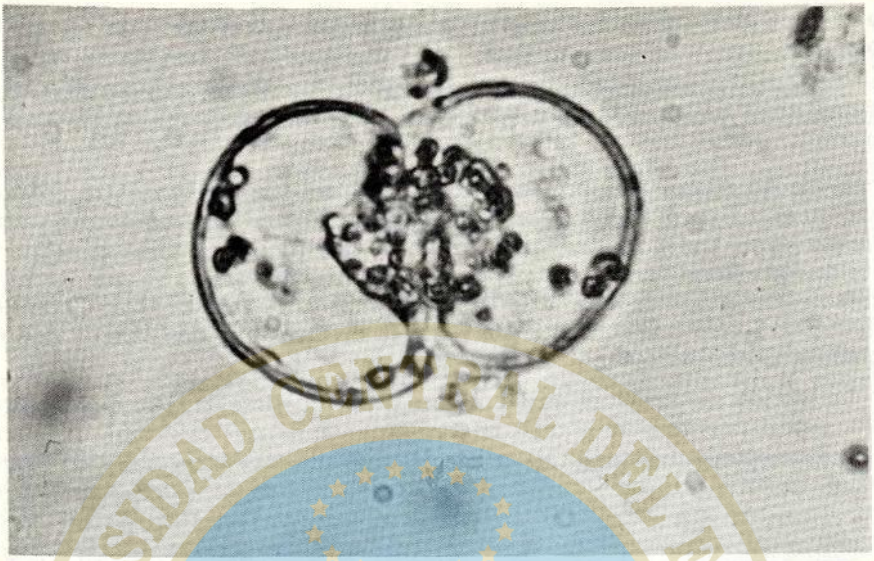


Figura 24.6 Primera división celular de un protoplasto de *Nicotiana tabacum*, que ha llegado ya a formar su pared celular. Fotografía cedida por Koornneef, Departamento de Genética, Universidad Agraria de Wageningen

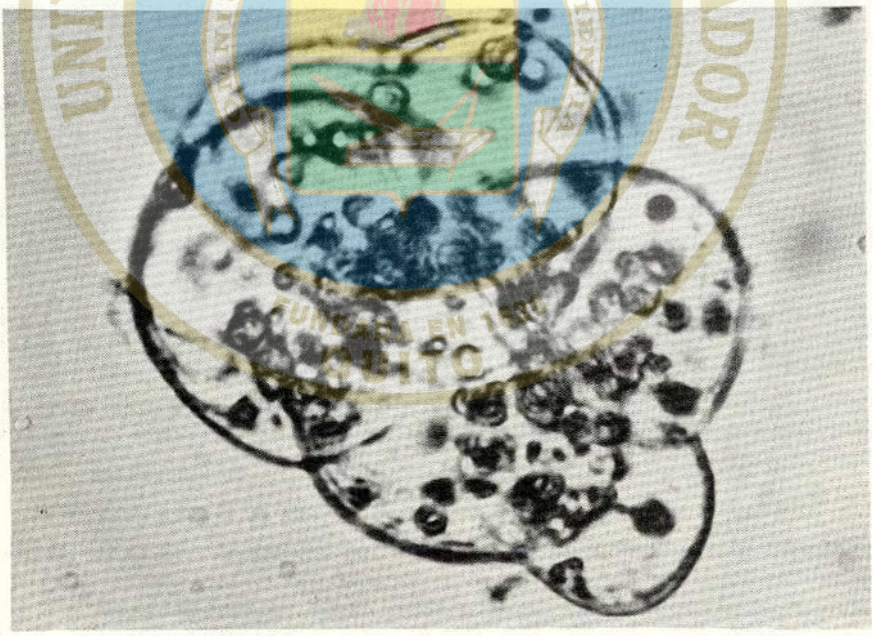


Figura 24.7 Microcallo de *Nicotiana tabacum*, compuesto de unas ocho células, formado a partir de un protoplasto que se ha dividido. Fotografía cedida por Koornneef, Departamento de Genética, Universidad Agraria de Wageningen

tadora, en este caso los protoplastos son cultivados sobre una capa de células, de la que están separados por papel de celofán o de filtro. Raveh *et al.* (1973) fueron los primeros en utilizar esta última técnica, utilizando protoplastos de tabaco irradiados con rayos-X, como capa inferior.

6. En una capa de medio (parcialmente) líquido, colocada sobre medio sólido.

7. Cultivo sobre bolas de agarosa y en discos de agarosa (Shillito *et al.*, 1983; Dons y Bouwer, 1986).

El cultivo de protoplastos con paredes celulares es muy semejante al de células aisladas (capítulo 20), necesitándose prestar especial atención a la composición del medio nutritivo y a los factores de crecimiento físicos (Binding *et al.*, 1981). Los protoplastos se cultivan principalmente en la oscuridad o con baja irradiancia. Después de la producción de micro-callos (Fig. 24.7), es normal hacer un repicado a otro medio para inducir la regeneración.

Regeneración de plantas

La posibilidad de regenerar una planta, a partir de protoplastos aislados es relativamente baja (Evans y Bravo, 1983; Binding *et al.*, 1982). En el año 1983 solamente era posible realizarlo con 66 especies, de las cuales la mayoría (38) pertenecen a la familia de las Solanáceas: por ejemplo, *Nicotiana, Petunia, Solanum, Lycopersicon, Atropa, Browallia, Capsicum, Datura, Hyoscyamus.* Las especies que se indican a continuación pertenecen a otras familias: *Daucus carota, Manihot esculenta, Medicago sativa, Trifolium repens, Brassica napus, Asparagus officinalis* y *Citrus sinensis.* Las Gramíneas (excepto el arroz) son difíciles de regenerar (Potrykus *et al.*, 1983).

Los siguientes factores determinan las posibilidades de éxito para regenerar una planta, a partir de protoplastos (Binding *et al.*, 1982).

1. La familia, la especie y el genotipo.

2. El estado de diferenciación de las células del donante, las células juveniles y células de los ápices del vástago tienen un potencial regenerativo mayor.

3. Las condiciones de crecimiento del material inicial.

4. La utilización de un medio relativamente rico. La formación de callo sobre protoplastos aislados se induce frecuentemente por el medio de Kao y Michayluk (1975), mientras que la formación de embriones y órganos se puede desarrollar en un medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968), al que se añade leche de coco en la proporción de 5-10%. También se usa con frecuencia el medio de Murashige y Skoog (1962).

En el capítulo 20 se dan detalles sobre la regulación de la regeneración de embriones y órganos.

Relevancia de la hibridación somática

A continuación se da una lista de las posibles ventajas de los híbridos somáticos, recopilada con la ayuda de las siguientes referencias: De Groot *et al.*, 1982; Thomas *et al.*, 1979; Ingle, 1982; Schilperoort, 1984; Gleba y Sytnik, 1984; Hermsen, comunicaciones personales.

1. Utilizando la hibridación somática es posible crear híbridos, que no serían posibles con cruzamientos normales, debido a las barreras taxonómicas o a otras. Un ejemplo interesante es la hibridación somática entre *Solanum tuberosum* (forma tubérculos, poca o ninguna resistencia a enfermedades) y *Solanum brevidens* (no forma tubérculos, resistente a enfermedades), que no es posible realizarse *in vivo* (Barsky *et al.*, 1984). Sin embargo, Hermsen ya disponía de muchos híbridos con *S. brevidens* antes de que Barsky iniciase su investigación, teniendo además material avanzado con características de *S. brevidens*. Esto demuestra que los mejoradores clásicos han sido capaces de obtener híbridos de una forma indirecta (lo que se puede llamar un cruce puenteado); este tipo de híbridos se han podido obtener más tarde por hibridación somática.

Otros dos ejemplos de hibridación somática, entre *Brassica oleracea* y *B. campestris* (Schenck y Röbbelen, 1982) y entre *Medicago sativa* y *M. falcata* (Téoulé, 1983) indicaron que con esta técnica se podían conseguir resultados asombrosos. Sin embargo, estas dos hibridaciones somáticas son también posibles por métodos sexuales, aunque los cruces son difíciles *in vivo* y dependen del genotipo.

Se puede concluir que la hibridación somática no ofrece ventajas especiales. Si es posible obtener el híbrido por vía sexual, ya sea de forma directa o por el llamado cruce puenteado, se debería evitar la hibridación somática, ya que los híbridos somáticos entre especies incompatibles son generalmente inutilizables.

2. La hibridación somática puede ser utilizada como alternativa para obtener tetraploides, cuando no se tiene éxito con tratamiento de colchicina (ver también el apartado Obtención de tetraploides y triploides; inducción de pérdida de cromosomas).

La producción de anfidiploides tiene también su atractivo para los mejoradores vegetales, obteniéndose diploides por la hibridación somática de dos haploides.

En todos estos casos, la hibridación somática resulta valiosa sólo cuando los métodos normales de duplicación mitótica no son posibles.

3. En principio la hibridación somática permite producir híbridos a partir de plantas que son subletales, o que poseen órganos sexuales anormales, o que presentan una esterilidad masculina completa. Sin embargo, la demanda de este tipo de híbridos es baja, y además de esta forma quedan almacenados caracteres recesivos no deseados, que pueden reaparecer en cruzamientos posteriores.

4. La hibridación se hace posible entre plantas que aún se encuentran en el estado juvenil (antes de la floración), y también entre las que se encuentran en flor.

5. Una hibridación parcial puede originar los llamados híbridos asimétricos, en los que no se obtiene la combinación de todos los cromosomas, después de la fusión nuclear.

6. Generalmente, con la reproducción sexual, el gameto masculino aporta a su descendencia exclusivamente el núcleo (cromosomas). En el caso de la

hibridación somática, ambos participantes aportan el núcleo y el citoplasma a su descendencia híbrida, cuyo citoplasma es, por lo tanto, también híbrido.

De esta forma es posible transmitir a la descendencia información genética, localizada en el citoplasma del parental masculino (por ejemplo, esterilidad masculina, resistencia a enfermedades y herbicidas). En el caso de la hibridación citoplásmica, el núcleo de uno de los participantes debe ser eliminado, ya sea antes de la fusión (por ejemplo por irradiación), o después de la fusión (después de la hibridación somática).

Desventajas y problemas de la hibridación somática

Resulta poco realista considerar sólo las ventajas e importancia de la hibridación somática, sin dar una idea de algunos de sus inconvenientes, problemas y dificultades técnicas:

1. La falta de un método de selección eficaz (que se lleva a cabo con frecuencia, con la ayuda de mutantes; ver apartado Selección de mutantes), constituye a veces un problema insuperable.

2. Los productos que se obtienen por hibridación somática son con frecuencia desequilibrados (estériles, malformados, inestables), y, por consiguiente, no viables, especialmente si los participantes en la fusión son taxonómicamente distantes. Esta incompatibilidad puede deberse a la elección de las especies vegetales (por ejemplo patata y tomate) o al tipo de célula (por ejemplo células maduras de un fruto y tejido juvenil de una plántula).

3. El desarrollo de callos con quimeras, en lugar de híbridos. Esto se produce generalmente cuando no hay fusión de los núcleos después de la fusión celular, dividiéndose luego de forma independiente. Las plantas que se regeneran a partir de quimeras, suelen perder sus características de quimera, ya que los vástagos y los embriones adventicios, por lo general se desarrollan a partir de una única célula.

4. La hibridación somática de dos diploides produce un anfidiploide, que generalmente resulta desfavorable (excepto cuando se forman tetraploides a propósito). Por esta razón, en la mayor parte de los casos, normalmente se recomienda la hibridación de dos protoplastos haploides.

5. Los productos obtenidos después de la hibridación somática, son con frecuencia muy variables, como consecuencia de (Harms, 1983):

— Eliminación de cromosomas, que es especialmente corriente cuando se hibridan especies taxonómicamente distantes, de forma que los núcleos son incompatibles. Esto conduce a la formación de aneuploides, e incluso cíbridos.

— Translocación.

— Variación somaclonal (ver capítulo 21).

— Segregación de orgánulos. Después de la fusión de dos citoplasmas, tiene lugar lo que se llama eliminación de plastidios y también la recombinación de mitocondrias.

6. Nunca se sabe con certeza si una determinada característica se expresará después de la hibridación somática.

7. La estabilidad genética es pobre durante el cultivo de protoplastos, células y callos (ver capítulo 21).

8. En la actualidad solamente es posible regenerar plantas, a partir de protoplastos, en un número muy reducido de especies (ver apartado Hibridación somática). Los protoplastos y células de Gramíneas son especialmente difíciles de regenerar, con excepción del arroz.

9. Generalmente se acepta que la hibridación somática es posible en condiciones *in vitro*, con especies incompatibles *in vivo*. Pero es importante tener en cuenta que las plantas tienen una fuerte tendencia a mantener su integridad por eliminación de cromosomas (Cocking, 1977), tanto *in vivo* como *in vitro*.

10. La producción de cíbridos (híbridos citoplásmicos) ha tenido poco éxito. El mejor ejemplo de éxito lo constituye la hibridación entre *Nicotiana plumbaginifolia* (no irradiada) y *Nicotiana tabacum* (irradiada con cobalto radiactivo). De esta forma el núcleo de *N. tabacum* queda eliminado, mientras que su citoplasma queda transferido al nuevo híbrido.

Procedimientos de selección después de la hibridación somática

Existen muchos artículos que describen los procedimientos de selección (Widholm, 1978, 1982; Straub, 1976; Vasil, 1978; Schieder, 1980; Davey y Kumar, 1983; Ahuja, 1982; Pelletier y Chupeau, 1984), de los que a continuación ofrecemos un resumen. Gonzalez y Widholm (1985) han descrito ampliamente métodos para la selección de células vegetales con las características deseables, en especial resistencia a inhibidores. El mejorador vegetal tiene la desventaja de que frecuentemente selecciona a nivel de planta, en lugar de hacerlo a nivel celular.

La selección se divide en positiva y negativa. Esta última implica que se mata preferentemente a las células en crecimiento activo, dejando sobrevivir a las células que no presentan crecimiento. En el caso de selección positiva, solamente se seleccionan las células en crecimiento; la mayor parte de los mutantes obtenidos en los cultivos de células vegetales son el resultado de una selección positiva (Meredith, 1984).

A continuación indicamos algunos de los más importantes procedimientos de selección:

1. Aislamiento directo. Cuando se ve la fusión de dos protoplastos con el microscopio, a veces el híbrido resultante puede ser aislado de forma directa y separado utilizando un micro-manipulador o una micro-pipeta. En la práctica, esto es difícil de realizar, ya que los protoplastos aislados son difíciles de cultivar, y es preciso aplicar el "método nodriza", el de la "capa alimentadora" o "la micro-gota". Hein y Schieder (1984) describieron un método nuevo, que se basa en la utilización de un micro-capilar, con el que los productos de fusión pueden ser atrapados.

2. Visual. A veces los heterocariontes pueden distinguirse a simple vista. En el caso de la fusión de protoplastos sin clorofila (con hebras citoplásmicas

características) y protoplastos con clorofila, las células híbridas se identifican con facilidad, por la presencia de hembras citoplásmicas y cloroplastos (Fig. 24.5).

Otro método de selección es colorear los dos tipos de protoplastos con diferentes colorantes fluorescentes. Con la ayuda de clasificadores de células, se pueden seleccionar los heterocariontes que contienen los dos colorantes. El clasificador de células es lo que se llama un citómetro de flujo continuo, en el que un gran número de protoplastos fusionados y no fusionados, pasan a través de un rayo láser. Las células absorben energía luminosa, y una fracción de la misma se reemite como fluorescencia. La medida de esta última permite la clasificación de los productos de fusión. Los heterocariontes se seleccionan en base a su coloración fluorescente diferencial (Harkins y Galbraith, 1984).

3. Separación sobre la base de características físicas. Se están desarrollando métodos físicos, mediante los cuales se pueden seleccionar las células híbridas. Estos métodos permiten, por ejemplo, distinguir la carga eléctrica del híbrido y la de cada uno de los dos participantes en la fusión (Vienken *et al.*, 1981), también puede distinguirse el efecto de la centrifugación sobre el híbrido, en comparación con el que se obtiene en los participantes en la fusión. Estos métodos, sin embargo, no producen una selección completa de los híbridos, sino que consiguen una mayor concentración de los mismos.

4. Complementación genética de las deficiencias inducidas recesivas. En este caso el híbrido AB no posee las deficiencias mostradas por los participantes en la fusión A y B. Por ejemplo:

— La hibridación entre dos mutantes recesivos, sensibles a la luz, de *Nicotiana tabacum*; (SSvv) con el sub-letal (ssVV) origina un híbrido (SSssVVvv) que no es sensible a la luz; se seleccionan las colonias supervivientes, que forman clorofila con elevada irradiancia.

— El híbrido entre *Solanum nigrum* y *Petunia hybrida* puede desarrollarse en un medio que contiene dietilpirocarbamato (al que es sensible el *S. nigrum*) y acetato de iodo (al que es sensible *P. hybrida).*

— Dos líneas celulares de *Nicotiana sylvestris* son resistentes cada una de ellas a un producto químico diferente, siendo el híbrido resistente a los dos compuestos.

— Tanto *Nicotiana glauca* como *B. langsdorfii* precisan auxina para su crecimiento, sin embargo, el híbrido somático es autotrofo para dicho compuesto.

— La línea celular A de la hepática *Sphaerocarpos donelli* precisa ácido nicotínico para su crecimiento, y la línea celular B necesita azúcar, ya que es albina. Sin embargo, el híbrido puede crecer sin ácido nicotínico ni azúcar en el medio. Las líneas celulares A y B reciben el nombre de líneas mutantes auxotróficas.

5. Efecto de la heterosis. Las células híbridas que se desarrollan por fusión entre protoplastos deficitarios en clorofila de *Datura innoxia* y protoplastos verdes de *Datura sanguinea* se caracterizan por presentar un crecimiento mejor que las colonias de células que se desarrollan a partir de protoplastos de cada uno de los participantes en la fusión.

Selección de mutantes

Para la producción y selección de híbridos somáticos, frecuentemente se utilizan líneas celulares con características excepcionales (Ingram y MacDonald, 1986), que se han producido por mutación espontánea (variación somaclonal, capítulo 21), o bien inducida. Además los mutantes se utilizan en la mejora vegetal (resistencia a enfermedades) y en la biosíntesis de compuestos *in vitro* (Fig. 24.8). La producción de mutantes está con frecuencia muy lejos de ser sencilla, precisando además de una gran cantidad de tiempo. Generalmente el término línea celular variante indica que se desconoce si la mutación en esta línea se originó de forma espontánea o como resultado de cambios epigenéticos (Maliga, 1984).

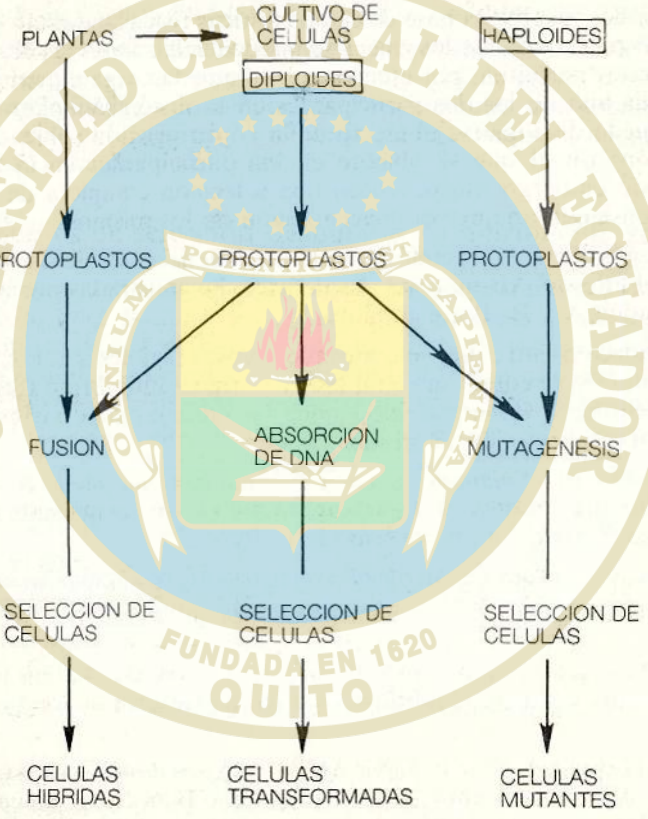


Figura 24.8 Representación esquemática de los distintos tipos de material inicial (diploide y haploide), que se utilizan en ingeniería o en manipulación genética (hibridación somática, transformación y mejora por mutación). De Gamborg *et al.* (1974)

Los cultivos en suspensión de células y protoplastos posibilitan la prospección de un gran número de células, para buscar las mutaciones deseadas, una vez que se ha producido la inducción de la mutación. Las mutaciones se pueden inducir por medios químicos (etilmetanosulfonato N-etil-N-nitro-úrea), físicos

(rayos-X o radiación gamma), o por transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Las células haploides presentan la gran ventaja de que los mutantes recesivos se ven de forma inmediata (Maliga, 1984; King, 1984; Thomas *et al.*, 1979; Straub, 1976; Vasil, 1978). La selección de mutantes se puede hacer de dos formas:

1. Directamente. Las células mutantes tienen la ventaja selectiva (selección positiva) sobre el resto de las células. Este es el tipo de selección más común y se pueden citar como ejemplos la resistencia a la sal, aminoácidos o sus derivados, bases de ácidos nucleicos o sus derivados, antibióticos, estrés hídrico, sustancias tóxicas, fitotoxinas y metales pesados.

2. Indirectamente. Las células no mutadas son eliminadas de forma selectiva, ya que son metabólicamente activas bajo ciertas condiciones de crecimiento, que son limitantes para el crecimiento de las células mutadas. Los mutantes seleccionados son repicados a medios con condiciones enriquecidas, que no son limitantes para el crecimiento. A este procedimiento se le llama de enriquecimiento.

Las líneas celulares auxotróficas son un ejemplo de selección indirecta de mutantes. Crecen muy lentamente en medios deficientes en un componente esencial, mientras que presentan un crecimiento normal cuando éste es incorporado al medio.

Los métodos *in vitro* para la selección de mutantes ofrecen algunas ventajas importantes, sobre los correspondientes *in vivo* (Gunn y Day, 1986):

1. Se pueden utilizar en cualquier época del año.
2. Frecuentemente permiten mantener un mejor control de las condiciones del ensayo.
3. Evitan muchos peligros comunes a los ensayos de campo e invernadero.
4. Reducen el espacio ocupado por las muestras.

Transformación por *Agrobacterium tumefaciens*

La forma de manipulación genética más natural con ayuda de DNA recombinante, se puede llevar a cabo utilizando la bacteria del suelo *A. tumefaciens* (bacteria de la agalla del cuello). Si una dicotiledónea es infectada por la bacteria de la agalla del cuello, las células vegetales quedan transformadas y se hacen autotrofas desde el punto de vista hormonal. Las células transformadas adquieren la capacidad de producir auxina y citokinina en cantidades tan elevadas que se producen tumores. Con la ayuda de algunos artículos de revisión (Wullems *et al.*, 1982, 1986; Ooms *et al.*, 1983; Dodds, 1985; Magnien y Nettancourt, 1985; Gheysen *et al.*, 1985; Hernalsteens *et al.*, 1980), describimos en qué consiste la transformación por *A. tumefaciens*, así como su importancia para la transferencia de genes en las plantas superiores.

La bacteria *A. tumefaciens*, además de DNA cromosómico contiene un gran plásmido, al que se denomina Ti; plásmido inductor de tumores. Si una planta es infectada por la bacteria (que no entra en la célula), parte de ese plásmido (la llamada región-T) se une al DNA de la célula vegetal, por un mecanismo aún desconocido. El DNA bacteriano se recombina con el DNA cromosómico en el núcleo de la célula vegetal. Este DNA foráneo pasa a formar parte del

genoma vegetal, y recibe el nombre de DNA transferido o T-DNA. Existe una serie de genes dentro del plásmido Ti, que se expresan en la planta: los genes onc o tumorales. Un gen es el responsable de la sobre-producción de compuestos tipo-citokinina, mientras que otros dos genes son los responsables de la producción de auxina. Si las células vegetales son transformadas por *A. tumefaciens* se hacen autotrofas desde el punto de vista hormonal, como resultado de una sobre-producción de citokinina y auxina. Si se produce una mutación en el locus-auxina del plásmido Ti, después de la transformación de las células vegetales, se forman tumores con vástagos (llamados mutantes caulogénicos). Si la mutación se produce en el locus-citokinina, se forman tumores con gran cantidad de raíces (mutantes rizogénicos). Otros genes en el plásmido-Ti son responsables de la síntesis, en la planta transformada de la opina específica tumoral (octopina y nopalina). Las opinas son derivados poco corrientes de los aminoácidos que se producen en los tejidos de la agalla del cuello.

De la misma forma que *A. tumefaciens* produce tumores (agallas del cuello), *A. rhizogenes* produce la enfermedad de las raíces en forma de cabellera en las dicotiledóneas. *A. rhizogenes* tiene un plásmido-Ri, parte del cual se puede integrar en el cromosoma vegetal.

Para que el DNA sea transportado por *A. tumefaciens*, primero debe unirse a la región-T del plásmido Ti. Wullems *et al.* (1986) han indicado, que para la transferencia de genes, es un prerequisito el aislamiento y caracterización de aquellos que son de interés. El aislamiento de genes específicos, a partir de cromosomas eucarióticos fragmentados es todavía extremadamente difícil. Muchos caracteres complejos de importancia agrícola, como el rendimiento y la resistencia a factores bióticos y abióticos, son caracteres poligénicos, que no se encuentran ni bien identificados ni bioquímicamente caracterizados. La transformación de las plantas se puede obtener por distintos métodos (Wullems *et al.*, 1982, 1986):

1. Por el procedimiento de co-cultivo (Marton *et al.*, 1979). Las bacterias son co-cultivadas de forma temporal con protoplastos, una vez que éstos han regenerado una nueva pared celular; la frecuencia de transformación con este procedimiento es muy elevada (Gheysen *et al.*, 1985). Desgraciadamente este procedimiento sólo funciona con dicotiledóneas, a pesar de que los primeros resultados fueron descritos en monocotiledóneas (Magnien y De Nettancourt, 1985). Cuando se produce la transformación de células y/o protoplastos, por medio de la bacteria de la agalla del cuello, se plantea el problema de cómo seleccionar esas células transformadas. El sistema de selección generalmente hace uso de la característica de autotrofismo para las hormonas, que se produce por la transformación por *A. tumefaciens*. Sólo las células hormonalmente autotrofas son capaces de desarrollarse en un medio sin hormonas (o en la primera selección en un medio con baja concentración de hormonas). Un aspecto interesante del co-cultivo es que frecuentemente produce transformantes tipo-octopina, con una elevada capacidad para la formación de vástagos. En los experimentos de co-cultivo (esto es válido también para el siguiente apartado) se utilizan con frecuencia los llamados plásmidos-Ti desarmados, en los cuales se han mutado o borrado los genes onc; la ventaja de esto consiste en que se pueden regenerar plantas normales a partir de células transformadas.

2. Un método de extraordinaria importancia en el presente es el llamado de regeneración-transformación de disco de hoja (Horsch *et al.*, 1985). Para

conseguir la infección los discos de hoja se colocan en una suspensión de *A. tumefaciens* (Fig. 24.9). Si una célula transformada regenera una nueva planta, el nuevo o los nuevos genes quedan incorporados a la planta. Utilizando este método, relativamente simple, existe una buena posibilidad de que los vástagos, formados de forma adventicia, sean transformados.

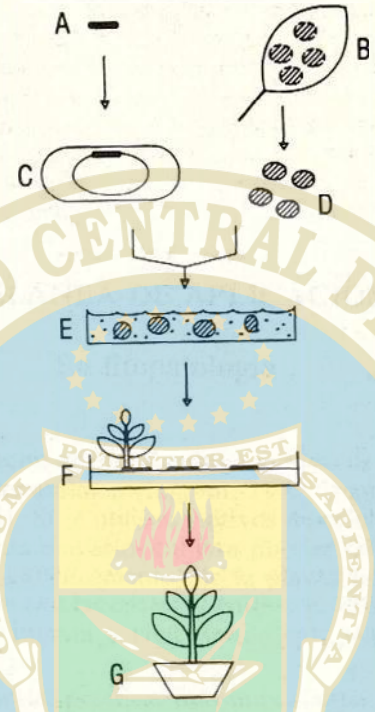


Figura 24.9 Representación esquemática de la transferencia de un gen aislado a una planta, por transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (Dons y De Jong, 1986). A: gen nuevo. B: hoja. C: gen nuevo incorporado en el plásmido-Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. D: explantos de hoja. E: explantos de hoja en una suspensión de bacterias. F: regeneración de un vástago transformado. G: planta con la nueva característica (gen)

3. Por aplicación del método de transformación de DNA (Draper *et al.*, 1986), que vale tanto para monocotiledóneas como para dicotiledóneas. Este método está diseñado especialmente para evitar la interacción celular natural entre *Agrobacterium* y las dicotiledóneas. El DNA puede ser ofrecido de cuatro formas diferentes:

— como DNA puro.
— como fosfato cálcico-DNA co-precipitado.
— como DNA encapsulado en liposomas.
— por micro-inyección directa de DNA.

4. También se pueden utilizar otros virus y bacterias, como vectores, para la transferencia de genes vegetales (Dodds, 1985).

5. Fusión de protoplastos normales y protoplastos de tejidos tumorales.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

25
MISCELANEA DE APLICACIONES

En fitopatología

Perspectiva general

Es bien conocido el hecho de que el cultivo *in vitro* de las plantas superiores puede ser utilizado en fitopatología (Ingram, 1973; Ingram y Helgeson, 1980; Miller, 1985; Wood, 1985). Si se utilizan cultivos de células, callos y protoplastos, se debe tener en cuenta que estos cultivos pueden diferir en muchos aspectos (fisiológica y a veces genéticamente) de la planta intacta. A continuación damos una lista de las áreas en las cuales el cultivo *in vitro* de las plantas puede ayudar en fitopatología (Ingram y Helgeson, 1980; Miller y Maxwell, 1983; Miller, 1985; Wood, 1985):

1. Una de las aplicaciones prácticas más importantes del cultivo *in vitro* en fitopatología, es, sin lugar a dudas, la producción de plantas libres de virus, hongos y bacterias (ver capítulo 19).

2. El cultivo *in vitro* de un parásito y su huésped, bajo condiciones controladas, con la eliminación de otros parásitos indeseables, presenta muchas ventajas; las interacciones huésped-parásito pueden ser estudiadas de forma eficaz *in vitro*. Por ejemplo: la adición y absorción de compuestos marcados puede ser conseguida con facilidad; solamente se necesita un número limitado de células huésped para los experimentos; se pueden llevar a cabo cambios, con facilidad, en las relaciones huésped parásito, variando el medio nutritivo; el número de células huésped y el tamaño del inoculante puede ser controlado, la inoculación es posible sin producir heridas.

3. La utilización del cultivo de tejidos nos facilita una visión más profunda sobre el comportamiento de los virus en las células o tejidos vegetales; cómo entran las partículas víricas en las células o los protoplastos y se hacen infecciosas; cómo se multiplican los virus en el interior de las células y los protoplastos; cómo reacciona el huésped frente a la infección vírica; cómo se mueven las partículas víricas de célula a célula (Hildebrandt, 1977; Takebe, 1976; Wood, 1985).

El hecho de ser mucho más fácil para las partículas víricas penetrar en un protoplasto que en una célula, fue la razón inmediata para utilizar protoplastos, como modelos para estudiar las interacciones entre virus y plantas superiores, a nivel celular.

4. Nematología. El cultivo *in vitro* se está utilizando también con frecuencia en la investigación sobre nematodos (Krusberg y Babineau, 1979).

5. Agallas del cuello. Los especialistas en cultivo de tejidos han mostrado interés durante mucho tiempo, en el cultivo *in vitro* de los llamados tejidos de "agalla del cuello". En 1974 Braun dio una detallada información en su manual sobre *Agrobacterium tumefaciens*, que induce el crecimiento en los tejidos vegetales sin la necesidad de auxina y/o citokinina. Después de la infección de una planta dicotiledónea, las células se hacen autónomas en su crecimiento y comienzan una división celular incontrolada; la infección por *A. tumefaciens* puede dar origen a la formación de raíces (como ocurre cuando se adicionan auxinas) o vástagos (como es el caso cuando se adicionan citokininas), sin que sea necesaria la adición de estos reguladores. En los últimos años *A. tumefaciens* ha jugado un papel muy importante en la manipulación genética que utiliza DNA recombinante; el plásmido-Ti de esta bacteria puede transferir genes, que se pueden expresar en otra planta y ser transferidos a su descendencia. Schilperoort (1984) ha publicado recientemente un extenso artículo de revisión, que nos muestra las enormes posibilidades de la manipulación genética utilizando *A. tumefaciens* (ver apartado Transformación por *Agrobacterium tumefaciens*).

Finalmente convendría tener en cuenta que *A. tumefaciens* no constituye el único medio para inducir la tumoración (Thomas y Davey, 1975). Esta se puede conseguir también por:

a. *Agrobacterium rhizogenes*.

b. Virus de lesiones.

c. Por cruzamiento. Tras el cruzamiento de *Nicotiana glauca* con *Nicotiana langsdorffii*, aparecen lo que se llaman tumores genéticos, a pesar del hecho de que ninguno de los dos parentales forma tumores.

6. La inducción de mutaciones puede ser utilizada para obtener plantas resistentes a enfermedades. Algunos ejemplos de este caso se pueden encontrar al final del apartado Inducción de mutación *in vitro*.

Transporte de material vegetal libre de enfermedades

Como actualmente las plantas libres de enfermedades se obtienen con mayor facilidad por medio del cultivo de meristemos, seguido del clonado *in vitro*, se plantean algunas cuestiones sobre la seguridad en el transporte de material *in vitro*, libre de enfermedades (exportación, importación y transporte bajo condiciones estériles). Recientemente dos artículos de revisión (Kahn, 1986; Parliman, 1986) han abordado el tema de la cuarentena y el transporte de plantas como cultivo de tejidos. Se discuten los siguientes aspectos:

1. Las regulaciones y principios de las cuarentenas.

2. Las vías naturales, así como las creadas por el hombre para la introducción de plantas exóticas.

3. Protección y análisis de los riesgos de plagas.

4. El cultivo de tejidos como protección.

El transporte de material vegetal libre de enfermedades tiene importancia tanto para el país exportador como para el importador. Si el exportador garantiza que el material cultivado *in vitro* está libre de enfermedades y el importador lo comprueba, pocos problemas pueden existir. Es de vital importancia que el suelo quede completamente excluido, ya que puede ser una fuente de infección por animales o micro-organismos. La verificación de que un cultivo *in vitro* está de hecho libre de todo tipo de infecciones (incluyendo las internas), está muy lejos de ser algo sencillo. Teniendo en cuenta que el transporte tarda siempre un cierto número de días (por ejemplo desde Holanda a Australia), resulta casi seguro que las infecciones puedan ser detectadas por las autoridades fitosanitarias, a no ser que:

— Se disponga de refrigeración durante el transporte.
— Se hayan añadido antibióticos al medio.
— Se añada carbón activado al medio.

Si el exportador no hace uso de este tipo de medidas, para contrarrestar la infección, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. Solamente los cultivos con infecciones internas pueden ser importados sin detección.

2. Las pruebas para detectar infecciones internas constituyen la única vía para asegurarse de que un material está libre de enfermedades (ver apartados *Cultivos aparentemente estériles* e *Infecciones internas).*

3. Es necesario un test de virus para estar absolutamente seguro de que el material vegetal no contiene virus conocidos (ver apartado *Identificación de los virus).*

4. A pesar de todas estas precauciones, aún se pueden producir infecciones. Una de las más importantes causas de contaminación es el rápido cambio de presión que se produce dentro de los recipientes, durante el transporte aéreo, cada vez que un avión aterriza o despega (Turner, 1983).

La opinión mundial acepta la conclusión de que el transporte libre de enfermedades resulta generalmente seguro. Sin embargo, las autoridades fitosanitarias australianas exigen además el que se cumplan muchas otras condiciones, algunas de las cuales son:

1. El material vegetal cultivado *in vitro* también precisa licencia de importación.

2. Algunas plantas (clavel, crisantemo, *Hydrangea, Pelargonium* y fresa) pueden ser obtenidas, exclusivamente, a partir de suministradores aprobados y deben ir acompañadas por un certificado fitosanitario (Anónimo, 1980).

3. Los contenedores de plástico y vidrio, así como el agar deben ser transparentes y sin ninguna turbidez, ya que así se hace posible la inspección visual.

4. Si aparecen saprofitos (que no tienen por que ser necesariamente patógenos) es suficiente desde el punto de vista de la inspección, como indicador de que el material probablemente no está libre de enfermedades.

5. No se debe añadir antibióticos al medio, ya que éstos evitarían la expresión de los micro-organismos.

6. A determinados materiales, se les puede exigir una cuarentena de hasta 5 días.

7. Los tubos de ensayo, contenedores de plástico, etc., deben ser cerrados firmemente; se exigen condiciones especiales para el cierre de tubos de ensayo, etc.

8. Si se encuentra algún insecto vivo en el envío (por ejemplo, en el paquete), todo el conjunto es fumigado, incluyendo los cultivos *in vitro*.

9. Se pueden retener muestras durante un período de tiempo, para determinar la presencia de antibióticos y micro-organismos.

Ejemplos de plantas que se transportan libres de enfermedades son, entre otras, el espárrago (Kahn, 1976) y *Citrus* (Button, 1977).

En mejora vegetal

Desarrollo de quimeras *in vitro*

Existen pocas referencias sobre la inducción de quimeras por cultivo *in vitro*. Teniendo en cuenta que en el pasado, especialmente cuando se trataba de cultivos hortícolas, se pensaba que las quimeras se producían por la acción del injerto (las plantas resultantes se denominaban híbridos por injerto), se predijo que se obtendrían quimeras utilizando esta técnica *in vitro*. Sin embargo, no ocurre así.

Carlson y Chaleff (1974) fueron los primeros que describieron la formación de quimeras *in vitro*. En la formación de vástagos adventicios sobre callos de *Nicotiana tabacum* y *N. glauca* × *N. langsdorffii*, se regeneraron 28 quimeras de un total de 7.000 plantas. Se encontraron quimeras clorofílicas, regeneradas a partir de callos de *Nicotiana tabacum* (Opatrny y Landa, 1974). Sree Ramulu *et al.* (1986) encontraron que una elevada proporción de callos de protoplastos de patata, son mosaicos por su composición, consisten en grupos de células diversas (presumiblemente mutadas): una mayoría de los callos en mosaico originaron protoclones y mezclas de protoclones normales y variantes; después de la formación de tubérculos de las plantas regeneradas se encontraron nuevos tipos de plantas, debidas probablemente a quimerismo, indicando la persistencia de este fenómeno.

En 1984 Marcotrigiano y Gouin (1984; 1984a), describieron la formación experimental de quimeras en tabaco, utilizando una técnica totalmente diferente de la de Carlson y Chaleff (1974). Marcotrigiano y Gouin (1984; 1984a) obtuvieron callos quiméricos mezclando suspensiones celulares, compuestas por una mezcla de células (clorofílicas y albinas). Estas suspensiones celulares se habían originado de células y suspensiones celulares de hipocotilos y cotiledones verdes y albinos respectivamente. Cuando los callos quiméricos fueron inducidos a formar vástagos adventicios, solamente se produjeron 4 quimeras, de un total de 1.321 plantas. El origen de las quimeras fue explicado de la siguiente forma:

1. Como resultado de la técnica experimental: mezcla de dos tipos de suspensiones celulares, seguida de la regeneración de vástagos adventicios a partir de más de una célula (Fig. 25.1).

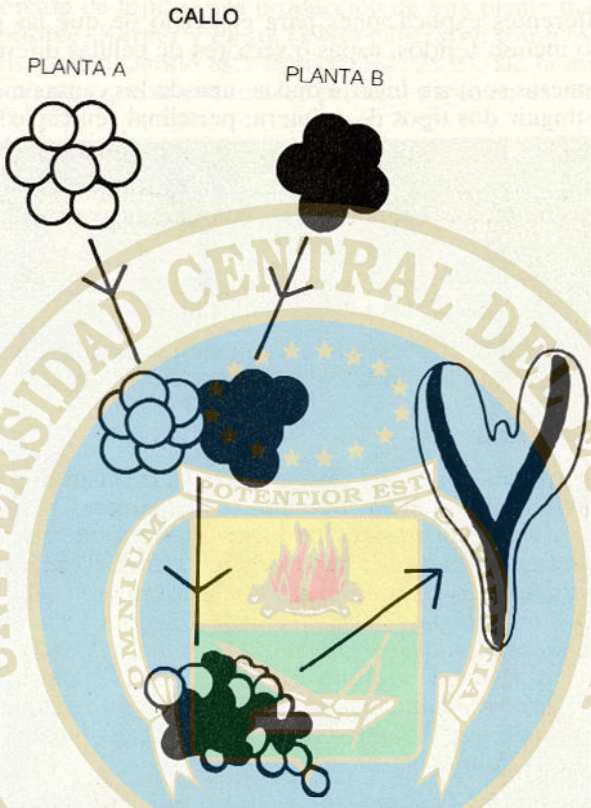


Figura 25.1 Ilustración esquemática (hipotética) de la forma en que se pueden producir las quimeras, cuando se mezclan tejidos callosos de dos plantas

2. Como resultado de una mutación espontánea, que ocurre con frecuencia en cultivo de tejidos. Esta explicación, desde luego no debe ser descartada, ya que incluso en las plantas albinas (los controles) que se formaron a partir de células albinas, a veces aparecen manchas de color verde.

Finalmente, en otros capítulos de este libro hemos podido ver que se pueden obtener quimeras (por ejemplo, por hibridación somática), pero en esos casos, el fin de los experimentos no era la producción de quimeras. La transformación de los tejidos vegetales por *Agrobacterium tumefaciens* puede conducir también a plantas con forma de quimera.

Se puede concluir que las quimeras se pueden formar con la ayuda del cultivo *in vitro,* aunque no resulta significativo en agricultura ni en horticultura.

Queda por contestar la pregunta de si la formación de quimeras, en plantas ornamentales, *in vitro* es deseable y comercialmente posible (Fig. 25.1).

Separación de quimeras y aislamiento de mutantes

Existen diferentes explicaciones para el hecho de que las plantas puedan tener células o incluso tejidos, capas o sectores de células diferentes.

1. Las quimeras son, sin lugar a dudas, una de las causas más importantes. Se pueden distinguir dos tipos de quimera; periclinal (en capas) y sectorial (en sectores).

2. Durante la división celular, a veces como resultado de un error pueden aparecer células mutadas, que pueden ser conservadas y propagadas, o perderse (ver capítulo 21).

3. Por el desarrollo de células mutadas, de forma espontánea o inducida, pueden originarse los sectores mutados de las plantas.

Es siempre deseable que las quimeras queden separadas en sus tipos celulares constituyentes o que los mutantes sean aislados.

Separación de quimeras

Dommergues y Gillot (1973) y Johnson (1980) demostraron que los cultivares de clavel White Sim y Jacqueline Sim (con quimeras periclinales) podían ser separados *in vitro*. La manera de lograrlo es por formación de vástagos adventicios a partir de una única capa celular. Otras quimeras se han podido separar, con la ayuda del cultivo *in vitro*, en crisantemo (Bush *et al.*, 1976), *Vitis vinifera* (Skene y Barlass, 1983), *Petunia* (Pelletier y Delise, 1969; Bino *et al.*, 1984) y *Euphorbia pulcherrima* (Preil y Engelhardt, 1982). Otros ejemplos se pueden encontrar en el capítulo 21. Kameya (1975) aisló protoplastos a partir de un *Pelargonium* quimérico, y regeneró tanto plantas verdes como albinas, demostrando que el cultivo de los protoplastos puede ser también útil en la separación de quimeras.

Seeni y Gnanam (1981) demostraron, utilizando un tomate heterocigótico y quimérico (con zonas verdes, verde-amarillentas y blancas) que se regeneraban genotipos sólidos (no quiméricos) por la formación *in vitro* de brotes adventicios. De esta forma es posible, utilizando la formación de brotes adventicios, perder la característica quimérica en el caso del tomate, y seleccionar un genotipo con una actividad fotosintética aumentada. No es posible por los métodos de mejora tradicionales seleccionar de forma eficaz genotipos de tomate con un incremento en su actividad fotosintética: Esto se debe a que la capacidad fotosintética se localiza en los cloroplastos, que sólo se heredan por vía materna. Es importante tener en cuenta que la transferencia de caracteres heredables localizados en el citoplasma, se puede también hacer posible por cibridación (capítulo 24).

Aislamiento de mutaciones

Algunas mutaciones ocurren de forma natural, y si son interesantes (por ejemplo, un nuevo color de flor) pueden ser aisladas. Frecuentemente la parte mutada de la planta es tan pequeña, que tomar un esqueje *in vivo* resulta

imposible. Este caso puede ser ilustrado con *Kalanchoë blossfeldiana* (Karper y Pierik, 1981). En las inflorescencias de distintos cultivares de esta especie, aparecen a veces de forma espontánea flores mutadas. Si ya se conoce cómo regenerar plantas *in vitro* a partir de flores y tallos florales, el aislamiento de una pequeña porción de tejido, y la producción de una planta mutante a partir de ella resulta posible. Karper y Pierik (1981) mostraron cómo es posible obtener nuevos cultivares utilizando esta técnica (Fig. 25.2). De la misma forma se pueden aislar mutantes que se encuentren presentes sólo en un sector limitado.

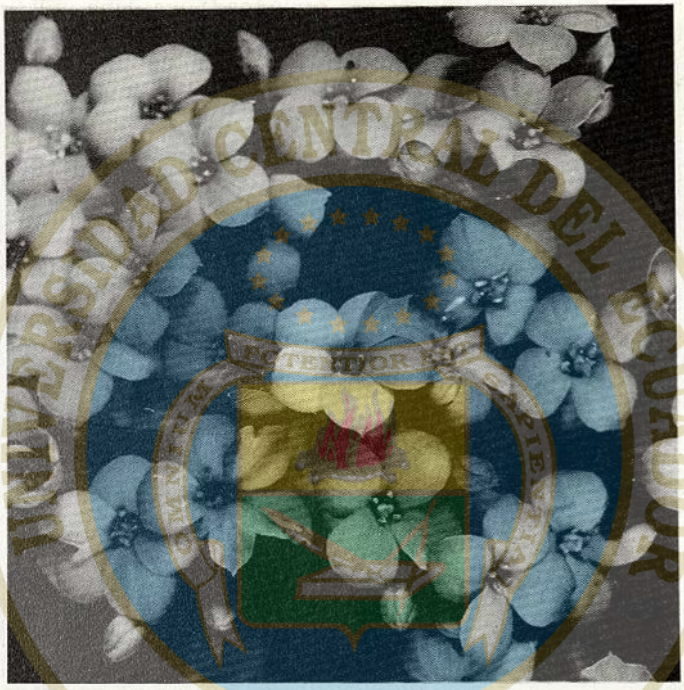


Figura 25.2 Parte de la inflorescencia del mutante rosa asalmonado de *Kalanchoë blossfeldiana* "Roodkapje". En el centro hay una flor anormal con pétalos. Tres de los cuales son amarillos, uno rosa, y uno mitad rosa, mitad amarillo. Los tejidos aislados *in vitro*, de la parte amarilla de la flor, regeneran plantas amarillas (Pierik, Karper y Steegmans, datos sin publicar)

Nickell (1973) dio otro ejemplo de aislamiento de mutantes. Utilizando caña de azúcar demostró que en cultivos en suspensión y de callo se encontraban presentes todo tipo de células desviadas; Nickell fue capaz con cultivo de células, de aislar diferentes líneas celulares y regenerar plantas con diferentes números de cromosomas.

Obtención de tetraploides y triploides; inducción de pérdida de cromosomas

1. La duplicación del número de cromosomas (a veces muy deseable en la mejora vegetal), se realiza habitualmente por adición de colchicina, un alcaloi-

de aislado del croco de otoño *Colchicum autumnale*. Las semillas, épices caulinares o esquejes se mojan en una solución de colchicina. Si este método se realiza *in vivo* generalmente se producen citoquimeras (Hermsen *et al.*, 1981). La utilización de métodos *in vitro* puede reducir en gran número la aparición de quimeras.

La colchicina se disuelve primero en agua, y debido a su termolabilidad debe ser esterilizada por filtración para su empleo *in vitro* (Griesbach, 1981). No se debe tener en cuenta sólo la concentración usada, sino también el tiempo de acción: Si se realiza un tratamiento prolongado, se debe utilizar una baja concentración de colchicina; mientras que si el tratamiento es corto se utilizan concentraciones más altas (Perry y Lyrene, 1984). La concentración puede variar entre 0,01 y 0,3% (p/v); ver tabla siguiente:

Especie vegetal	*Material*	*Conc. % (p/v)*	*Referencia*
Valeriana wallichii	Cultivo de células	0,05-0,20	Chavadej y Becker (1984)
Vaccinium sp.	Vástagos	0,01-0,20	Lyrene (1984), Perry y Lyrene (1984), Goldy y Lyrene (1984).
Aranda "Christine"	Apice caulinar	0,05-0,075	Lee y Mowe (1983).
Phalaenopsis (híbridos)	Apice caulinar	0,05	Griesbach (1981)
Saccharum officinale	Suspensión celular	0,01	Liu y Shang (1974), Nickell (1973).
Dendrobium (híbridos)	Protocormos	0,01-0,05	Vajrabhava y Chaichareon (1974)
Rubus sp.	Vástagos	0,02-0,08	Gupton (1986)
Atractylodes lancea	Vástagos	0,3	Hiraoka (1986)

La inducción de la duplicación de cromosomas no siempre es fácil, como pudieron comprobar Wenzel y Foroughi-Wehr (1984) trabajando con patatas monoploides; sin embargo, este problema no se produjo al añadir colchicina a patatas diploides.

2. Frecuentemente se obtienen tetraploides después de la formación de vástagos adventicios, sin tratamiento con colchicina. Existen dos posibilidades para explicar el desarrollo de estos tetraploides:

— Existen células tetraploides, de forma natural en los individuos diploides, a partir de las cuales se pueden obtener tetraploides completos (no quiméricos), debido a que la formación de brotes adventicios generalmente ocurre a partir de una única célula (capa).

— En la formación de brotes adventicios *in vitro*, se puede producir endomitosis (falta de separación de los cromosomas en la división celular), posiblemente debido al uso de citokinina, como consecuencia se forman tetraploides.

Algunos ejemplos de plantas, en las que se produce la duplicación del número de cromosomas, después de la formación de brotes adventicios, son los siguientes:

Nicotiana tabacum	Murashige y Nakano (1966)
Nicotiana tabacum "Samson"	Dulieu (1972)
Brassica oleracea	Horak *et al.* (1975)
Daucus carota	Dudits *et al.* (1976)
Dendrobium (híbridos)	Vajrabhava (1977)
Kalanchoë "Roodkapje"	Pierik y Karper (no publicado)
Híbridos *Lolium-Festuca*	Rybczynsky *et al.* (1983)
Solanum tuberosum	Karp *et al.* (1984)
Solanum (híbridos)	Hermsen *et al.* (1981)

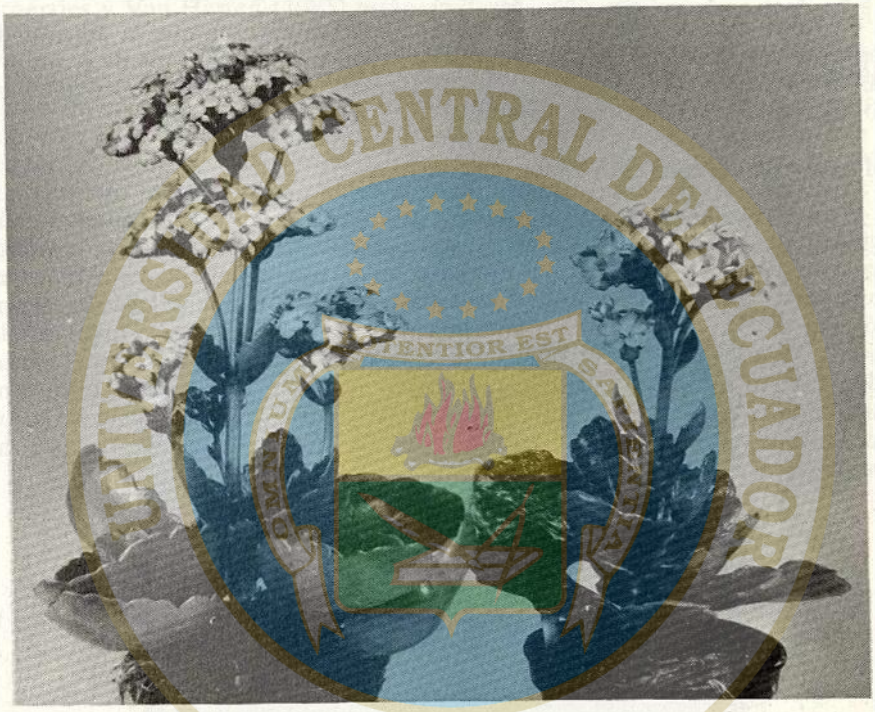


Figura 25.3 Izquierda: planta tetraploide de *Kalanchoëblossfeldiana* "Roodkapje". Si se regeneran brotes adventicios a partir de explantos foliares de este tetraploide, en algunas ocasiones se regeneran octaploides (planta de la derecha). De un total de 130 plantas regeneradas y cultivadas, ocho resultaron ser octaploides (Pierik, Karper y Steegmans, datos sin publicar)

3. Se pueden originar poliploides después de la hibridación somática (capítulo 24). Si, por ejemplo, se fusionan los núcleos de dos protoplastos diploides, se forma un tetraploide.

4. Duplicación de cromosomas en haploides. Kochar *et al.* (1971) y Nitsch *et al.* (1969a) demostraron que se producen diploides de forma espontánea en el tabaco haploide. Kasperbauer y Collins (1972) aislaron explantos del nervio medio de la hoja, de plantas haploides de tabaco, y obtuvieron diploides después de la formación de brotes adventicios. Resulta notable, el que esto sólo ocurrió en el caso de hojas jóvenes. Es claro también que la

duplicación en el número de cromosomas puede producirse por fusión de núcleos, después de la primera división del polen (capítulo 23).

5. Frecuentemente se obtienen triploides por el cruce de diploides con tetraploides. Los triploides (generalmente estériles) pueden ser de gran interés para el mejorador vegetal. Se pueden obtener triploides *in vitro* regenerando vástagos a partir del endospermo (Johri y Bhojwani, 1977). Se han obtenido plantas completamente triploides, de origen endospérmico, con las siguientes especies: *Actinidia chinensis, Citrus grandis, Putranjiva rhoxburghii, Pyrus malus,* y *Santalum album* (Bhojwani, 1984).

6. Roth y Lark (1984) han demostrado recientemente que la adición de isopropil-N(3-clorofenil) carbamato puede producir la eliminación de cromosomas; esta sustancia disuelta en DMSO y añadida a células de *Glycine max* produjo células parcialmente haploides.

Inducción de mutación *in vitro*

Si se irradian (exposición a radiaciones ionizantes), semillas, porciones de plantas con yemas, o plantas enteras, con el fin de obtener mutantes, se obtienen con frecuencia quimeras. La producción de éstas se debe a que el meristemo irradiado (que contiene células mutadas y no mutadas) mantiene su integridad (Fig. 25.4) y las plantas no se originan nunca a partir de una única célula mutada. Con algunas excepciones, las quimeras no son deseables para el mejorador. La inducción de las mutaciones se puede realizar por medio de sustancias químicas (etilmetanosulfonato, colchicina), o agentes mutagénicos físicos (irradiación: rayos-X, radiación gamma, etc.). El método más usual es la irradiación (Broertjes, 1981).

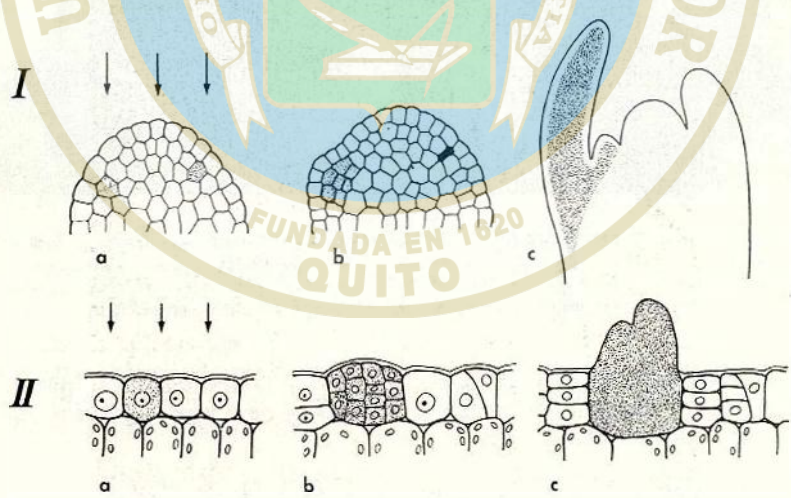


Fig. 25.4 Ilustración esquemática del origen de un vástago mutado después de un tratamiento de irradiación. En I, el ápice caulinar es irradiado. En II se pueden ver las células de la epidermis sombreadas. En I se puede apreciar una quimera (la hoja izquierda y su yema axilar durmiente han sido mutadas). En II se muestra la regeneración de un brote adventicio (completamente mutado) a partir de una única célula mutada de la epidermis. Tomado de Haccius y Haccius y Hausner (1975)

Si se desea conseguir mutantes completos después de la inducción de la mutación, es de extrema importancia el obtener el desarrollo de brotes adventicios, ya que éstos generalmente se originan a partir de una única célula. En la Figura 25.4 se muestra lo que le ocurre a un meristemo cuando es irradiado (se origina una planta quimérica), y a un tejido cuando es irradiado, en este último caso se muestra cómo una única célula mutada origina un brote adventicio (originando un mutante). Sin embargo, Norris *et al.* (1983) demostraron que la *Saintpaulia* permanece como una quimera cuando se clona, indicando que procede de más de una célula (capa); no obstante, algunos autores como Broertjes y Van Harten (1985) están en desacuerdo con la teoría de Norris *et al.* (1983).

Debido a que la formación de brotes adventicios *in vivo* resulta imposible, o muy difícil, en muchas plantas, los mejoradores vegetales, que buscan mutantes, han recurrido últimamente, de forma creciente, a la irradiación y a la regeneración de vástagos *in vitro*. Los tejidos (hoja, peciolo, pedúnculo, etc.) son primero irradiados en cultivo *in vitro*, después se aislan los explantos *in vitro* y se induce la formación de brotes adventicios (Fig. 25.5). Una vez que se logra el enraizamiento de los vástagos formados (Fig. 25.6), las plantas se transfieren al suelo, y se someten a observación para detectar mutaciones durante su desarrollo.

Figura 25.5 Regeneración de brotes adventicios sobre un explanto de pedúnculo de crisantemo. Fotografía tomada ocho semanas después del aislamiento. Roest y Bokelmann (1976).

Figura 25.6 Regeneración de raíces adventicias, en la base de un esqueje de vástago de crisantemo. Fotografía tomada cuatro semanas después del aislamiento. Roest y Bokelmann (1976).

Un buen ejemplo del proceso más arriba indicado se da en crisantemo; Roest y Bokelman (1976), utilizando tratamientos de irradiación y técnicas de cultivo *in vitro* produjeron mutaciones para el color de las flores. Roest (1980) y Broertjes y Van Harten (1978) indicaron que la inducción de mutaciones *in vitro* puede ser una herramienta útil para el mejorador vegetal, ya que por irradiación y posterior formación de brotes adventicios, se puede obtener con frecuencia pequeñas (micro) mutaciones (tamaño de la flor, color, etc.), mientras que se mantienen otras características deseables.

No se pueden tratar en este capítulo todos los factores que influyen en la inducción de mutaciones, especialmente en el caso de las especies de propagación vegetativa; esta información se puede encontrar en el manual de Broertjes y Van Harten (1978, 1987). En él se puede encontrar información sobre dosimetría, sensibilidad a la radiación, partes de la planta que se usan, resultados que se pueden esperar en las distintas especies, etc.

Cuando se produce la inducción de las mutaciones, solamente se pueden ver de forma directa los mutantes dominantes. Los mutantes recesivos, en la

mayoría de los casos, se pueden conseguir sólo después de autofertilización de plantas propagadas por semillas. Sin embargo, en los cultivos que se propagan de forma vegetativa, la irradiación de plantas heterocigotas produce directamente mutantes recesivos. El mutante Aa (obtenido por irradiación de AA) produce una descendencia AA, 2Aa, aa, después de una autofecundación, en ella se puede distinguir aa como mutante, pero no se puede distinguir Aa. Si lo que se irradian son células haploides, los mutantes se distinguen generalmente de forma inmediata.

Se sabe poco sobre el efecto de la irradiación sobre el potencial de regeneración *in vitro*. Bouriquet y Couvez (1967) demostraron que dosis bajas de irradiación promueven la regeneración (estimulación por dosis bajas), sin embargo, dosis más elevadas disminuyeron fuertemente la regeneración. Pierik y Steegmans (1976b) demostraron con callo irradiado de *Anthurium andreanum in vitro*, que el potencial de regeneración disminuía fuertemente al aumentar la

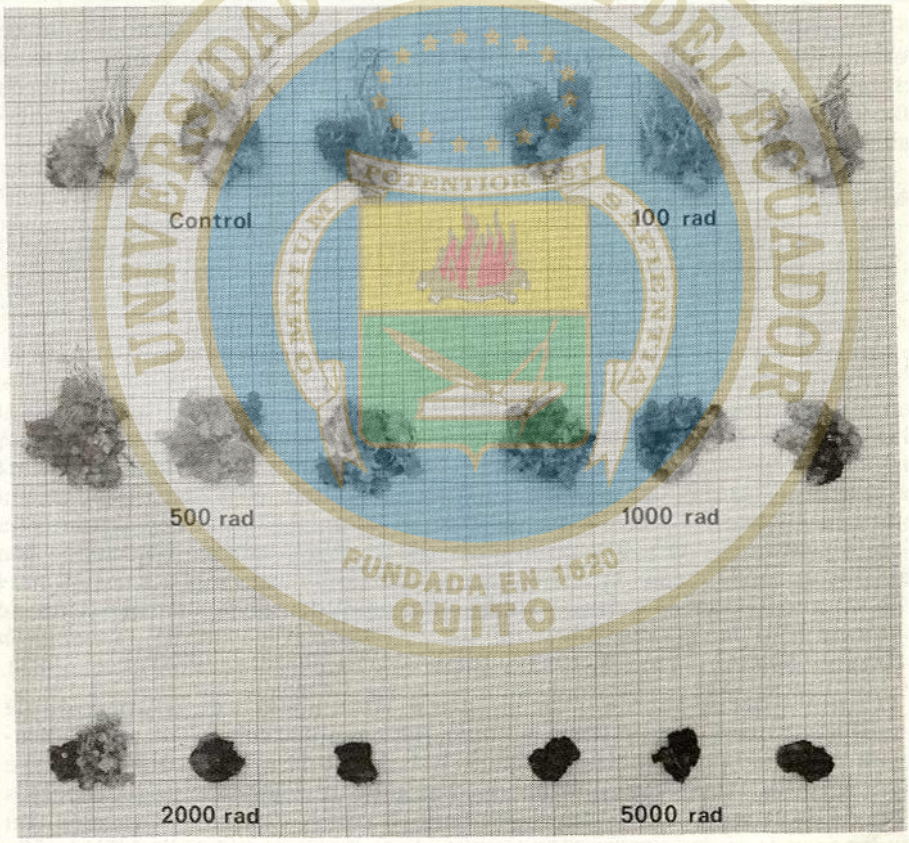


Figura 25.7 Disminución de la capacidad del callo de *Anthurium andreanum*, para regenerar brotes adventicios cuando se incrementa la dosis de radiación. Con la dosis de 100 rad la regeneración se incrementa ligeramente, pero disminuye para dosis superiores. Dosis entre 2.000 y 5.000 rad producen la muerte de la mayor parte de los callos (Pierik, 1976b). Fotografía tomada 10 semanas después del aislamiento

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FUNDADA EN 1620
QUITO

dosis de radiación (Fig. 25.7). Se encontraron resultados semejantes para la irradiación de peciolos *in vitro*. Resulta a veces que los callos son más resistentes a la irradiación que las plantas intactas o los esquejes. Esto fue demostrado en tabaco por Venketeswaran y Partanen (1966).

Cuando se identifican las mutaciones *in vitro*, después de la inducción de la mutación y formación de brotes adventicios, se comprueba que se obtienen grupos de plantas que han mutado en el mismo sentido. Este es el caso de *Kalanchoë blossfeldiana* (Pierik, Steegmans y Karper, datos sin publicar). Este fenómeno no se puede considerar que ocurra de forma casual, sino debido a los tratamientos hormonales que se aplican. Por ejemplo, en el caso del *Kalanchoë:* Si muta una célula A, y por influencia de un elevado nivel de citokinina se desarrolla un vástago completamente mutado (B), si se mantiene una elevada concentración de citokinina, se inhibe la dominancia apical y se desarrollan yemas axilares, que son genéticamente idénticas al vástago B. Utilizando este sistema *in vitro* se pueden clonar los mutantes con facilidad.

Es importante tener en cuenta que las mutaciones pueden producirse de forma espontánea, sin la necesidad del uso de mutágenos. Este punto se trata en relación con la variación somaclonal en el capítulo 21. Algunos mutantes de uno de los cultivos más importantes, como la patata, se consiguieron sin mutagénesis (Shepard *et al.*, 1980; Roest, 1980; Van Harten *et al.*, 1981).

Aplicación

A continuación se dan algunos ejemplos, donde la formación de brotes adventicios *in vitro* se utiliza en la mejora por mutación. Shigematsu y Matsubara (1972) y Matsubara (1974) obtuvieron mutantes completos de *Begonia rex*, después de irradiación y formación de brotes adventicios *in vitro*. Esto también ocurrió en el caso de crisantemo y *Pelargonium* (Shigematsu, 1974). Ya hemos indicado en este capítulo cómo Roest y Bokelman (1976) desarrollaron experimentos con éxito con *Chrysanthemum*, y posteriormente Roest (1980) describió la inducción de mutación *in vitro* en los casos de *Begonia X hiemalis*, crisantemo, clavel y patata. Este autor demostró que la dosis óptima de radiación (rayos-X) era variable de una especie a otra. Para los casos de crisantemo, clavel, begonia y patata era: 8, 30-60, 15-20, y 15-27,5 Gy respectivamente. Van Harten *et al.* (1980) irradiaron explantos de hoja de patata, obteniendo una alta frecuencia de mutación, un amplio espectro de mutaciones y una tasa muy baja de producción de quimeras. Algunos ejemplos recientes de inducción de mutación son: *Saintpaulia, Streptocarpus* y *Kohleria* (Geier, 1983), *Saintpaulia* y *Pelargonium* (Grunewaldt, 1983) y *Euphorbia pulcherrima* (Preil *et al.*, 1983).

Es obvio que se utilizan otros sistemas *in vitro*, además de la formación de brotes adventicios sobre explantos, como, por ejemplo, cultivos de callos, células en suspensión y protoplastos. En los trabajos de Howland y Hart (1977), e Ingram y Macdonald (1986), se pueden encontrar revisiones sobre los aspectos teóricos de la inducción de las mutaciones en cultivos de células y callos. La producción de mutantes en estos sistemas tiene importancia en la hibridación somática (capítulo 24), la biosíntesis de compuestos por células y suspensiones celulares (apartado Biosíntesis de sustancias *in vitro*) y la producción de mutantes de importancia agrícola. La producción de líneas resistentes tiene especial importancia: resistencia contra enfermedades (especialmente toxinas), sal, frío

y calor, inhibidores de crecimiento, antibióticos, metales pesados y herbicidas. La resistencia a nivel celular con frecuencia es completamente distinta de la resistencia a nivel planta, o incluso puede no llegar a expresarse en absoluto a este nivel. Los mutantes con una floración precoz son de una gran importancia, como también lo son los que tienen una eficiencia fotosintética alterada, o modificaciones en el rendimiento, calidad de las flores, etc., características todas ellas extremadamente difíciles de seleccionar a nivel celular.

En agricultura y horticultura, las investigaciones más importantes sobre inducción de mutaciones se han desarrollado sobre cultivos de células y crecimiento de callo en *Citrus* y en caña de azúcar (Broertjes y Van Harten, 1978; 1987). En el caso de la caña de azúcar, por ejemplo, se obtuvieron líneas celulares y plantas que producían mayor cantidad de azúcar (Heinz, 1973). Vardi *et al.* (1975) fueron los primeros en obtener mutaciones a partir de protoplastos irradiados de *Citrus*. En 1975 obtuvieron plantas completas a partir de protoplastos de *Citrus*. En el trabajo Anónimo (1986: 93-192 y 391-449) se presta una especial atención a la mutagénesis *in vitro*, como una herramienta en la mejora por medio de las mutaciones. Se realizó una gran cantidad de investigación sobre inducción de mutaciones en el tabaco, en el que el crecimiento de los protoplastos y la regeneración de las plantas a partir de callos es relativamente fácil. El tabaco es particularmenteinteresante para los especialistas en mutaciones, porque en él se pueden obtener líneas celulares haploides. Nitsch *et al.* (1969b) irradiaron plantas haploides de tabaco, e identificaron mutantes directamente. Schaefer (1974) obtuvo los mismos resultados con tabaco haploide, utilizando etilmetanosulfonato como mutágeno. Schieder (1976) también obtuvo mutantes directamente, a partir de protoplastos haploides irradiados de *Datura innoxia*.

Carlson fue el primero que demostró, en 1973, que las células vegetales y los protoplastos pueden ser seleccionados en cultivo, por su resistencia a la toxina de un patógeno, y que a partir de estas células se pueden regenerar plantas que ofrecen una respuesta diferente a la infección por el patógeno. Daub (1986) en su artículo de revisión evaluó los abundantes estudios que han utilizado selección de cultivos celulares para producir germoplasma resistente a enfermedades. Algunos ejemplos notables de resistencia a enfermedades obtenidos con ayuda de inducción de mutaciones en cultivos de células se encuentran en los trabajos que indicamos a continuación (Straub, 1976; Vasil, 1978; Wenzel, 1983; Yoshida y Ogawa, 1983; Daub, 1986):

Especie vegetal	*Resistencia contra*
Brassica napus	*Phoma lingam*
Solanum tuberosum	*Fusarium oxysporum*
	Phytophtora infestans
Zea mays	*Cochliobolus heterostrophus*
	Helminthosporium maydis cepa T
Nicotiana tabacum	*Pseudomonas syringae pv. tabaci*
Saccharum officinale	*Helminthosporium sacchari*
	Drechslera sacchari

Almacenaje del material vegetal *in vitro*

En los últimos años se ha prestado una gran atención a los bancos de genes. Se ha caído en la cuenta de que la desaparición de muchas especies vegetales (por la recolección excesiva de especies protegidas, por la utilización para usos diferentes de sus espacios naturales, o simplemente por la desaparición y muerte de especies antiguas) puede tener consecuencias catastróficas, especialmente para los mejoradores vegetales. Las plantas que se reproducen de forma generativa se conservan durante largos períodos en forma de semillas, guardadas simplemente en recipientes o paquetes herméticos. Estos, una vez que se reduce el contenido de agua en las semillas hasta un 5-8%, se almacenan a baja temperatura (-18°C o menos) y baja humedad ambiental. Solamente se consi-

Figura 25.8 Conservación de crisantemo *in vitro* a baja temperatura. Fotografía tomada por Engelhardt en el Bundesforschungsanstalt für gartenbauliche Pflanzenzüchtung, en Ahrensburg, Alemania Occidental

deran otros métodos *in vitro*, para las plantas con multiplicación generativa, cuando existen problemas de germinación de las semillas, o cuando las semillas son viables sólo durante cortos períodos de tiempo.

Es obvio que se necesitan diferentes soluciones para las plantas con reproducción vegetativa. Una solución de este tipo es un jardín botánico, pero esto no es siempre económicamente viable. Si las plantas se mantienen sin proteger en el campo, se pueden perder, a causa de las enfermedades, plagas y otros desastres naturales. Dado que mantener las plantas en condiciones de control estricto, además de muy caro, es a veces imposible de hacer, se han buscado otras soluciones para la conservación de especies propagadas de forma vegetativa. En los últimos diez años se ha utilizado mucho el cultivo *in vitro* para este propósito (Fig. 25.8).

El sistema *in vitro* es extraordinariamente apropiado para el almacenaje del material vegetal, ya que en principio éste se puede almacenar en pequeña escala, libre de enfermedades, y en condiciones que limitan el crecimiento. Se ha escrito mucho sobre bancos de genes y especialmente sobre almacenaje a bajas temperaturas. Se han utilizado los siguientes artículos al preparar este apartado: Withers y Street (1977), Bajaj (1979b, 1980b), Kartha (1981, 1985), Bajaj y Reinert (1977), Sakai (1984), Withers (1980, 1982, 1983, 1986, 1986a) y Henshaw (1982).

Withers (1982) ha publicado recientemente una revisión sobre los institutos, a nivel mundial, relacionados con el almacenado *in vitro* de las plantas superiores, también ha revisado los trabajos que en este área se están llevando a cabo en diferentes plantas que se han estudiado, y de los problemas encontrados en el almacenado *in vitro* (pérdida de potencial regenerativo, inestabilidad genética). El almacenaje de células y órganos *in vitro*, a bajas temperaturas, ha sido también descrito por Kartha (1985).

Los requerimientos para el almacenaje *in vitro* son básicamente muy similares a los que se precisan para la propagación vegetativa (Bajaj, 1980b; Withers, 1983; Henshaw, 1982):

1. Se debe mantener la estabilidad genética; esto es lo que ocurre generalmente en el cultivo *in vitro* de meristemos, ápices caulinares y embriones (Sakai, 1984).

2. Se debe garantizar la ausencia de enfermedades.

3. No se debe perder el potencial regenerativo; esto implica que el material más seguro para usar son los meristemos, ápices caulinares y embriones.

4. Debe existir una baja probabilidad de daño o muerte del material. Bajaj (1980b) indicó que estructuras organizadas, como meristemos, ápices caulinares y embriones tienen menores probabilidades de ser dañadas durante, por ejemplo, la congelación. Sin embargo, Henshaw (1982) mostró su desacuerdo con esta idea, indicando que tejidos homogéneos, como los callos, son mucho más apropiados para la congelación que las estructuras organizadas.

En conclusión, en el momento actual, los meristemos etc. son preferidos para almacenado de material vegetal *in vitro*.

La conservación de las plantas *in vitro* tiene algunas ventajas sobre la correspondiente *in vivo*, y las indicamos a continuación (Henshaw, 1974; Henshaw y O'Hara, 1984; Withers, 1980, 1983; Nitzsche, 1983; Bajaj, 1979a, 1980b):

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
SIB-UCE

1. El cultivo *in vitro* permite conservar especies vegetales en peligro de extinción.

2. El almacenamiento *in vitro* de plantas propagadas vegetativamente, puede producir ahorro de espacio y de tiempo. Dale (1976) calculó que 800 cultivares de vid pueden ser almacenados *in vitro* en unos pocos metros cuadrados, mientras que en el campo ocuparían una hectárea.

En muchas ocasiones es más fácil y barato almacenar meristemos y vástagos *in vitro*. El almacenado *in vitro* de material vegetal será más interesante, si se incrementa el precio de los combustibles. La conservación a pequeña escala de líneas parentales para la producción de semillas híbridas, es también de extremada importancia para los mejoradores.

3. Algunas plantas estériles, que no pueden ser reproducidas de forma generativa se pueden conservar *in vitro*. También resulta interesante el almacenado *in vitro* de material, cuyas semillas son difíciles de hacer germinar, o pierden su potencial germinativo durante un almacenado normal.

4. *In vitro*, es posible retardar el crecimiento de una forma eficaz, con lo que se disminuye el número de subcultivos necesarios.

5. Si se obtiene un cultivo estéril, generalmente con gran dificultad, el subcultivo *in vitro* es la única manera segura de garantizarnos que permanece estéril. Manteniendo a la planta *in vitro* no es necesario intentar producir plantas por cultivo de meristemos y así asegurarse que están libres de enfermedades. También se encuentran otros problemas cuando se inicia un cultivo *in vitro* (dificultad para el establecimiento, necrosis, coloración parda, inducción de rejuvenecimiento), que se encontrarán nuevamente cada vez que se tenga que realizar un aislamiento.

6. Ya que es posible un cultivo estéril continuado, también es posible el transporte libre de enfermedades (ver apartado Desarrollo de quimeras in vitro).

A continuación se indican los procedimientos disponibles para inhibir o frenar el desarrollo *in vitro* (Bajaj, 1979a, 1983a; Withers, 1980, 1983; Nitzsche, 1983):

1. Cambiando la composición del medio nutritivo, limitando de esta forma el crecimiento.

2. Deshidratación, a base de disminuir el potencial osmótico.

3. Disminuyendo la presión atmosférica, a este procedimiento se le denomina también almacenaje hipobárico. Se disminuye la presión de todos los gases del aire. Sin embargo, se puede conseguir el mismo efecto, reduciendo sólo la presión del oxígeno; en este caso la presión total se mantiene a 760 mm de mercurio, pero se sustituye el oxígeno por otro gas como, por ejemplo, el nitrógeno. La inhibición del crecimiento, por cualquiera de estos procedimientos, es aplicable a estructuras vegetales tanto organizadas como no organizadas (Bridgen y Staby, 1983).

4. A veces se utilizan inhibidores como el CCC y el ABA. Mix (1984) utilizó explantos nodales de 220 cultivares de patata, como material inicial para

el almacenaje *in vitro* a largo plazo; las plántulas fueron mantenidas a 10°C en presencia de ácido N-dimetil-aminosuccinámico.

5. Almacenado a baja temperatura o por congelación. Para un almacenado a corto plazo, se utiliza la temperatura de 2-5 °C, para especies de zonas frías o templadas, y 8-15 °C para especies (sub)tropicales. Si se requiere un período de almacenaje superior, generalmente se congela el material en nitrógeno líquido (-196°C). El crecimiento es fuertemente inhibido a temperaturas bajas, y completamente detenido por congelación.

La congelación es un procedimiento que está lejos de ser fácil, ya que los cristales de hielo pueden dañar fácilmente el material. Si la congelación tiene lugar de forma muy rápida, los cristales de hielo se forman intracelularmente, mientras que la formación de hielo es extracelular, si la congelación se realiza lentamente. Antes de congelar las células, se añade al medio nutritivo DMSO, glicerol, y azúcares (para retirar parte del agua), de no hacerlo así las células serían incapaces de sobrevivir a la congelación.

Se han descrito diferentes métodos y pre-tratamientos, para el congelado y descongelado de los diferentes materiales vegetales. Para detalles más específicos, se puede consultar la bibliografía citada. En principio se puede considerar que la congelación es válida para cualquier tipo de material vegetal: plántulas, embriones, ápices caulinares, meristemos, callos, suspensiones celulares, polen, etc.

6. Combinaciones de los procedimientos dados más arriba, en los apartados 1-5.

El almacenado *in vitro* de cultivos de meristemos o ápices caulinares, se ha llevado a cabo con éxito en un gran número de plantas (Hu y Wang, 1983; Henshaw, 1982): clavel, fresa, patata, guisante, frutales, zanahoria, cacahuete, diferentes especies de *Prunus, Ipomoea, Anthurium,* y *Gerbera*. El almacenado a bajas temperaturas tiene algunas ventajas, por lo que es un procedimiento utilizado frecuentemente. Algunas de estas ventajas son:

1. Las bajas temperaturas frenan el crecimiento y desarrollo de una forma natural, y limitan el número de subcultivos necesarios. A la temperatura de 2-5°C sólo se necesita el subcultivo 1-2 veces por año, y es completamente innecesario cuando el material ha sido congelado.

2. Disminuye el número de mutaciones, ya que éstas tienen más probabilidades de producirse con cada subcultivo (capítulo 21).

3. Utilizando técnicas de baja temperatura es más fácil dosificar y planificar comercialmente la producción, haciendo posible, en principio, tener material vegetal, *in vitro*, disponible, en cualquier momento del año.

4. El material haploide puede ser conservado utilizando bajas temperaturas, mientras que se vuelve diploide a temperaturas más altas.

5. El material vegetal, rejuvenecido *in vitro*, se mantiene juvenil durante el almacenado en frío, siendo esto importante para la propagación vegetativa.

A pesar de todas estas ventajas, el almacenamiento *in vitro* todavía no se utiliza en gran escala, ya que no siempre resulta tan fácil como era de esperar, resulta costoso y origina un gran número de problemas técnicos. Cada especie

vegetal, y de hecho cada cultivar tiene sus propias necesidades específicas y sus propios problemas. Si se almacenan callos, suspensiones celulares o material similar, la estabilidad genética frecuentemente disminuye, si bien éste no es el caso cuando se almacenan meristemos, ápices caulinares o embriones.

Biosíntesis de sustancias *in vitro*

El cultivo de micro-organismos (*Penicillium, Streptomyces*, etc.) se ha utilizado durante mucho tiempo de forma industrial, para obtener sustancias como la penicilina, estreptomicina, etc., que tienen importancia como fármacos. Las plantas superiores son también fuente importante de todo tipo de sustancias, especialmente medicinas (glicósidos, aceites etéreos, esteroides, etc.). Tradicionalmente se han cultivado las plantas medicinales, y se han extraído sus componentes activos, y éste es el procedimiento que probablemente se seguirá en el futuro. Sin embargo, la producción de plantas medicinales puede presentar problemas, que han estimulado la investigación de otras vías para la obtención de sustancias naturales (Zenk, 1976; Alfermann y Reinhard, 1978):

1. La producción en el campo depende fuertemente de la época del año, tiempo atmosférico, clima, enfermedades y plagas.

2. Las áreas donde se producen de forma natural estas especies, especialmente en las zonas tropicales y subtropicales, son cada vez más limitadas, y algunas plantas medicinales son muy escasas.

3. Pueden existir problemas técnicos y económicos en la producción.

4. La producción implica elevada cantidad de mano de obra, y por consiguiente los costes son elevados.

5. La inestabilidad política de los países productores puede traducirse en la interrupción del suministro.

Teniendo en cuenta las razones que acabamos de exponer, de forma análoga a como se hace con los micro-organismos, se han realizado varios intentos, para obtener sustancias a partir de cultivos de células en suspensión de plantas superiores, ya sea por acumulación de las sustancias en el interior de las células (biomasa), o bien por su liberación al medio nutritivo. Cuando las plantas producen metabolitos *in vivo* o *in vitro*, que no son directamente utilizados por la planta, reciben el nombre de metabolitos secundarios.

Se ha publicado mucho sobre la producción de metabolitos secundarios *in vitro*. Para la redacción de este capítulo se han consultado los siguientes artículos: Zenk (1976), Reinhard (1974), Alfermann y Reinhard (1978), Schilperoort (1983), De Groot *et al.* (1982), Mantell y Smith (1984), Barz *et al.* (1977), Douglas *et al.* (1979), Butcher (1977), Staba (1977, 1980, 1985), Reinhard y Alfermann (1980), Stohs (1980), Bohm (1980), Morris *et al.* (1985), Neumann *et al.* (1985), Fowler (1986).

Se han utilizado dos aproximaciones para la producción de metabolitos secundarios (Morris *et al.*, 1985):

1. El crecimiento rápido de cultivos en suspensión, en grandes volúmenes, que son posteriormente manipulados, para obtener los metabolitos secundarios.

2. Se hacen crecer las células y a continuación se las inmoviliza, utilizándolas así, para la producción de compuestos durante períodos prolongados de tiempo.

Para la biosíntesis *in vitro* de sustancias, se utilizan plantas, en principio seleccionadas para una elevada producción del metabolito en cuestión. Por consiguiente, se utilizan órganos o tejidos en los que se localiza la producción del metabolito, o en los que se encuentra en la máxima concentración.

Después de la inducción del callo sobre el explanto, se establece un cultivo de células en suspensión; en este cultivo se debe hacer una selección de forma sistemática, de líneas celulares de elevada producción. Se debe tener en cuenta que en los cultivos celulares ocurren mutaciones de forma regular, que pueden conducir a un rendimiento reducido del metabolito. Se ha ensayado la inducción de mutaciones para intentar obtener líneas celulares de elevado rendimiento. La producción de metabolitos secundarios depende fuertemente de la tasa de división celular; por lo tanto, no puede resultar sorprendente el que el rendimiento de metabolitos dependa de un gran número de factores (Mantell y Smith, 1984; Tabata, 1977; Dougall, 1979):

1. El material inicial.
2. El pre-tratamiento antes del cutivo *in vitro*.
3. Factores de crecimiento físicos; luz, temperatura, aireación, etc.
4. Composición del medio.
5. A veces es necesario lo que se llama un "sistema de cultivo en dos etapas". La primera etapa implica el crecimiento de las células sobre un medio de mantenimiento, y la segunda la transferencia de las células a un medio de producción de metabolitos secundarios (Morris *et al.*, 1985).

El desarrollo de la producción biosintética *in vitro* ha sido extraordinariamente rápido, por las siguientes razones:

1. Se ha producido una introducción gradual de crecimiento y producción de células vegetales en fermentadores y bioreactores (Fowler, 1984).

2. El crecimiento de las células vegetales puede ser optimizado por cambios en el medio nutritivo y en los factores físicos del crecimiento (aireación, agitación); también se ha ensayado el incrementar la biosíntesis por la adición de precursores.

3. Se pueden utilizar células vegetales inmovilizadas (empaquetadas en una masa de tipo gelatinoso) para incrementar la producción de las sustancias y para acumular los metabolitos en el medio. Esta acumulación implica que las sustancias excretadas por las células pueden ser obtenidas por simple intercambio con el medio. Aspectos recientes de la investigación se pueden encontrar en: Lindsey y Yeoman (1985, 1986), Rosevear y Lambe (1985), Berlin (1985) y Morris *et al.* (1985).

4. Aumenta el interés por la producción *in vitro* de otros compuestos, como nematicidas e insecticidas biodegradables. Se tiene la confianza de que se puedan producir sustancias *in vitro*, que son imposibles de biosintetizar normalmente, por las plantas en el campo. Teniendo esto en cuenta se espera que,

por medio de la manipulación genética, se podrá conseguir que determinadas células sean capaces de producir sustancias concretas.

5. Se han desarrollado técnicas para la prospección y selección del crecimiento de las células vegetales, que se espera se traduzcan en una mayor producción de metabolitos secundarios (Berlin y Sasse, 1985).

6. La biotransformación cada vez se está volviendo más importante. Se trata de una técnica que utiliza enzimas situadas en el interior de las células vegetales, para actuar sobre la química de grupos funcionales, de compuestos químicos suministrados exógenamente (Morris *et al.*, 1985). Hay dos tipos de biotransformación:

— utilizando células completas, inmovilizadas o no.
— utilizando preparaciones de compuestos inmovilizados.

Un buen ejemplo de biotransformación es la conversión de la digitoxina en digoxina, por medio de las células de *Digitalis lanata*.

7. Ha crecido el interés por el incremento en la acumulación de metabolitos secundarios, por medio de utilización de sustancias facilitadoras (Constabel y Eilert, 1986). Las sustancias facilitadoras son, estrictamente hablando, compuestos de origen biológico, relacionados con la interacción planta-microbio. Para lograr un incremento en la acumulación de productos, en los cultivos celulares se utilizan facilitadores bióticos como las fitoalexinas, que son compuestos mediadores del estrés microbiano, o también facilitadores abióticos, como pueden ser algunos agentes estresantes, como los metales pesados o la presión osmótica.

8. Los cultivos de brotes múltiples se están convirtiendo en una alternativa viable, dentro de los sistemas *in vitro*, para la producción de sustancias de origen vegetal (Heble, 1985).

Indudablemente la biosíntesis de compuestos *in vitro* tiene muchas posibilidades, aunque un gran número de problemas relacionados todavía necesita una extensa investigación, antes de que esta nueva técnica pueda ser utilizada en gran escala. Algunos de los problemas son:

1. Las células vegetales presentan un tiempo de duplicación muy elevado (16-24 h), si se compara con el de los micro-organismos (aproximadamente 1 h). Esto implica que las células vegetales producen relativamente poca cantidad de biomasa, y por consiguiente pequeñas cantidades de metabolitos secundarios.

2. Si la producción de metabolitos secundarios en la planta intacta se produce de forma exclusiva en un órgano en particular, por ejemplo, un tejido diferenciado (con, por ejemplo, laticíferos o glándulas), la producción *in vitro* es muy pequeña; las células *in vitro* generalmente no se encuentran diferenciadas.

3. La producción de metabolitos secundarios *in vitro* es por lo general muy baja, sobre todo si se compara con la planta intacta.

4. Los cultivos de células y en suspensión son genéticamente inestables, y a través de las mutaciones, la producción de compuestos suele caer a un nivel más bajo del que existía al principio del cultivo *in vitro*.

5. Las células vegetales tienen la peculiar característica de formar agregados *in vitro*; para evitarlos se precisa una agitación vigorosa, sin embargo, esta acción puede producir daños en las células. Estos problemas pueden ser evitados por el uso de los llamados fermentadores con ascensión de aire (el paso de burbujas de aire mantiene a las células y agregados en movimiento).

6. La utilización de una elevada concentración de azúcar en el medio nutritivo (hasta del 5% p/v) incrementa de forma considerable los costos.

7. Se precisa mucha más investigación en los temas de bioreactores, y en el desarrollo de buenos métodos de aislamiento.

8. La falta de conocimientos sobre el crecimiento de las células vegetales en los bioreactores y fermentadores dificulta grandemente su desarrollo.

La existencia de gran número de problemas asociados con la producción de metabolitos secundarios queda ilustrada de forma patente por el hecho de que sólo existe en el mercado un producto químico, de este origen, que haya tenido éxito (Staba, 1985). El producto comercial es la shikonina, comercializado por Mitsui Petrochemical Industries (Tokio, Japón); se trata de un producto colorante y anti-microbiano, con un valor aproximado de 4.000 dólares (EE UU) por kilogramo, obtenido a partir de células de *Lythospermum erythorhizon*, en fermentadores de 750 litros.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

26

CLONADO IN VITRO DE PLANTAS EN HOLANDA

Número total de plantas clonadas in vitro, en Holanda en:

1985	35.981.960	
1986	42.753.600	El incremento entre 1985 y 1986 fue de un 19%
1987	53.220.559	El incremento entre 1986 y 1987 fue de un 25%

Lista de plantas multiplicadas en Holanda, en número superior a 100.000:

Cultivos bulbosos y cormos	:	*Lilium, Narcissus*
Orquídeas	:	*Cymbidium, Vuylstekeara*
Flor cortada	:	*Gerbera, Statice, Rosa* *Anthurium andreanum, Alstroemeria*
Plantas de maceta	:	*Nephrolepis, Hortensia* *Saintpaulia, Philodendron* *Anthurium scherzerianum, Caladium* *Cordyline, Caiathea* *Davallia, Synchonium* *Bromeliaceae, Alocasia* *Ficus* *Spathiphyllum*
Plantas de acuario	:	*Cryptocorine* *Echinodorus*
Cultivos agrícolas	:	*Patata*

Plantas de maceta	1983	1984	1985	1986	1987
Nephrolepis	7.921.630	8.306.700	10.101.350	11.194.900	12.500.300
Saintpaulia	5.371.250	4.400.000	4.389.904	3.715.000	3.950 .500
Syngonium	9.300	162.550	242.490	603.500	1.594.200
Anthurium scherz.	269.040	400.000	898.700	1.747.000	1.255.000
Cordyline	493.300	578.150	604.500	783.000	1.044.7 00
Spathiphyllum	13.200	10.300	35.450	512.700	967.600
Ficus	390.000	330.000	161.500	148.000	488.000
Bromeliaceae	278.350	224.080	163.925	250.500	422. 700
Alocasia	—	3.200	—	180.000	195.000
Davallia	258.000	643.000	570.700	340.000	155.000
Caladium	20.000	—	—	16.000	150.000
Calathea	—	—	240	10.000	120.650
Hortensia	124.000	145.000	105.000	51.000	120. 000
Philodendron	6.341	180	29.550	16.500	114.800
Platycerium	—	—	—	36.200	75.000
Pellaea	—	—	—	4.500	50.000
Cryptanthus	—	—	—	38.504	44.066
Dieffenbachia	—	850	750	14.000	29.000
Alternanthera	—	—	—	7.000	21.000
Yucca	11.666	950	2.680	60	9.200
Leea	—	—	—	55.000	8.000
Begonia	19.000	7.500	10.747	5.000	6.000
Bouvardia	—	2.000	2.500	10.000	5.000
Pelagornium	—	—	100	3.330	4.100
Zantedeschia	—	—	—	24.000	3.500
Gardenia	—	20.000	25.000	40.000	2.500
Anigozanthos	—	—	—	5.600	2.000
Aphelandra	—	—	1.000	—	2.000
Dracaena	1.000	1.500	500	—	400
Kohleria	—	—	—	—	200
Cyclamen	—	—	—	—	150
Aralia	16.750	36.515	55.315	4.480	—
Smithiantha	—	130.400	9.800	3.000	—
Nepenthes	—	575	—	1.300	—
Kalanchoë	500	3.500	700	1.200	—
Hypoestes	—	—	—	1.000	—
Pandanus	—	30	185	—	—
Cactus	32.000	15.000	—	—	—
Primula	—	4.000	—	—	—
Monstera	—	2.140	—	—	—
Schefflera	—	10	—	—	—
Streptocarpus	5.000	—	—	—	—
Achimenes	3.000	—	—	—	—
Total	15.243.327	15.428.130	17.412.586	19.822.274	23.412.576

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM POTENTIOR EST
FUNDADA EN 1620
QUITO

Orquídeas	1983	1984	1985	1986	1987
Cymbidium	667.700	507.000	793.500	1.053.790	603.700
Otras orquídeas	679.450	1.027.500	323.240	395.400	1.055.830
Total	1.347.350	1.534.500	1.116.740	1.449.190	1.659.530

Flor cortada	1983	1984	1985	1986	1987
Gerbera	3.510.579	9.698.854	11.128.202	12.068.614	15.091.544
Anthurium andreanum	78.568	273.106	165.997	326.460	357.955
Rosa	—	—	—	50.000	350.100
Alstroemeria	27.000	33.000	55.500	79.220	195.050
Statice	—	1.500	2.000	40.314	128.000
Chrysanthemum	11.350	27.450	67.125	73.650	76.508
Dianthus	7.000	2.500	2.000	1.500	2.800
Gypsophila	—	—	—	—	750
Matricaria	—	580	—	—	—
Total	3.634.497	10.036.990	11.420.824	12.639.758	16.202.707

Hortalizas	1983	1984	1985	1986	1987
Coliflor	24.635	30.212	36.705	47.666	52.283
Lechuga	—	100	485	200	5.300
Cebolla	100	—	—	—	3.500
Bróculi	—	600	1.000	5.104	3.150
Puerro	620	2.100	3.900	2.000	2.500
Ajo	—	—	—	—	2.500
Col de Bruselas	900	50	—	1.000	2.300
Espárrago	—	150	—	—	1.000
Tomate	—	100	300	500	500
Colirrábano	103	60	150	100	100
Col repollo	—	12.500	15.500	6.200	—
Lombarda	—	12.500	12.500	6.000	—
Hinojo	—	—	—	55	—
Pepino	—	—	310	—	—
Achicoria	—	1.243	—	—	—
Remolacha	200	200	—	—	—
Pimiento	—	100	—	—	—
Berenjena	—	100	—	—	—
Zanahoria	—	25	—	—	—
Escarola	495	—	—	—	—
Total	27.053	60.040	70.850	68.825	73.233

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM POTENTIOR EST SCIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

Cultivos agrícolas	1983	1984	1985	1986	1987
Patata	256.900	260.000	280.000	286.825	275.000
Remolacha azucarera	22.500	20.000	20.000	25.000	34.000
Colza	—	—	—	—	50
Vicia faba	—	—	—	—	50
Sinapis alba	—	—	—	—	50
Fagopyrum esculentum	—	—	—	—	50
Total	279.400	280.000	300.000	311.828	309.200

Miscelánea	1983	1984	1985	1986	1987
Cryptocoryne	—	30.000	150.000	154.000	203.000
Echinodorus	—	2.000	62.000	148.000	154.000
Gentiana	972	7.933	13.618	26.500	71.030
Anubia	—	—	—	11.000	21.200
Musa	—	—	—	—	20.300
Hosta	—	9.120	5.365	9.700	11.300
Syringa	—	—	2.750	8.000	10.200
Halesia	—	—	—	—	10.000
Rhododendron	—	3.000	8.000	5.400	8.600
Actinidia chinensis	—	—	—	—	8.000
Bergenia	—	—	14	1.425	7.800
Calla	—	—	—	—	6.650
Kalmia	—	80.000	2.000	1.600	6.500
Lobelia	—	—	—	—	6.000
Fresa	—	—	568	3.000	5.096
Potentilla	—	—	—	—	4.500
Populus	—	90.000	50.000	300	4.430
Stokesia	—	—	—	1.000	3.200
Betula	—	—	850	740	1.500
Aster	—	—	—	—	850
Delphinium	—	—	—	—	500
Campanula	850	130	—	5.140	160
Aconitum	—	—	—	—	90
Thalictrum	7.130	20.200	4.300	—	—
Photinia	—	—	1.200	—	—
Nandina	—	—	800	—	—
Aristolochia	—	—	400	—	—
Total	8.952	242.383	301.865	375.805	564.906

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM POTENTIOR EST SAPIENTIA
FUNDADA EN 1622
QUITO

Bulbos y cormos	1983	1984	1985	1986	1987
Lilium	579.914	1.418.472	5.303.549	8.020.133	10.722.403
Narcissus	—	500	21.000	10.000	184.000
Nerine	3.105	5.910	3.363	40.500	65.022
Hyacinthus	3.007	9.584	20.828	13.234	13.902
Freesia	2.366	11.213	8.000	210	6.500
Hippeastrum	—	1.000	2.000	1.150	5.000
Iris	—	—	—	—	1.100
Fritillaria	—	—	—	—	250
Gladiolus	2.000	200	—	155	230
Ornithogalum	—	280	—	506	—
Watsonia	—	—	—	32	—
Crindonna	—	10.000	—	—	—
Scilla	—	750	—	—	—
Vallota	—	110	—	—	—
Total	590.392	1.458.019	5.358.740	8.085.920	10.998.407

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

ANEJO

Laboratorios españoles en los que se hace cultivo de tejidos

1. Laboratorios de investigación

Centro d'Investigacio de Cabrils.
IRTA.
Carretera de Cabrils, s/n.
Cabrils (Barcelona).

Centro de Edafología y Biología Aplicada.
CSIC.
Apartado, 152.
41080 Sevilla.

Centro de Investigaciones Biológicas.
Velázquez, 144.
28006 Madrid.

Departamento de Biotecnología.
Escuela Técnica Superior
de Ingenieros Agrónomos.
Camino de Vera, 14.
46022 Valencia.

Departamento de Fisiología Vegetal.
Facultad de Biología.
Oviedo.

Departamento de Fisiología Vegetal.
Facultad de Biología.
La Laguna.
Tenerife.

Departamento de Fisiología Vegetal.
Facultad de Farmacia.
Blasco Ibañez, 13.
46010 Valencia.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM POTENTIOR EST SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

Departamento de Genética.
Facultad de Biología.
Universidad Complutense.
Ciudad Universitaria.
28040 Madrid.

Departamento de Xilología y Anatomía.
Escuela T. S. de Montes.
Ciudad Universitaria.
28040 Madrid.

Fisiología Vegetal, CSIC.
Apartado 122.
15080 Santiago de Compostela.

Granja Modelo de Arcaute.
Apartado 46.
01080 Vitoria.

Instituto Valenciano Investigaciones Agrarias.
Apartado Oficial.
Moncada.
Valencia.

Servicio de Investigación Agraria.
Apartado 127.
Alcalá de Henares.
Madrid.

Servicio de Investigación Agraria.
Cortijo de la Cruz.
24140 Churriana (Málaga).

Servicio de Investigación Agraria.
Apartado 727.
50083 Zaragoza.

2. Laboratorios comerciales:

(En cada caso se indica entre paréntesis las especies con las que se trabaja).

Agrar S.A.
(Frutales)
Monasterio de Cogullada.
50056 Zaragoza.

Agrícola Valleniza, S.A.
Apdo. Correos 100.
29740 Torre Del Mar (Málaga).

Agromillora Catalana.
(*Malus, Prunus*)
Moli Coloma.
El Rebato.
08770 San Sadurni D'Anoia.
Barcelona.

Agrupal.
(Patata)
Olaguibel, 4.
01004 Vitoria.

Aldrufeu.
(Pelargonium, Spathiphyllum, Syngonium)
Apdo. Correos 1.
08340 Vilassar de Mar.
Barcelona.

Appacale.
(Patata)
Asociación Productores Patata
Siembra de Castilla León.
Albillos (Burgos)

Cooperativa Santa Isabel.
(Patata)
Calera, 35-50. 09002 Burgos.

Espacios Fuengirola S.A.
Apdo. Correos 272.
Camino Viejo de Coin, s/n.
29640 Fuengirola (Málaga).

Evaristo Almudever,
Francisco Martorell, 16.
46290 Valencia.

Hortisant.
(*Ficus, Saintpaulia ionantha, Syngonium*)
Villa Terenci s/n.
Apdo. Correos 45.
08392 San Andrés de Llavaneres.
Barcelona.

Jardín de San Valero.
Carretera Real de Madrid.
46469 Beniparrell.
Valencia.

Josef M. Gel.
(*Ficus robusta, Hydrangea, Rosa*)
Casa de Camp, 112.
08340 Vilassar de Mar.
Barcelona.

In Vitro S.A.
(Malus, Prunus)
C. Falguera, 44.
08980 San Feliu de Llobregat
Barcelona

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST SAPIENTIA
OMNIUM
FUNDADA EN 1620
QUITO

Microplant.
(Frutales)
Camino Viejo de Albal s/n.
46469 Beniparrell.
Valencia

Microverd.
(*Dianthus*)
Vidal, 17 (Can Nolis).
08391 Tiana.
Barcelona.

Opposa.
(Patata)
Crtra. Salinas s/n.
31110 Noaín (Navarra).

Planasa.
(Fresa, frutales)
Aquiles Cuadra, 1.
31500 Tudela (Navarra)

Sierra de Gredos.
(Fresa)
Clara del Rey, 43.
28002 Madrid.

Tecniflor.
45930 Méntrida.
Toledo.

Vitroplant.
(*Pelagornium, Rosa, Spathiphyllum, Syngonium*)
Carretera de Vilassar de Dalt, 115.
08330 Premiá de Mar.
Barcelona.

Viveros Paco Molina.
(Ornamentales)
Cardenal Costa, s/n.
12004 Castellón.

Vivers La Vinya Sat.
(*Nephrolepis, Syngonium*)
Carretera d'Argentona, Km 0.5.
Apartado 35.
08340 Vilassar de Mar.
Barcelona.

Fuente de información: Directory of European Plant Tissue Culture Laboratories, 1988. Commission of the European Communities. Directorate-General for Science, Research and Development. 200 rue de la Loi, B-1049, Bruselas.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

28
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

En la lista de referencias se encuentran algunos periódicos poco usuales, escritos en holandés, por lo que creemos interesante dar las siguientes explicaciones:

Bloembollencultuur: Semanario holandés dirigido a los productores de bulbos, no contiene resúmenes en inglés.

Gewasbescherming (Gewasbesch.): Periódico en holandés para fitopatólogos, no contiene resúmenes en inglés.

Groenten en Fruit: Periódico semanal en holandés, para especialistas en hortalizas, sin resúmenes en inglés.

Jaarverslag Instituut voor Tuinobouwgewassen (Jaarverslag IVT): Memoria anual del Instituto para Mejora de las Plantas Hortícolas, Wageningen, Holanda, sin resúmenes en inglés.

Landbouwkundig Tijdschrift (Landbouwk. Tijdschr.): Periódico agrícola holandés, sin resúmenes en inglés.

Mededelingen Directie Tuinbouw (Meded. Dir. Tuinbouw): Periódico holandés para horticultores, sin resúmenes en inglés.

Natuur en Techniek: Periódico mensual holandés, sobre la naturaleza y la técnica, sin resúmenes en inglés.

Orchideën: Periódico holandés para especialistas en orquídeas, sin resúmenes en inglés.

Vakblad voor Biologen: Periódico holandés para biólogos, sin resúmenes en inglés.

Vakblad voor de Bloemisterij (Vakbl. Bloem.): Semanario holandés para floricultores, sin resúmenes en inglés.

Verslagen Landbouwkundige Onderzoekingen (Agricultural Research Reports): Serie holandesa de publicaciones agrarias (la mayor parte de ellas en inglés), publicadas por Pudoc, Wageningen, Holanda.

Zaadbelangen: Periódico holandés dirigido a los productores de semillas, que no contiene resúmenes en inglés.

BIBLIOGRAFIA

AARTRIJK, VAN: *Adventitious bud formation from bulb-scale explants of Lilium speciosum Thunb. in vitro.* Dissertation, Agricultural University, Wageningen, the Netherlands: 1-79, 1984.
AARTRIJK, VAN *et al.:* In: *Withers and Alderson,* 55-61, 1986.
ABO-EL-NIL y HILDEBRANDT: *Plant Dis. Reptr.* 55, 1017-1020, 1971.
ADAMS: *J. Hort. Sci.* 47, 263-264, 1972.
AERTS: *Meded. Fac. Landbouwwet. Gent* 44, 981-991, 1979.
AGHION-PRAT: *Physiol. Vég.* 3, 229-303, 1965.
AHUJA: *Silvae Genet.* 31, 66-77, 1982.
ALBERSHEIM y DARVILL: *Scient. Am.* 253(3): 44-50, 1985.
ALBERSHEIM *et al.: Hort Sci.* 21, 842, 1986.
ALFERMANN y REINHARD: *Production of natural compounds by cell culture methods. Gesellsch.* Strahlen und Umweltforschung, Munich, 1-361, 1978.
ALFERMANN *et al.: Planta Medica* 40, 218, 1980.
ALLEN: *Acta Hort.* 36, 235-239, 1974.
ALLENBERG: *Die Orchidee* 27, 28-31, 1976.
AMMIRATO: In: Evans *et al.* 82-123, 1983.
AMMIRATO: In: *Withers y Alderson,* 23-45, 1986.
AMMIRATO. *Hort Sci.* 21, 843, 1986a.
AMMIRATO *et al.*: *Handbook of plant cell culture. 3. Crop species.* MacMillan Publ. Comp., Nueva York, 1-620, 1984.
ANDO *et al.: Scientia Hort.* 29, 191-197, 1986.
ANDREASSEN y ELLISON: *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 90, 158-162, 1967.
ANONYMOUS: *Plant tissue culture.* Pitman, Boston, 1-531, 1978.
—: *In vitro multiplication of woody species.* Round Table Conf., Gembloux, Bélgica, Centre Rech. Agron. Etat: 1-295, 1978a.
—: *Seed Nursery Trader* 78, 7, 1980.
—: *C.R. Séanc. Acad. Agric. France* 66, 619-719, 1980a.
—: *Michigan Biotech. Inst.* 1984, 1-194, 1984.
—: *Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement.* Intern. Atomic Energy Agency, Viena, 1-529, 1986.
APPELGREN y HEIDE: *Physiol. Plant.* 27, 417-423, 1972.
ARDITTI: *Bot. Rev.* 33, 1-97, 1967.
—: *Orchid Biology. Reviews and perspectives I.* Cornell Univ. Press, Ithaca, 1-310, 1977.
—: *Orchid Review* 85, 102-103, 1977a.
—: *Orchid Biology. Reviews and perspectives II.* Cornell Univ. Press, Ithaca, 1-390, 1982.
ARDITTI y ERNST: In: *Stewart and Merwe, van der.* 263-277, 1982.
ARDITTI y HARRISON: In: *Arditti.* 157-175, 1977.
ARDITTI *et al.:* In: *Arditti.* 243-370, 1982.

ASJES *et al.*: *Acta Hort.* **36**, 223-228, 1974.
ASSCHE, VAN: *Technische en economische aspecten van de weefselteelt bij planten.* Eindwerk, Kath. Univ. Leuven, Bélgica, 1-134, 1983.
AUGE *et al.*: *La culture in vitro et ses applications horticoles.* Lavoisier, Paris, 1-152, 1982.
BAGGA *et al.*: *Int. Congr. Plant Tissue Culture Abstr.* **6**, 276, 1986.
BAJAJ: *Euphytica* **23**, 633-649, 1974.
—: *Euphytica* **28**, 267-285, 1979a.
—: In: *Sharp et al.*, 745-774, 1979b.
—: In: *Rao et al.*, 1980. 50-67, 1980.
—: In: *Evans et al.*, 228-287, 1983.
—: In: *Sen and Giles*, 1983. 19-41, 1983a.
—: *Biotechnology in agriculture and forestry 1. Trees I.* Springer Verlag, Berlin, 1-515, 1986.
—: *Biotechnology in agriculture and forestry 2. Crops I.* Springer Verlag, Berlin, 1-608, 1986a.
BAJAJ y BOPP: *Ang. Bot.* **45**: 115-151, 1971.
BAJAJ y GOSAL: In: *Rao.* 25-41, 1981.
BAJAJ y PIERIK: *Neth. J. Agric. Sci.* **22**, 153-159, 1974.
BAJAJ y REINERT: In: *Reinert and Bajaj.* 757-777, 1977.
BAKER y PHILLIPS: *Phytopath.* 52 1242-1244, 1962.
BALATKOVA *et al.*: *Plant Sci. Lett.* **8**, 17-21, 1977.
BALL: *Am. J. Bot.* **33**, 301-318, 1946.
—: *Growth* **14**, 295-325, 1950.
—: *Bull. Torrey Bot. Club* **80**, 409-411, 1953.
BANNIER y STEPONKUS: *Hortscience* **7**, 194, 1972.
BARCLAY: *Nature* **265**, 410-411, 1975.
BARKER: *Can. J. Bot.* 47, 1334-1336, 1969.
BARLASS *et al.*: *Ann. Appl. Biol.* **101**, 291-295, 1982.
BARSKY *et al.*: *Plant Cell Rep.*, **3**, 165-167, 1984.
BARZ *et al.*: *Plant tissue culture and its biotechnological application.* Springer Verlag, Berlín, 1-419, 1977.
BASTIAENS: *Meded. Fac. Landbonwwet. Gent* **48**, 1-11, 1983.
BASTIAENS *et al.*: *Meded. Fac. Landbouwwet. Gent* **48**, 13-24, 1983.
BAYLISS: In: *Vasil.* 113-144, 1980.
BEASLY *et al.*: In: *Street.* 169-192, 1974.
BEAUCHESNE: In: *Earle and Demarly.* 268-272, 1982.
BEAUCHESNE *et al.*: *Physiol. Plant.* **23**, 1101-1109, 1970.
BENBADIS: *Coll. C.N.R.S. Paris*, 121-129, 1968.
BERGMAN: *Am. Hort.* **51**, 41-44, 1972.
BERGMANN: *J. Gen. Physiol.* **43**, 841-851, 1960.
—: *Planta* **74**, 243-249, 1967.
BERLIN: *Newsletter I.A.P.T.C.* **46**, 8-14, 1985.
BERLIN y SASSE: *Adv. Biochem. Engin. Biotechn.* **31**, 99-132, 1985.
BERNARD: *Ann. Sci. Bot.* 9, 1-196, 1909.
BHOJWANI: In: *Vasil.* 258-268, 1984.
BHOJWANI y RAZDAN: *Plant tissue culture: theory and practice.* Elsevier, Amsterdam, 1-502, 1983.
BHOJWANI *et al.*: *Plant tissue culture, a classified bibliography.* Elsevier, Amsterdam, 1-789, 1986.
BIGOT y NITSCH: *C.R. Acad. Sci.* 267, 619-621, 1968.
BINDING: *Z. Pflanzenphysiol.* 74, 327-356, 1974.
BINDING *et al.*: *Z. Pflanzenphysiol.* **101**, 119-130, 1981.
—: In: *Fujiwara.* 575-578, 1982.
BINO *et al.*: *Heredity* **52**, 437-441, 1984.
BITTERS *et al.*: *Citrograph* **57**, 85-86 y 105, 1972.
BLAKE: In: *Dodds.* 29-50, 1983.
BÖHM: *Intern. Rev. Cytol. Suppl.* **11B**, 183-208, 1980.
BOMHOFF *et al.*: *Molec. Gen. Genet.* **145**, 177-181, 1976.
BONGA: 1982. In: *Bonga and Durzan.* 387-412, 1982.
*BONGA y DURZAN: *Tissue culture in forestry.* M. Nijhoff and W. Junk Publ., The Hague, the Netherlands, 1-420, 1982.
BOTTINO: In: *Vasil.* 13-17, 1984.
BOULAY: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 9, 1986.
BOUNIOLS: *Plant Sci. Lett.* **2**, 363: 371, 1974.
BOUNIOLS y MARGARA: *Ann. Physiol. Vég.* **10**, 69-81, 1968.
BOURGIN y NITSCH: *Ann. Physiol. Vég.* **9**, 377-382, 1967.

BOURIQUET: *C.R. Soc. Biol.* **146**, 1897-1899, 1952.
—: *C.R. Acad. Sci.* **275**, 33-34, 1972.
BOURIQUET y COUVEZ: *Bull. Soc. Bot. France* **114**, 61-72, 1967.
BOURIQUET y VASSEUR: *Les phytohormones et l'organogenèse.* Int. Coll. Lieja, 381-389, 1965.
BOURNE: In: *Fossard*, de. 81-90, 1977.
BOXUS: *Acta Hort.* **30**, 187-191, 1973.
—: *J. Hort. Sci.* **49**, 209-210, 1974.
BOXUS *et al.*: In: *Ammirato et al.* 453-486, 1984.
BRAAK: *Jaarveslag IVT Wageningen*, the Netherlands, 14, 1967.
—: *Jaarveslag IVT Wageningen*, the Netherlands, 14-15, 1968.
BRADLEY *et al.*: In: *Henke.* 307-308, 1985.
BRAGT, VAN *et al.*: *Misc. Papers Landbouwhogeschool Wageningen*, the Netherlands **9**, 1-147, 1971.
BRAINERD y FUCHIGAMI: *J. Environm. Hortic.* **1**, 23-25, 1984.
BRAUN: *The biology of cancer.* Addison Wesley, Reading, 1-169, 1974.
BRIDGEN y STABY: In: *Evans et al.* 816-827, 1983.
BRIGHT *et al.*: *Cereal tissue and cell culture.* Martinus Nijhoff/W. Junk Publ., Dordrecht, Países Bajos, 1-304, 1985.
BROCKE, VON: *Diss. Everhard-Karls-Universität, Tübingen*, 1-234, 1972.
BROERTJES: *Natuur en Techniek* 49, 420-439, 1981.
BROERTJES y HARTEN, VAN: *Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops.* Elsevier, Amsterdam, 1-316, 1978.
—: *Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops.* Elsevier, Amsterdam. In press. 1987.
—: *Euphytica* 34, 93-95, 1985.
BROERTJES *et al.*: *Euphytica* **25**, 11-19, 1976.
BROWN y SOMMER: *An Atlas of gymnosperms cultured in vitro, 1924-1974.* Georgia Forest Res. Counc. Macon Georgia, 1-271, 1975.
BRUIJNE, DE y DEBERGH: *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent* **39**, 210-215, 1974.
BRUTTI y CASO: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 401, 1986.
BRY, DE: *Newsletter I.A.P.T.C.* **49**, 2-22, 1986.
BULARD y DEGIVRY: *Phyton* **22**, 55-60, 1965.
BULARD y MONIN: *Phyton* 20, 115-125, 1963.
BURGESS: *Intern. Rev. Cytol. Suppl.* **16**, 55-77, 1983.
BURSTRÖM: *Physiol. Plant.* **10**, 741-751, 1957.
BUSH *et al.*: *HortScience* 9, 270, 1974.
—: *Am. J. Bot.* 63, 729-737, 1976.
BUTCHER: In: *Reinert and Bajaj.* 668-693, 1977.
BUTCHER e INGRAM: *Plant tissue culture.* E. Arnold, Londres, 1-68, 1976.
BUTENKO: *Plant tissue culture and plant morphogenesis.* Israel Program for Scientific Translations. Jerusalén: 1-291, 1968.
BUTTON: *Outlook on Agric.* 9, 155-159, 1977.
BUTTON y BORNMAN: *J. South Afr. Bot.* **37**, 127-134, 1971a.
—: *Citrus Grower and Sub-Trop. Fruit J.* 453, 11-14, 1971b.
—: *Citrus Grower and Sub-Trop. Fruit. J.* **451**, 24-25, 1971c.
BUTTON y KOCHBA: In: *Reinert en Bajaj.* 1977, 70-92, 1977.

CAMERON *et al.*: *HortSci.* **21**, 774, 1986.
CAPITE, DE: *Am. J. Bot.* **42**, 869-873, 1955.
CARANTINO: *Biofutur* **13**, 47-49, 1983.
CAREW y STABA: *Lloydia* **28**, 1-26, 1965.
CARLSON: *Science* **168**: 487-489, 1970.
—: *Science* **180** 1366-1368, 1973.
CARLSON y CHALEFF: In: *Ledoux.* 245-261, 1974.
CARLSON *et al.*: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 2292-2294, 1972.
CASSELLS: In: *Schäfer-Menuhr.* 111-120, 1985.
CASSELLS y PLUNKETT.: In: *Withers and Alderson*, 105-111, 1986.
CASSELLS *et al.*: In: *Ingram and Helgeson.* 125-130, 1980.
CHAMPAGNAT.: In: *Gautheret*, 238-253, 1977.
CHAMPAGNAT y MOREL: *Bull. Soc. Bot. France Mém.* **116**, 111-132, 1969.
—: *C.R. Acad. Sci.* **274**, 3.379-3.380, 1972.
CHAMPAGNAT *et al*: *Rev. Gen. Bot.* **73**, 706-746,1966.

CHANDLER *et al.: Can. J. Bot.* **50**, 2.265-2.270, 1972.
CHANDRA y HILDEBRANDT: *Virology* **31**, 414-421, 1967.
CHAUSSAT EN BIGOT: *La multiplication végétative des plantes supérieures.* Gauthier-Villars, Paris, Francia, 1-277, 1980.
CHAUSSAT *et al.:Physiol. Vég.* **24**, 283-291, 1986.
CHAVADEJ y BECKER: *Plant Cell Tissue Organ Culture* **3**, 265-272, 1984.
CHEEMA y SHARMA: In: *Sen and Giles,*. 309-317, 1983.
CHENG y VOQUI: *Science* **189**, 306-307, 1977.
CHENG-HAW *et al.: Malayan Ochid Rev.* **13**, 60-65, 1976-78.
CHIANG-SHIANG *et al:Malayan Orchid Rev.* **13**, 43-55, 1976-78.
CHILTON *et al.: Cell* **11**, 263-271, 1977.
CHURCHILL *et al.: Am. Orchid. Soc. Bull,* **40**, 109-113, 1971a.
—: *Die Orchidee 22*, 147-151, 1971b.
—: *New Phytol.* **72**, 161-166, 1973.
COCKING: *Nature* **187**, 927-929, 1960.
—: *Span* **20**, 5-7, 1977.
—: *Proc. 8th Congr. Eucarpia Interspecific Hybrid. Plant Breed.*: 229-235, 1977a.
—: In: *Anonymous.* 255-263, 1978.
COHEN.: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 305, 1986.
COLEMAN *et al.: Physiol. Plant.* **48**, 519-525, 1980.
COLLINS *et al.*: In: *Gustafson.* 323-383, 1984.
COMPTON y PREECE: *Newl. I.A.P.T.C.* **50**, 9-18, 1986.
CONGER: *Cloning agricultural plants via in vitro techniques.* CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-273, 1981.
CONNER y THOMAS: *Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc.* **31**, 342-357, 1981.
CONSTABEL *et al.: Planta Medica* **25**, 158-165, 1974.
CONSTABEL y EILERT: *Newsl. I.A.P.T.C.* **50**, 2-8, 1986.
COOKE: *HortScience* **12(4)**, 339, 1977.
COUMANS *et al.: Acta Hort.* **91**, 287-293, 1979.
COX *et al.: Plant Physiol.* **20**, 289, 1945.
—: *Nature* 185, 403-404, 1960.
CREZE: *C.R. Séances Acad. Agric. France* **71**, 572-576, 1985.
CRISP y WALKEY: *Euphytica* **23**, 305-313, 1974.
CRONAUER y KRIKORIAN: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 179, 1986.
DALE: *Rep. Welsh Plant Breed. Station*, 101-115, 1976.
DALE y WEBB: In: *Bright and Jones.* 79-96, 1985.
D'AMATO: In: *Reinert and Bajaj.* 343-357, 1977.
—: In: *Thorpe.* 287-296, 1978.
—: *Critical Rev. Plant Sci.* **3**, 73-112, 1985.
DAMIANO *et al.: Hort. Sci.* **21**, 684, 1986.
DATTA *et al.: Plant Cell Tissue Organ Culture* **2**, 15-20, 1983.
DAUB: *Ann. Rev. Phytopath.* **24**, 159-186, 1986.
DAVEY y KUMAR: *Intern. Rev. Cytol. Suppl.* **16**, 219-299, 1983.
DAVID: In: *Bonga and Durzan.* 1982, 72-108, 1982.
DEBERGH: *Antheren- en pollenkultuur voor het bekomen van haploide embryo's van Lycopersicon* spp. Diss. Rijksuniv. Gent, Bélgica, 1-137, 1974.
—: *Verh. Kon. Acad. Wet. Belg.* **40**, 1-70, 1978.
—: *Nieuwe aspecten bij de weefselteelt van planten. Thesis Rijksuniv.* Gent, Bélgica, 1-126, 1982.
—: *Physiol. Plant.* **59**, 270-276, 1983.
—: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 430, 1986.
DEBERGH y MAENE: *Acta Hortic.* **78**, 449-454, 1977.
—: *Scientia Hortic.* **14**, 335-345, 1981.
DEBERGH *et al.: Physiol. Plant.* **53**, 181-187, 1981.
DEGANI y SMITH: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 411, 1986.
DEGIVRY.: *Bull. Sci. Bourgogne* **24**, 57-87, 1966.
DELEPLANQUE *et al.: Proc. 5th Intern. Conf. Robot Vision Sensory Control.* Kempston, Bedford, 305-314, 1985.
DEMARLY: *Zaadbelangen* **40**, 41-42, 1986.
DESJARDINS *et al.: HortSci.* **21**, 735, 1986.
DHAWAN *et al.: Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 113, 1986.
DIETRICH: *Flora* **17**, 379-417, 1924.

DIXON: *Plant cell culture, a practical approach.* IRL Press, Oxford, 1-236, 1985.
DODDS: *Tissue culture of trees.* Croom Helm, Londres, 1-147, 1983.
—: *Plant genetic engineering.* Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1-312, 1985.
DOLFUS y NICOLAS-PRAT: *C.R. Acad. Sci,* **268**, 501-503, 1969.
DOMMERGUES y GILLOT: *Ann. Amélior. Plantes* **23**, 89-93, 1973.
DONS y BOUWER: In: *Anonymous.* 497-504, 1986.
DONS y JONG, DE: *Vakbl. Bloem.* **41(43)**, 80-83, 1986.
DORE: *Application de la culture in vitro à l'amélioration des plantes potagères.* CNRA, INRA, Versalles, 1-210, 1980.
DOUGALL: In: *Sharp et al.* 727-743, 1979.
DOUGALL y WETHERELL: *Cryobiology* **11**, 410-415, 1974.
DRAPER *et al.: In: Yeoman.* 271-301, 1986.
DRIRA *et al.: Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 181, 1986.
DUDITS *et al.: Can. J. Bot.* **54**: 1.063-1.067, 1976.
—: *Cell genetics in higher plants.* Akademiae Kiado, Budapest, 1-251, 1976a.
DULIEU: *Phytomorph.* **22**, 283-296, 1972.
DULIEU y BARBIER: In: *Earle and Demarly.* 211-227, 1982.
DUNWELL: In: *Bright and Jones.* 1-44, 1985.
EARLE y DEMARLY: *Variability in plants regenerated from tissue culture.* Praeger, Nueva York, 1-392, 1982.
EARLE y LANGHAUS: *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **99**, 128-131, 1974a.
—: *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 99, 352-358, 1974b.
ECONOMOU: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 431, 1986.
ECONOMOU y READ: *HortSci.* **21**, 761, 1986.
ELLIOT: *Planta* **95**, 183-186, 1970.
ENGLIS y HANAHAN: *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 51-54, 1945.
ERIKSSON y JONASSEN: *Planta* **89**, 85-89, 1969.
ERNST: Am. *Orchid Soc. Bull.* **44**, 12-18, 1975.
EVANS y BRAVO: In: *Evans et al.* 124-176, 1983.
—: *Intern. Rev. Cytol. Suppl.* **16**, 33-53, 1983a.
—: In: *Zimmerman.* 73-94, 1986.
EVANS y SHARP: In: *Evans et al.*, 97-132, 1986.
EVANS *et al.*: In:, *Thorpe.* , 45-113, 1981.
—: *Handbook of plant cell culture. Vol 1. Techniques for propagation and breeding.* MacMillan Publ. Co., Nueva York, 1-970, 1983.
—: *Am. J. Bot.* 71, 759-774, 1984.
—: *Handbook of plant cell culture. Vol 4. Techniques and applications.* MacMillan Publ. Co., New York, 1-698, 1986.
EVERS: *Growth and morphogenesis of shoot initials of Douglas fir, Pseudotsuga mensiesii* (Mirb.) *Franco, in vitro.* Diss. Agric. Univ. Wageningen, Países Bajos. Article 1-6, 1984.
FABBRI *et al.: Sci. Hortic.* 28, 331-337, 1986.
FAST: *Die Orchidee* 22, 189-192, 1971.
—: *Orchideen Kultur.* Verlag E. Ulmer, Stuttgart, 1-460, 1980.
FENG y LINK: *Plant Cell Physiol.* 11, 589-598, 1970.
FIECHTER: *Plant cell culture. Adv. Biochem. Engineering Biotechn.*, Springer Verlag, Berlín, 1-140, 1985.
FILLATTI *et al.: HortSci.* **21**: 773, 1986.
FLAMEE: *Am. Orchid Soc. Bull.* **47**, 419-423, 1978.
FLEMION: *Contr. Boyce Thomson Instit.* **15**, 229-241, 1948.
FLICK y EVANS: In: *Randall et al.* 200-210, 1983a.
FLICK *et al.: In: Evans et al.*, 13-81, 1983.
FONNESBECH: *Physiol. Plant.* **27**, 310-316, 1972.
FOSSARD, DE: *Tissue culture for plant propagators.* Univ. New England Printery, Armidale, Australia, 1-409, 1976.
—: *The horizons of tissue culture propagation Seminar NSW ASS.* Nursery-men. Univ. Sydney, 1-147, 1977.
FOURET *et al.: Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 371, 1986.
FOWLER: In: *Vasil.* 167-174, 1984.
—: In: *Yeoman.* 202-227, 1986.
FRETT y SMAGULA: *Can. J. Plant. Sci.* **63**, 467-472, 1983.
FRIDLUND.: In: *Anonymous.* 86-92, 1980.

FUJIMURA y KOMAMINE: In: *Vasil*, 159-166, 1984.
FUJIWARA (ED): *Plant tissue culture 1982. Proc. 5th Int.* Congr. Plant Tissue Cell Culture, Tokyo, Japan, 1-839, 1982.

GALSTON: *Am. J. Bot.* **34**, 599-600, 1947.
—: *Am. J. Bot.* **35**, 281-287, 1948.
GALUN y AVIV: In: *Lange et al.* 228-238, 1984.
GALZY: *Ann. Phytopathol. Physiol.* **1**, 149-166, 1969a.
—: *Vitis* 8, 191-205, 1969b.
GAMBORG y WETTER: *Plant tissue culture methods.* Publ. NRC-CNRC. Ottawa, Canada, 1-110, 1975.
GAMBORG *et al: Exp. Cell Res.* **50**, 151-158, 1968.
—: *Can. J. Genet. Cytol.* **16**, 737-750, 1974.
—: *In Vitro* **12**, 473-478, 1976.
GAS *et al.: C.R. Acad. Sci.* **272**, 407-410, 1971.
GATHERCOLE *et al.: Physiol. Plant.* **37**, 213-217, 1976.
GAUTHERET: *C.R. Acad. Sci.* **198**, 2.195-2.196, 1934.
—: *C.R. Acad. Sci.* **208**, 118-120, 1939.
—: *C.R. Acad. Sci.* **210**, 632-634, 1940.
—: *La culture des tissues végétaux.* Masson Cie. París, 1-863, 1959.
—: *Rev. Cytol. Biol. Vég.* 32, 99-220, 1964.
—: *Am. J. Bot.* **56**, 702-717, 1969
—: *La culture des tissues et des cellules des végétaux.* Masson, París, 1-261, 1977.
GAUTHERET: Bot. Mag. Tokyo **96**, 393-410, 1983.
GERHARD *et al.: Mitt. Klosterneuburg* **33**, 24-30, 1983
GEIER: *Acta Hortic.* 131, 329-337, 1983.
GENGENBACH y GREEN: *Crop. Sci.* **15**, 645-649, 1975.
GEORGE y SHERRINGTON: *Plant propagation by tissue culture.* Eversley, Reino Unido, 1-709, 1984.
GEORGE *et al.: Plant Cell Rep.* **2**, 189-191, 1983.
GHEYSEN *et al.*: In: *Hohn and Dennis.* 1985, 11-47, 1985.
GIBSON: *Austr. J. Biol. Sci.* **20**, 837-842, 1967.
GLEBA y SYTNIK: *Protoplasts fusion, genetic engineering in higher plants.* Springer Verlag, Berlín, 1-220, 1984.
GOLDY y LYRENE: *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **109**, 336-338, 1984.
GONZALES y WIDHOLM: In: *Dixon.* 67-78, 1985.
GORTER: *J. Hort. Sci.* **40**, 177-179, 1965.
GRAY: *Hort. Rev.* 3, 1-27, 1981.
—: *HortSci.* 21, 820, 1986.
GREENWOOD y BERLYN: *Am. J. Bot.* **60**, 42-47, 1973.
GRIESBACH: *Plant Cell Tissue Organ Culture* **1**, 103-107, 1981.
GRIFFIS *et al: Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc.* **33**, 618-622, 1983.
GROOT, DE *et al.: Genetische manipulatie in dienst van de landbouw.* Nat. Raad voor Landbouwkundig Onderzoek, The Hague, Países Bajos. *Studierapport* **14a**, 1-63, 1982.
GROUT: *Plant Science Lett.* 5, 401-405, 1975.
GROUT y ASTON: *Hort. Res.* 17, 1-7, 1977.
—: *Hort. Res.* **17**, 65-71, 1978.
GROUT y CRISP: *Acta Hort.* **78**, 289-296, 1977.
GROUT *et al.: Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* 6, 148, 1986.
GRUNEWALDT: *Acta Hortic.* **131**, 339-343, 1983.
GUHA y MAHESWARI: *Nature* **204**, 479, 1964.
—: *Nature* **212**, 97-98, 1966.
GUNN y DAY: In: *Withers and Alderson.* 313-336, 1986.
GUPTON: *HortSci.* **21**, 734, 1986.
GUSTAFSON: *Gene manipulation in plant improvement.* Plenum Press, Nueva York, 1-668, 1984.

HABERLANDT: *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien Math. Nat. Klasse* **111(1)**, 69-92, 1902.
HACCIUS: *Phytomorph.* **28**, 74-81, 1978.
HACCIUS y HAUSNER: *Planta Medica Suppl.*, 35-41, 1975.
HACKETT: *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **95**, 398-402, 1970.
—: *Hort. Rev.* 7, 109-155, 1985.
HACKETT y ANDERSON: *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **90**, 365-369, 1967.
HADLEY: In: *Sanders et al.* 335-351, 1975.
—: In: *Arditti,* 83-118, 1982.

HAKKAART y BALEN, VAN: *Vakbl. Bloem.* **35(11)**, 34-37, 1980.
HAKKAART y VERSLUIJS: *Vakbl. Bloem.* **39(49)**, 49-50, 1984.
HAKKAART *et al.: Vakbl. Bloem.* **35(2)**, 24-25, 1980.
—: *Vakbl. Bloem.* **38(33)**, 38-39, 1983.
HALL: *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **52**, 343-346, 1948.
HALPERIN: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**, 395-418, 1969.
HALQUIST *et al.: In Vitro* **19**, 248, 1983.
HAMMERSCHLAG: *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **107**, 44-47, 1982.
HÄNNIG: *Bot. Zeitung.* **62**, 45-80, 1904.
HANNINGS y LANGHAUS: *HortScience* **9**, 271, 1974.
HANSEN y LANE: *Plant Disease* **69**, 134-135, 1985.
HANSON y EDELMAN: *Planta* **102**, 11-25, 1972.
HARBERD.: *Euphytica* **18**, 425-429, 1969.
HARKINS y GALBRAITH: *Physiol. Plant.* **60**, 43-52, 1984.
HARLEY: *The biology of mytcorrhiza.* L. Hill, Londres, segunda edición, 1-334, 1969.
HARMS: *Quart. Rev. Biol.* **58**, 325-353, 1983.
—: In: *Vasil.* 213-220, 1984.
HARMS *et al: Z. Pflanzenzücht.* 77, 347-351, 1976.
HARTEN, VAN *et al.: Euphytica* 30, 1-8,1981.
HEBERLE-BORS: *Theor. Appl. Gen.* 71, 361-374, 1985.
HEBLE: In: *Newmann et al.* 281-289, 1985.
HEIDE: *Physiol. Plant.* **18**, 891-920, 1965.
HEIN y SCHIEDER: In: *Lange et al.*, 248-250, 1984.
HEINZ: *Induced mutations in vegetatively propagated plants*, 53-59, 1973.
HELLER: *Ann. Sci. Bot. Vég. Paris* **14**, 1-223, 1953.
HENKE *et al.: Tissue culture in forestry and agriculture. Basic Life Sciences vol 32.* Plenum Press, Nueva york: 1-390, 1985.
HENSHAW: *Abstr. 3rd Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture, Leicester*, 212, 1974.
—: *Biol. J. Linnean Soc.* **10**, 434, 1978.
—: *Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture* **5**, 789-792, 1982.
HENSHAW y O'HARA: In: *Mantell and Smith.*, 219-238, 1984.
HERMAN y HAAS: *Z. Pflanzenphysiol.* **89**, 467-470, 1978.
HERMSEN: *Vakblad Biologen* **57**, 86-91, 1977.
—: *Iowa State J. Res.* **58**, 449-460, 1984.
HERMSEN y RAMANNA: *Phil. Trans. Roy. Soc. Londres* **B292**, 449-507, 1981.
HERMSEN *el al.: Euphytica* **30**, 239-246, 1981.
HERNALSTEENS *et al.: Nature* **287**, 654-656, 1980.
HESS y WAGENR: *Z. Pflanzenphysiol.* **72**, 466-468, 1974.
HILDEBRANDT: *Coll. Int. C.N.R.S.* **193**, 71-93, 1971.
—: In: *Reinert and Bajaj.*, 581-597, 1977.
HIROAKA: Int. *Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 37, 1986.
HOHN y DENNIS: *Genetic flux in plants.* Springer Verlag, Viena, 1-253, 1985.
HOMES *et al.: Bull. Soc. Roy. Belg.* **106**, 123-128, 1972.
HONDELMANN y WILBERG: *Z. Pflanzenzüchtung* **69**, 19-24, 1973.
HOOYKAAS-VAN SLOGTEREN *et al., Nature* **311**, 763-764, 1984.
HORAK *et al.: Ann. Bot.* **39**, 571-577, 1975.
HORGAN: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 295, 1986.
HORSCH *et al.: Science* **277**, 1.229-1.231, 1985.
HOUTEN, TEN *et al.: Neth. J. Plant Path.* **74**, 17-24, 1968.
HOWLAND y HART: In: *Reinert and Bajaj.* 731-756, 1977.
HU y WANG: In: *Evans et al.* , 177-227, 1983
—: In: *Evans et al.* , 43-96, 1986.
HUANG y MILLIKAN: *Hort. Science* **15**, 741-743, 1980.
HUGHES: In: *Conger.* 5-50, 1981.
HUGHES *et al. (eds).: Propagation of higher plants through tissue culture.* U.S. Dept. of Energy, Tech. Comm. Center, 1-305, 1978
HUNTER.: *J. Hort. Sci.* **54**, 111-114, 1979.
HUNTER *et al.: Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 410, 1986.
HUSSEY: In: *Withers and Alderson.* 1986, 69-84, 1986.
HUSSEY y FALAVIGNA: *J. Exp. Bot.* **31**: 1.675-1.686, 1980.
HUXTER *et al.: Physiol. Plant.* **53**, 319-326, 1981.
HYNER y ARDITTI: *Am. J. Bot.* **60**, 829-835, 1973.

INGLE: *Span*, **25**, 50-53, 1982.
INGRAM: In: *Street*. 392-421, 1973.
INGRAM y HELGESON: *Tissue culture methods for plant pathologists*. Blackwell Scient. Publi., Oxford, 1-272, 1980.
INGRAM y MACDONALD: In: *Anonymous*, 241-258, 1986.
INTUWONG y SAGAWA: *Am. Orchid Soc. Bull.* **42**, 209-215, 1973.
IWAI y KISHI: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 82, 1986.
JACOB *et al*: *Meded. Fac. Landb. Wet. Rijksuniv. Gent* **45**, 335-343, 1980.
JACQUIOT: *C. R. Acad. Sci.* **233**, 815-817, 1951.
—: *Ann. Sci. Forest. Nancy* **21**, 315-474, 1964.
—: *J. Inst. Wood Sci.* **16**, 22-34, 1966.
JAISWAL: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* **6**, 163, 1986.
JANSEN: In: *Fujiwara*, 880-888, 1982.
JENSEN: *Production of monoploids in barley. A progress report. In: Polyploidy and induced mutations in plant breeding, Int: Atom. Energy Agency PL* **503/24**, 167-169, 1974.
—: *Newsl. I.A.P.T.C.* **18**, 2-7, 1976.
—: In: *Reinert en Bajaj*. 299-340, 1977.
JOHANSSON: *Physiol. Plant.* **59**, 397-403, 1983.
JOHANSSON y ERIKSSON: *Proc. 5th Int. Plant. Tissue Cell Culture*, 5, 543-544, 1982.
JOHNSON: *HortScience*, 15, 605-606, 1980.
JOHRI y BHOJWANI: In: *Reinert en Bajaj*, 398-411, 1977.
JOHRI *et al.*: *Experimental embryology of vascular plants*. Springer Verlag, Berlin, 1-273, 1982.
JONARD: In: *Bajaj*. 31-48, 1986.
JONARD *et al.*: *Scientia Hortic.*, **20**, 147-159, 1983.
JONES: *Scientia Hortic.*, 30, 44-48, 1979.
—: *Biologist*, 30, 181-188, 1983.
—: In: *Zimmerman et al.*, 175-182, 1986.
JONES y HOPGOOD: *J. Hort. Sci.*, **54**, 63-66, 1979.
KADKADE y JOBSON: *Plant Sci. Lett.*, **13**, 67-73, 1978.
KAHN: *Plant Disease Rep.*, **60**, 459-461, 1976.
—: In: *Zimmerman et al.*, 147-164, 1986.
KAMEYA: *Jap. J. Gen.*, **50**, 417-420, 1975.
—: In *Vasil*, 423-427, 1984.
KANTA: *Nature*, 188, 683-684, 1960.
KANTA et al: *Nature*, **194**, 1.214-1.217, 1962.
KAO y MICHAYLUK: *Planta*, **126**, 105-110, 1975.
KARP *et al.*: *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **3**, 363-373, 1984.
KARPER y PIERIK: *Vakbl. Bloem.*, **36 (44)**, 44-45, 1981.
KARTHA: In: *Thorpe*, 181-211, 1981.
—: *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press Inc., Boca Raton, EEUU, 1-276, 1985.
—: In: *Withers and Alderson*, 219-238, 1986.
KARTHA y GAMBORG: *Phitopathology*, **65**, 826-828, 1975.
KARTHA *et al.*: *Abstr. 3rd Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture*, Leicester, 117, 1974.
KASHA: *Haploids in higher plants*. Univ. Guelph, Canada, 1-421, 1974.
KASHA y KAO: *Nature*, **225**, 874-876, 1970.
KASPERBAUER y COLLINS: *Crop. Sci.*, 12, 98-101, 1972.
KELLER: *Int. Congr. Plant. Tissue Cell Culture Abstr.*, **6**, 120, 1986.
KESTER: *Hilgardia*, **22**, 335-365, 1953.
KINDEREN, VAN DER: *Orchideeën*, **44**, 96-97, 1982.
KING: In: *Lange et al.*, 199-214, 1984.
KING y STREET: In: *Street*, 269-337, 1973.
KITTO y JANICK: *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **110**, 277-282, 1985.
—: *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **110**: 283-286, 1985a.
KLEIN y BOPP: *Nature*, **230**, 474, 1971.
KNAUSS: *Florida State Hort. Soc.*, **89**, 293-296, 1976.
KNAUSS y MILLER: *In Vitro*, **14**, 754-756, 1978.
KNOP: Landw. *Vers. Stn.*, **30**, 292-294, 1884.
KNUDSON: *Bot. Gaz.*, **73**, 1-25, 1922.
—: *Am. Orchid Soc. Bull*, **15**, 214-217, 1946.
KOBLITZ: *Biol. Rundschau*, **7**, 241-249, 1969.
—: *Zell- und Gewebezüchtung bei Pflanzen*. G. Fischer Verlag, Jena, 1-84, 1972.
KOCHAR *et al.*: *J. Hered*, **62**, 59-61, 1971.

KOHLENBACH: In: *Barz et al.*, 355-366, 1977.
—: In: *Thorpe*, 59-66, 1978.
—: In: *Schäfer-Menuhr*, 101-109, 1985.
KONAR y NATARAJA: *Acta Bot. Neerl.*, **18**, 680-699, 1969.
KOTT y KASHA: In: *Bright and Jones*, 45-78, 1985.
KOVOOR: *C.R. Acad. Sci.*, **255**, 1.991-1.993, 1962.
KRENS *et al.*: *Nature* **296**, 72-74, 1982.
KRUSBERG y BABINEAU: In: *Sharp et al.*, 401-419, 1979.
KRUYT. *Vakblad Biologen*, **31**, 181-193, 1951.
—: *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch.* **C55**, 503-513, 1952.
KUMAR *et al: Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr*, **6**, 11, 1986.
KUNNEMAN-KOOIJ: *Inventarisatie van de toepassingsmogelijkheden van weefselkweek voor de vegatatieve vermeerdering van houtige boomkwekerijgewassen.* Literature study, Department of Horticulture, Agricultural Univ. Wageningen, Países Bajos, 1-64, 1984.
KUSTER: *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **27**, 589-598, 1909.
KYTE: *Plants from test tubes. An introduction to micropropagation.* Timber Press, Portland, Oregon, 1-132, 1983.

LAIBACH: *Z. Bot.* **17**, 417-459, 1925.
—: *J. Hered.* **20**: 201-208, 1929.
LAKSO *et al.*: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.*, 6, 397, 1986.
LAMMERTS: *Am. J. Bot.* 29, 166-171, 1942.
—: *Plants Gardens*, 2: 11, 1946.
LAMOTTE y LERSTEN: *Am. J. Bot.* **59**: 89-96. 1972.
LANGFORD y WAINWRIGHT: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* 6: 433, 1986.
LANGE: *Diss. Wageningen. Verslagen Landb. Onderz.* **719**: 1-162, 1969.
LANGE *et al.*: *Efficiency in plant breeding. Pudoc.* Wageningen, 1-383, 1984.
LAREBEKE *et al.*: *Nature*, **252**, 169-170, 1974.
LARKIN: *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **1**, 149-164, 1982.
LARKIN y SCOWCORFT: *Theor. Appl. Genetics*, **60**, 197-214, 1981.
LARUE: *Bull. Torrey Bot. Club*, **63**, 365-382, 1936.
LATTA: *Can. J. Bot.*, **49**, 1.253-1.254, 1971.
LEDOUX: *Genetic manipulations with plant materials*, Plenum Press, Nueva York, 1-601, 1974
LEE y MOWE: *Singapore J. Primary Industries* **11**, 46-48, 1983.
LEFFRING: *Meded. Dir. Tuinbouw*, **31**, 392-395, 1968.
LESCURE: *Bull. Soc. Bot. France*, **117**, 353-365, 1970
LETHAM: *Physiol. Plant.* **32**, 66-70, 1974.
LETOUZE: *Physiol. Vég.* **12**, 397-412, 1974.
LETOUZE y BEAUCHESNE: *C.R. Acad. Sci.* **269**, 1.528-1.531, 1969.
LIMASSET y CORNUET: *C.R. Acad. Sci. París*, **228**, 1.888-1.890, 1949.
LINDSEY y YEOMAN: In: *Neumann et al.*, 304-315, 1985.
—: In: *Yeoman*, 228-267, 1986.
LINSKENS *et al.*: *Plantenveredeling en genen manipulatie.* Pudoc, Wageningen, Países Bajos, 1-150, 1983.
LITZ: In: *Henke et al.*, 179-193, 1985.
LITZ *et al.*: *Hort. Rev.*, 7, 157-200, 1985.
LIU y SHANG: *Abstr. 3rd Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture*, Leicester, 46, 1974.
LLOYD y MCCOWN: *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30, 421-427, 1980.
LONG y CASSELLS: In: *Withers and Anderson*, 239-248, 1986.
LOO: *Am. J. Bot.* **32**, 13-17, 1945.
LUCKE: *Die Orchidee*, **20**, 270-271, 1969.
—: *Die Orchidee*, **22**, 146-147, 1971.
LYRENE: *Florida Agric. Res.*, **3**, 23-25, 1984.

MAAT: *Gewasbescherming*, **11**, 13-21, 1980.
MAAT y SCHURING: *Vakblad Bloem*, **36(10)**, 34-35, 1981.
MACKENZIE y STREET: *J. Exp. Bot.*, **21**, 824-834, 1970.
MAENE y DEBERGH: *Acta Hort.*, **131**, 201-208, 1983.
—: *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **5**, 23-33, 1985.
MAGNIEN y NETTANCOURT, DE: *Genetic engineering of plants and microorganisms important for agriculture.* M. Nijhoff, Dordrecht, Países Bajos, 1-197, 1985.
MAHESHWARI y RANGASWAMY: *Indian J. Hortic.*, **15**, 275-281, 1958.
—: *Adv. Bot. Res.*, **2**, 219-321, 1965.

MAHESHWARI *et al.: Newsletter I.A.P.T.C.*, **41**, 2-9, 1983.
MALIGA: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 519-542, 1984.
MANTELL y SMITH: *Plant biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, England, 1-334, 1984.
MARCOTRIGIANO y GOUIN: *Ann. Bot.* **54**: 513-522, 1984.
—: *Ann. Bot.*, **54**, 503-511, 1984a.
MARETZKI *et al.: Plant Physiol.*, **48**, 521-525, 1971.
MARGARA: *Ann. Physiol. Vég.*, **11**, 95-112, 1969.
—: *Bases de la multiplication végétative, les méristèmes et l'organogenèse*. Publ. Inst. Nat. Rech. Agron. París, 1-262, 1982.
MARSHALL: *A survey of laboratories used for plant tissue culture propagation in California. Misc. Publ. Ornamental Hort.* California Polytechnic State Univ., San Luis Obispo, 1-106, 1977.
MARTIN-TANGUY *et al.: C.R. Acad. Sci.* **282**, 2.231-2.234, 1976.
MARTON *et al.: Nature*, **277**, 129-131, 1979.
MATHES: *Phyton*, **21**, 137-141, 1964.
MATSUBARA *et al.: J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 43, 63-68, 1974.
MAYER: *Planta*, **47**, 401-446, 1956.
MBANASO y ROSCOE: *Plant Sci. Lett.*, **25**, 61-66, 1982.
MCCOMB: In: *Anonymous*, 167-180, 1978a.
MCCOWN: In: *Zimmerman et al.*, 53-60, 1986.
MEINS: *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **34**, 327-346, 1983.
MELCHERS y LABIB: *Molec. Gen. Genet.*, **135**, 277-294, 1974.
MELCHERS *et al.: Carlsberg Res. Comm.*, **43**, 203-218, 1978.
MELE *et al.: Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture*, **5**, 69-70, 1982.
MELLOR y STACE-SMITH: *Can. J. Bot.*, **47**, 1.617-1.621, 1969.
MENCZEL: *What's new in Plant Physiology*, **14**, 9-11, 1983.
MEREDITH: In: *Gustafson*, 503-528, 1984.
MERRICK y COLLIN: In: *Doré*, 121-125, 1980.
MESTRE y BENBADIS: *Bull. Soc. Bot. France*, **132**, 1-171, 1985.
MEYER: *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, **33**, 402-407, 1983.
MEYER y KERNSH: *Int. Congr. Plant. Tissue Cell Culture Abstr.*, **6**, 149, 1986.
MEYNET y SIBI: *Z. Pflanzenzüchtung*, **93**, 78-85, 1984.
MILLER: In: *Dixon*, 215-229, 1985.
MILLER y MAXWELL: In: *Evans et al.*, 853-879, 1983.
MILLER y SKOOG: *Am. J. Bot.* **40**, 768-773, 1953.
MILLER *et al.: J. Am. Chem. Soc.*, 77, 2.662-2.663, 1955.
MISSON *et al.: Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, **48**, 1.151-1.157, 1983.
MIX: In: *Lange et al.*, 194-195, 1984.
MOHAN RAM *et al.: Form, structure and function in plants*. Sarita Prakashan, India, 1-457, 1975.
MOK *et al.: Hort. Sci.*, 21, 796, 1986.
MONCOUSIN: *Revue Hort. Suisse*, **52**, 361-363, 1979.
—: *Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture*, **5**, 147-148, 1982.
MONNIER: *Rev. Cytol. Biol. Vég.*, **39**, 1-120, 1976.
—: *Bull. Soc. Bot. France*, 127, 59-70, 1980.
MONTANT: *C.R. Séanc. Soc. Biol.* **151**, 391-392, 1957.
MORANDI *et al.: Ann. Amélior. Plantes*, 29, 623-630, 1979.
MOREL: *Am. Orchid Soc. Bull.*, 29, 495-497, 1960.
—: *Rev. Hort. Ann. Soc. Nat. Hort. France*, 136, 733-740, 1964.
—: *Gartenwelt*, **65**, 350-352, 1965.
—: In: *Withner*, 169-222, 1974.
MOREL y MARTIN: *C.R. Acad. Sci.*, **235**, 1.324-1.325. 1952.
—: *C.R. Acad. Agric. France*, **41**, 472-475, 1955.
MORI *et al.: Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture*, **5**, 803-804, 1982.
MORRIS *et al.*: In: *Dixon*, 127-167, 1985.
MOSELLA: *Diss. Université Sciences Techn. Languedoc*, 1-202, 1979.
MOSELLA *et al.: C.R. Acad. Sci. París*, **289**, 505-508, 1979
MOTT: In: *Conger*, 217-254, 1981.
MUIR *et al.: Science*, **119**, 87-878, 1954.
—: *Am. J. Bot.*, **45**, 589-597, 1958.
MURAKISHI y CARLSON: *In Vitro*, **15**, 192 (Abstr. 114), 1979.
MURASHIGE: *Science*, **134**, 280, 1961.
—: *Physiol. Plant.*, 17, 636-643, 1964.

MURASHIGE: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**, 135-166, 1974.
MURASHIGE y NAKANO: *J. Hered.*, **57**, 115-118, 1966.
MURASHIGE y SKOOG: *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497, 1962.
MURASHIGE *et al.*: *Hort. Science*, **7**, 118-119, 1972.
—: *Hort. Science*, **9**, 175-180, 1974.

NAG y STREET: *Physiol. Plant.*, **34**, 254-260, 1975a.
—: *Physiol. Plant.*, **34**, 261-265, 1975b.
NAKAMURA: *New Phytol.*, **90**, 701-715, 1982.
NARAYANASWAMY y NORSTOG: *Bot. Rev.*, **30**, 587-628, 1964.
NAVARRO *et al.*: *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **100**, 471-479, 1975.
NEMETH: *P. Pflanzenphysiol.*, **95**, 389-396, 1979.
—: In: *Bajaj*, 49-64, 1986.
NEUMANN *et al.*: *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*. Springer Verlag, Berlín, 1-377, 1985.
NICKELL: *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **57**, 401-405, 1951.
—: *Hawaiian Plant. Record*, **58**, 293-314, 1973.
NIIMI: *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 34, 346-352, 1970.
NITSCH: *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég.*, **9**, 1-92, 1968.
—: *Phytomorphology*, 19, 389-404, 1969.
—: *Z. Pflanzenzüchtung*, **67**, 3-18, 1972.
—: In: *Reinert and Bajaj*, 268-278, 1977.
—: In: *Thorpe*, 241-252, 1981.
NITSCH *et al.*: *Phytomorphology*, **17**, 446-453, 1967.
—: *C.R. Acad. Sci.*, **269**, 1.257-1.278, 1969a.
—: *C.R. Acad. Sci.*, **269**, 1.650-1.652, 1969b.
NITZSCHE: In: *Evans et al.* 782-805, 1983.
NOBECOURT: *C.R. Séance Soc. Biol.* **130**, 1.270-1.271, 1939.
NOITON *et al.*: *Hort. Sci.* **21**, 706, 1986.
NORRIS *et al.*: *Science*, **220**, 75-76, 1983.
NORSTOG: In: *Mohan Ram et al.*, 197-201, 1975.
NORTON y NORTON: *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 5, 187-197, 1986.
—: *Hort. Sci.*, 21, 699, 1986a.
—: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.*, **6**, 434, 1986b.

OOMS *et al.*: *Theor. Appl. Genet.*, **66**, 169-172, 1983.
OPATRNY y LANDA: *Biol. Plant.*, **16**, 312-315, 1974.
ORTON: *Plant Mol. Biol. Rep.*, **1**, 67-76, 1983.
—: In: *Gustafson*. 427-468, 1984.
OS, VAN: *Neth. J. Plant Pathology*, **70**, 18-26, 1964.
OVERBEEK, VAN *et al.*: *Science* 94, 350-351, 1941.
PALMER y BARKER: *Ann. Bot.*, **37**, 85-93, 1973.
PARLIMAN: In: *Zimmerman et al.*, 271-282, 1986.
PASZKOWSKI *et al.*: *EMBO J.* 3, 2.717-2.722, 1984.
PAULET: *Rev. Gen. Bot.*, 72, 697-792, 1965.
PECK y CUMMING: *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 6, 9-14, 1986.
PELLETIER y CHUPEAU: *Physiol. Vég.*, **22**, 377-399, 1984.
PELLETIER y DELISE: *Ann. Amélior. Plantes*, **19**, 353-355, 1969.
PELLETIER *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **191**, 244-250, 1983.
PENNELL: *Introduction to the micropropagation of horticultural crops*. Min. of Agric. Reino Unido, **2.413**, 1-46, 1982.
—: *Grower*, **103(8, Suppl.)**, 98-101, 1985.
PERRY y LYRENE: *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **109**, 4-6. 1984.
PHATAK: *Seed Sci. Technol.*, **2**, 3-155, 1974.
PIERIK: *Naturwiss*, **53**, 387, 1966.
—: *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen*, **67(6)**, 1-71, 1967.
—: *Z. Pflanzenphysiol.*, **66**, 141-152, 1967a.
—: *Neth. J. Agric. Sci.*, **17**, 203-208, 1969.
—: *Z. Pflanzenphysiol.*, **56**, 343-351, 1972.
—: *Plantenteelt in Kweekbuizen. Thieme, Zutphen*, Países Bajos, 1-164, 1975.
—: *Neth, J. Agric. Sci.*, **23**, 299-302, 1975c.
—: *Acta Hort.*, **54**, 71-82, 1975d.
—: *Neth. J. Agric. Sci.*, **24**, 98-104, 1976.

PIERIK: *Physiol. Plant.*, **37**, 80-82, 1976a.
—: *Groenten en Fruit*, **32(23)**, 15-17, 1976b.
—: *In vitro culture of higher plants. Bibliography. Ponsen en Looyen*, Wageningen, Países Bajos, 1-149, 1979.
—: *Vakbl. Bloem.* **39(24)**, 44-45, 1984.
—: *Vakbl. Bloem.* **41(17)**, 68-69, 1986.
PIERIK e IPPEL: *Acta Hort.*, **78**, 197-202, 1977.
PIERIK y POST: *Scientia Hort.*, **3**, 293-297, 1975.
PIERIK y RUIBING: *Neth. J. Agric. Sci.*, **21**, 129-138, 1973.
PIERIK y SEGERS: *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**, 204-212, 1973.
PIERIK y SPRENKELS: *Vakbl. Bloem.*, **39(21)**, 44-45, 1984.
PIERIK y STEEGMANS: *Z. Pflanzenphysiol.*, **68**, 228-234, 1972
—: *Scientia Hort.*, 3, 1-20, 1975a.
—: *Neth. J. Agric. Sci.*, **23**, 334-337, 1975b.
—: *Vakblad Bloem*, **30(24)**, 18-21, 1975c.
—: *Physiol. Plant.*, **34**, 14-17, 1975d.
—: *Scientia Hort.*, 4, 291-292, 1976.
—: *Neth. J. Agric. Sci.*, **24**, 274-277, 1976a.
—: *Scientia Hort.*, **21**, 267-272, 1983a.
—: *Neth. J. Agric. Sci.*, 32, 101-106, 1984.
—; *Vakbl. Bloem.*, **41**(32), 53, 1986.
—: *Neth. J. Agric. Sci.*, **34**, 217-223, 1986a.
PIERIK y TETTEROO: *Vakbl. Bloem.*, **41(46)**, 32-33, 1986.
PIERIK y WOETS: *Acta Hort.*, **23(2)**, 423-428, 1971.
PIERIK *et al.*: *Scientia Hort.*, **1**, 117-119, 1973.
—: *Vakbl. Bloem.*, 29(39), 18-21, 1974.
—: *Scientia Hort.*, 2, 193-198, 1974a.
—: *Vakbl. Bloem.*, 30(27), 17, 1975.
—: *Scientia Hort.*, **3**, 351-357, 1975a.
—: *Vakbl. Bloem.*, 34(25), 36-37, 1979.
—: *Neth. J. Agric. Sci.*, **27**, 221-226, 1979a.
—: *Neth. J. Agric. Sci.*, **30**, 341-346, 1982.
—: *Vakbl. Bloem.*, **37(52)**, 38-40, 1982a.
—: *Orchideeën*, **45**, 91-95, 1983.
—: *Acta Hort.*, **147**, 179-186, 1983a.
—: *Vakbl. Bloem.*, 39(3), 33, 1984.
—: *Bloembollencultuur*, **96(45)**, 8-10, 1985.
—: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.*, 6: 434, 1986.
PIERSON *et al.*: *Protoplasma*, **115**, 208-216, 1983.
PILET y ROLAND: *Cytobiologie*, **4**, 41-61, 1971.
POISSON y MAIA: *Revue Hort.*, **2.325**, 33-36, 1974.
POTRYKUS *et al.*: *Protoplasts 1983. Lecture Proceedings.* Birkhäuser Verlag, Basel, 1-267, 1983.
POWER y CHAPMAN: In: *Dixon*, 37-66. 1985.
POWER y COCKING: *Sci. Progr. (Oxford)*, 59, 181-198, 1971.
POWER *et al.*: *Nature*, **225**, 1.016-1.018, 1970.
—: *Nature* **263**, 500-502, 1976.
PREIL y ENGELHARDT: *Acta Hort.*, 78, 203-208, 1977.
—: *Gartenbauwiss*, **47**, 241-244, 1982.
PREIL *et al.*: *Z. Pflanzenzücht*, **79**, 167-171, 1977.
—: *Acta Hortic.*, **131** 345-351, 1983.
PROFT, DE *et al.*: *Physiol. Plant.*, **65**, 375-379, 1985.

QUAK: *Landbouwk. Tijdschr.*, **78**, 301-305, 1966.
—: *Proc. 18th Int. Hort. Congr.*, **3**, 12-25, 1972.
—: *In Vitro*, **13**, 194, 1977.
QUOIRIN: *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, **9**, 189-192, 1974.

RABECHAULT *et al.*: *Oléagineux*, **23**, 233-238, 1968.
—: *C.R. Acad. Sci.*, **268**, 1.728-1.731, 1969.
—: *Oléagineux*, **27**, 249-254, 1972.
—: *Oléagineux*, **28**, 333-336, 1973.
RADOJEVIC y KOVOOR: In: *Bajaj.*, 65-86, 1986.
RAGHAVAN: *Biol. Rev.* **41**, 1-58, 1966.

CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

RAGHAVAN: *Science*, **191**, 388-389, 1976.
—: *Experimental embryogenesis in vascular plants*. Acad. Press, Londres, 1-603, 1976.
—: In: *Reinert and Bajaj*, 375-397, 1977.
—: *Int. Rev. Cytol.*, **11B**, 209-240, 1980.
—: *Embryogenesis in angiosperms. Cambridge University Press, Cambridge, 1-303, 1986.*
RAMULA *et al.*: *Plant Sci. Lett*, **36**, 79-86, 1984.
RANDALL *et al.*: *Current topics in plant biochemistry and physiology*. University Missouri, Columbia 2nd vol., 1-350, 1983.
RANDOLPH; *Bull. Am. Iris Soc.*, **97**, 33-45, 1945.
RANDOLPH y COX: *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **43**, 284-300, 1943.
RANGAN *et al.*: *Hort. Science*, **3**, 226-227, 1968.
RANGASWAMY: In: *Reinert and Bajaj*, 412-425, 1977.
—: In: *Rao*, 269-286, 1981.
RANGASWAMY y SHIVANNA: Nature, **216**, 927-929, 1967.
—: *J. Indian Bot. Soc.*, **50A**, 286-296, 1971.
RAO: *Phyton*, **22**, 165-167, 1965.
—: In: *Reinert and Bajaj*, 44-69, 1977.
—: *Tissue culture of economically important plants. Costed and ANBS*, 1-307, 1981.
RAO y RANGASWAMY: *Bot. Gaz.*, **133**, 350-355, 1972.
RAO *et. al: Plant tissue culture, genetic manipulation and somatic hybridization of plant cells.* Proc. Nat. Symp. Bhabba Atomic Research Centre, Bombay, India, 1-436, 1980.
RAPPAPORT: *Bot. Rev.*, 20, 201-225, 1954.
RAQUIN: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture*, **6**, 123, 1986.
RASHID: *Physiol. Plant*, **58**, 544-548, 1983.
RATHORE y GOLDSWORTHY: *Bio/Technology*, **3**, 1.107-1.109, 1985.
RAVEH *et al.*: *In Vitro*, **9**, 216-222, 1973.
READ *et al.*: *Hort. Sci*, **21**, 796, 1986.
REDEI y REDEI: *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.*, **2**, 183-186, 1955.
REDENBAUGH *et al.*: *Hort. Sci.*, **21**, 819, 1986.
REEVES: *Span*, **29**, 32-33, 1986.
REFAAT *et. al.*: *Z. Pflanzenzücht*, **93**, 137-146.
REINERT: *Naturwiss*, **45**, 344-345, 1958.
—: *Planta*, **53**, 318-333, 1959.
—: In: *Street*, 338-355, 1973.
REINERT y BAJAJ: *Plant cell, tissue, and organ culture*. Springer Verlag, Berlin, 1-803, 1977.
—: In: *Reinert and Bajaj*, 251-267, 1977a.
REINERT y BESEMER: *Wiss. Z. Univ. Rostock Math. Nat. Reihe*, **16**, 599-604, 1967.
REINERT y MOHR: *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **91**, 664-671, 1967.
REINERT y YEOMAN: *Plant cell and tissue culture. A laboratory manual*. Springer Verlag, Berlin, 1-83, 1982.
REINHARD: In: *Street*, 433-459, 1974.
REINHARD y ALFERMANN: *Adv. Biochem. Engen.*, **16(1)**, 49-84, 1980.
REISCH: In: *Evans et al.*, 748-770, 1983.
REUTHER: *Gartenbauwiss*, 43, 1-10, 1978.
—: In: *Schäfer-Menuhr*, 1-14, 1985.
REUTHER y SONNEBORN: *Zierpflanzenbau*, **21**, 478-479, 1981.
REYBURN: *Am. Orchid Soc. Bull.*, 47, 798-802, 1978.
RIJVEN: *Acta Bot. Neerl.*, **1**, 157-200, 1952.
RINGE y NITSCH: *Plant Cell Physiol.*, **9**, 639-652, 1968.
ROBB: *J. Exp. Bot.*, **8**, 348-352, 1957.
ROBBINS: *Bot. Gaz.*, **73**, 376-390, 1922.
ROBERTS et al.: *Plant Tissue Culture Letters*, **1**, 22-24, 1984.
ROEST: *Acta Hort.*, **78**, 349-359, 1977.
—: In: *Doré*, 186-191, 1980.
ROEST y BOKELMANN: *Vakbl. Bloem*, **31(9)**, 36-37, 1976.
—: *Potato Res.*, **23**, 167-181, 1980.
ROMBERGER y TABOR: *Am. J. Bot.*, **58**, 131-140, 1971.
ROSATI *et al.*: *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **105**, 126-129, 1980.
ROSEVEAR y LAMBE: *Adv. Biochem. Engineering Biotech*, **31**, 37-58, 1985.
ROSSINI y NITSCH: *C. R. Acad. Sci.*, **263**, 1.379-1.382, 1966.
ROTH y LARK: *Theor. Appl. Genet.*, **68**, 421-431, 1984.
RUDELLE: In: *Gautheret*, 232-237, 1977.

RUGINI y WANG: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.*, **6**, 374, 1986.
RUGINI *et al.*: *Hort. Sci.*, **21**, 804, 1986.
RUSSELL y MCCOWN: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.*, **6**, 49, 1986.
RUTKOWSKI: *Am. Orchid Soc. Bull.*, **52**, 50, 1983.
RYBCZINSKI *et al.*: *Genet. Pol.*, **24**, 1-8, 1983.
SACHS: *Archiv. Bot. Inst. Würzburg*, **2**, 453 y 689, 1880-82.
SACRISTAN y MELCHERS: *Molec. Gen. Genet.*, **105**, 317-333, 1969.
SAKAI: *Hortic. Rev.*, **6**, 357-372, 1984.
SAKAI y SUGAWARA: *Plant Cell Physiol.*, **14**, 1.201-1.204, 1973.
SANDERS y ZIEBUR: In: *Maheswari*, 297-325, 1963.
SANDERS *et al.*: *Endomycorrhizas*. Acad. Press, Londres, 1-626, 1975.
SAN NOEUM: *Ann. Amél. Plantes*, **26**, 751-754, 1976.
SASTRI: *Morphogenesis in plant tissue cultures. Plant tissue and organ culture*. A symposium (Delhi), 105-107, 1963.
SAXENA *et al.*: *Planta*, **168**, 29-35, 1986.
SCHAEFFER: *Abstr. 3rd Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture*, Leicester, 71, 1974.
SCHÄFER-MENUHR: *In vitro techniques. Propagation and long term storage*. M. Nijhoff, Dordrecht, Países Bajos, 1-194, 1985.
SCHENCK y RÖBBELEN: *Z. Pflanzenzücht.*, 89, 278-288, 1982.
SCHENK y HILDEBRANDT: *Can. J. Bot.*, **50**, 199-204, 1972.
SCHIEDER: *Z. Pflanzenphysiol.*, 76, 462-466, 1975.
—: *Mol. Gen. Genet.*, **149**, 251-254, 1976.
—: In: *Rao et al.*, 216-227. 1980.
SCHILPEROORT: In: *Linskens et al.*, 97-136, 1983.
—: In: *Lange et al.*, 251-285, 1984.
SCHLECHTER: *Die Orchideen Band II*, (3-5), 158-211, 1980.
SCHMIDT y KELLER: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.*, **6**, 122, 1986.
SCHNEIDER y MCKENSIE: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.*, **6**, 374, 1986.
SCHNEIDER-MOLDRICKX: *Acta Hort.*, **131**, 163-170, 1983.
SCHRAUDOLF y REINERT: *Nature*, **184**, 465-466, 1959.
SCOWCROFT: In: *Hohn y Dennis*, 217-245, 1985.
SEELIGER: *Flora*, **148**, 218-254, 1959.
SEEMÜLLER y MERKLE: *Gartenbauwiss*, **49**, 227-230, 1984.
SEENI y GNANAM: *Can. J. Bot.*, **59**, 1.941-1.943, 1981.
SEIBERT: *Science*, **191**, 1.178-1.179, 1976.
SEIBERT *et al.*: *Plant Physiol.*, **56**, 130-139, 1975.
SEMAL: *Somaclonal variations and crop improvement*. M. Nijhoff, Dordrecht, 1-277, 1986.
SEN y GILES: *Plant cell culture in crop improvement*. Plenum Press, Nueva York, 1-502, 1983.
SHARP *et al.*: *Plant cell and tissue culture. Principles and applications*. Ohio State Univ. Press, Columbus, 1-892, 1979.
—: *Proc. 5th Int. Congr. Plant. Tissue Cell Culture*, **5**, 759-762, 1982.
—: *Handbook of plant cell culture. Vol. 2. Crop species*. MacMillan Publ. Comp., Nueva York, 1-644, 1984.
SHEPARD *et al.*: *Science*, 208, 17-24, 1980.
SHIGEMATSU: *Jap. Soc. Hort. Sci. Symposium*, 302-303 y 348-349, 1974.
SHIGEMATSU y MATSUBARA: *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, **41**, 196-200, 1972.
SHIGENOBY y SAKAMOTO: *Jap. J. Genet.*, **56**, 505-517, 1981.
SHILLITO *et al.*: *Plant Cell Rep.*, **2**, 244, 1983.
—: *Newsletter I.A.P.T.C.*, **48**, 5-15, 1986.
SHORT y ROBERTS: *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.*, **6**, 432, 1986.
SIDEROV *et al.*: *Nature*, **294**, 87-88, 1981.
SILVOY *et al.*: *Soybean Genet. Newslett.*, **11**, 80-82, 1984.
SINGH: *Am. Orchid Soc. Bull.*, **50**, 416-418, 1981.
SINGH y PRAKASH: *Scientia Hort.*, **24**, 385-390, 1984.
SKENE y BARLASS: *Z. Pflanzenzücht*, **90**, 130-135, 1983.
—: *J. Exp. Bot.*, **34**, 1.271-1.280, 1983a.
SKIRM: *J. Hered.*, **33**, 211-215, 1942.
SKIRVIN *et al.*: *Plant Cell Rep.*, **5**, 292-294, 1986.
SKOOG: *Am. J. Bot.*, **31**, 19-24, 1944.
SKOOG y MILLER: *Symp. Soc. Exp. Biol.* nº 11, *The biological action of growth substances*, 118-131, 1957.
SKOOG y TSUI: *Am. J. Bot.*, **35**, 782-787, 1948.

SLADKY y HAVEL: *Biol. Plant.*, **18**, 469-472, 1976.
SLUIS y WALKER: *Newsletter I.A.P.T.C.*, **47**, 2-12, 1985.
SMAAL: *Vakbl. Bloem.*, **35(46)**, 46-47, 49, 1980.
SMITH: *Plant Propagator*, **21**, 14, 1975.
—: In: *Bajaj*, 274-291, 1986.
SNEEP: *Plantenveredeling een vak apart. Rede Landbouwhogeschool*, Wageningen, 1-22, 1982.
—: In: *Linskens et al.*, 76-96, 1983.
SNIR y EREZ: *Hort. Sci.*, **15**, 597-598, 1980.
SOEDE: *Vakbl. Bloem.*, **34(19)**, 30-31, 1979.
SREE RAMULU *et. al.*: In: *Anonymous*, 77-82, 1986.
STABA: In: *Reinert and Bajaj.*, 694-702, 1977.
—: *Plant tissue culture of biochemicals.* CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-285, 1980.
—: *J. Natural Products*, **48**, 203-209, 1985.
STADEN. VAN y DREWIS: *Physiol. Plant.*, **34**, 106-109, 1975.
STARITSKY y HASSELT. VAN: *Proc. 9th Int. Scient. Colloq. Coffee*, **2**, 597-602, 1980.
STARITSKY *et al.*: *Acta Bot. Neerl.*, 35, 491, 1983.
STEFFEN *et al.*: *Theor. Appl. Gen.*, **72**, 135-140, 1986.
STEHSEL y CAPLIN: *Life Sci.*, 8, 1.255-1.259, 1969.
STEWARD: *Am. J. Bot.*, 45, 709-713, 1958.
STEWARD *et al.*: *Science*, **143**, 20-27, 1964.
STEWART y MERWE. VAN DER: *Proc. 10th World Orchid Conf.* Durban, South Africa, 263-277, 1982.
STICHEL.: *Planta*, **53**, 293-317, 1959.
STIMART y ASCHER: *Scientia Hortic.*, **14**, 165-170, 1981.
STOHS: *Adv. Biochem. Engen.*, **16(1)**, 85-107, 1980.
STOLZ: *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **64**, 13-14, 1967.
—: *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **96**, 681-684, 1971.
STONE: *Ann. Appl. Biol.*, **52**, 199-209, 1963.
STOUTEMEYER y BRITT: *Am. J. Bot.*, **52**, 805-810, 1965.
—: *BioSci.*, 20, *914, 1970.*
STRAUB: *Vorträge Rhein.–Westf. Akad. Wiss.*, N **257**, 17-26, 1976.
STRAUS: *Am. J. Bot.*, **41**, 833-839, 1954.
STRAUSS y REISINGER: *Am. Orchid Soc. Bull.*, **45**, 722-723, 1976.
STREET: *Plant tissue and cell culture. Bot. Monogr. Vol. II.* Blackwell Scient. Publi., Londres, 1-503. Segunda edición en 1977, 1-540, 1973.
—: *Tissue culture and plant science 1974.* Acad. Press, Nueva York: 1-502, 1974.
—: In: *Sharp et al.*, 123-153, 1979.
STRINGHAM: *Plant Sci. Lett.*, 9, 115-119, 1977.
STRULLU *et. al.*: *Acad. Agric. France*, **70**, 1.331-1.337, 1984.
STYER: In: *Henke et al.*, 117-130, 1985.
STYER y CHIN: *Hortic. Rev.*, **5**, 221-277, 1983.
SUNDERLAND: In: *Street*, 161-190, 1973.
—: In: *Street*, 205-239, 1973a.
—: In: *Anonymous*, 65-86, 1978c.
—: In: *Ingram and Helgeson*, 33-40, 1980.
SUNDERLAND y DUNWELL: In: *Street*, 141-167, 1974.
SUTTER: *Ann. Bot.*, **55**, 321-329, 1985.
SUTTER y HUTZELL: *Scientia Hortic.*, **23**, 303-312, 1984.
SYONO: *Plant Cell Physiol.*, **6**, 371-392, 1965a.
—: *Plant Cell Physiol.*, **6**, 393-401, 1965b.
—: *Plant Cell Physiol.*, **6**, 403-419, 1965c.
TABATA: In: *Barz et al.*, 3-16, 1977.
TAKAYAMA y MISAWA: In: *Fujiwara*, 681-682, 1982.
TAKAYAMA *et al.*: *Int. Congr. Plant. Tissue Cell Culture Abstr.*, **6**, 449, 1986.
TAKEBE: *Newsl. I.A.P.T.C.*, **19**, 2-6, 1976.
TAKEBE *et al.*, *Naturwiss.*, **58**, 318-320, 1971.
TANAKA y SAKANISHI: *Am. Orchid Soc. Bull.*, **46**, 733-737, 1977.
—:*Bull. Univ. Osaka Prefecture*, **B 37**, 1-4, 1985.
TANGLEY: *Bioscience*, **36**, 414-420, 1986.
TATENO *et. al.*: In: *Fujiwara*, 787-788, 1982.
TEO: *Malayan Orchid Rev.*, **13**, 56-59, 1976-78.
TEOULE: *C.R. Acad. Sci. Paris*, **297**, 13-16, 1983.
THEILER: *Schweiz. Landwirtsch. Forschung*, **10**, 65-93, 1971.

THEILER: *Obstbau,* **6**, 97-103, 1981.
THEVENIN y DORE: *Ann. Amél. Plantes,* **26**, 655-674, 1976.
THOMALE: *Die Orchideen.* Ulmer. Stuttgart: 1-211, 1957.
THOMAS: *Plant Mol. Biol. Rep.,* **2**, 46-61, 1984.
THOMAS y DAVEY: *From single cells to plants.* Wykeman Publ., Londres, 1-172, 1975.
THOMAS y STREET: *Ann. Bot.,* **34**, 657-669, 1970.
THOMAS *et al.: Z. Pflanzenzücht.,* **82**, 1-30, 1979.
THORPE: *Frontiers of plant tissue culture 1978. Proc. 4th Int.* Congress Plant Tissue Cell Culture. Calgary, Canada, 1-556, 1978.
THORPE: *Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture.* Acad. Press, Nueva York, 1-379, 1981.
TISSERAT y VANDERCOOK: *Plant Cell Tissue Organ Culture,* **5**, 107-117, 1985.
—: *Am. Orchid Soc. Bull.,* **55**, 35-42, 1986.
TISSERAT *et al.: Hort. Rev.,* **1**, 1-78, 1979.
TOLEDO *et al.: C.R. Acad. Sci.,* **D290**, 539-542, 1980.
TOPONI: *C.R. Acad. Sci.,* **257**, 3.030-3.033, 1963.
TRAMIER: *C.R. Séanc. Acad. Agric. France,* **51**, 918-922, 1965.
TREMBLAY *et al.:* In: *Bajaj,* 87-100, 1986.
TRIPATHI.: *Rev. Cytol. Biol. Vég.* **37**, 1-106, 1974.
TRUONG-ANDRE y DEMARLY: *Z. Pflanzenzücht.,* **92**, 309-320, 1984.
TUKEY: *J. Hered.,* 24, 7-12, 1933a.
—: *Bot. Gaz.,* **94**, 433-468, 1933b.
—: *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.,* **32**, 313-322, 1935.
TULECKE: *Science,* **117**, 599-600, 1953.
TURNER: *Australian Hortic.,* **81**, 95-99, 1983.

VACIN y WENT: *Bot. Gaz.,* **110**, 605-613, 1949.
VAJRABHAYA: In: *Arditti,* 179-201, 1977.
VAJRABHAYA y CHAICHAREON: *Abstr. 3rd Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture,* Leicester, 280, 1974.
VALMAYOR y SAGAWA: *Am. Orchid Soc. Bull.,* **36**, 766-769, 1967.
VARDI *et al.: Plant Sci. Lett.,* 4, 231-236, 1975.
VASIL: *Newsl. I.A.P.T.C.,* **26**, 2-10, 1978.
—: *Int. Rev. Cytol.,* **11a**, 1-253, 1980.
—: *Int. Rev. Cytol.,* **11b**, 1-257, 1980a.
—: *Cell culture and somatic cell genetics. Volume 1. Laboratory procedures and their applications.* Orlando, Florida, 1-825, 1984.
—: In: *Semal.,* 108-116, 1986.
VASIL y HILDEBRANDT: *Science,* **150**, 889-892, 1965.
VENKETESWARAN y PARTANEN: *Radiation Bot.,* **6**, 13-20, 1966.
VERHAGEN *et al.: Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.,* **6**, 58, 1986.
VERNA y COLLINS: *Theor. Appl. Genet.* **69**, 187-198, 1984.
VIENKEN *et al.: Physiol. Plant.,* **53**, 64-70, 1981.
VIJ *et al.: Bot. Gaz.,* **145**, 210-214, 1984.
VILAPLANA-MARSHALL y MULLINS: *Hort. Sci.,* **21**, 734, 1986.

WAES, VAN y DEBERGH: *Physiol. Plant.,* **66**, 435-442, 1986.
WALKEY: In: *Thorpe,* 245-254, 1978.
—: In: *Ingram and Helgeson,* 109-117, 1980.
WALKEY y COOPER: *Ann. Appl. Biol.,* **84**, 425-428, 1976.
WALKEY *et al.: J. Hort. Sci.,* **49**, 273-275, 1974.
WARD y VANCE: *J. Exp. Bot.,* **19**, 119-124, 1968.
WARDLE *et al.: J. Am. Soc. Hort. Sci.,* **108**, 386-389, 1983a.
WENZEL: In: *Rao et al.* 68-78, 1980.
—: *Acta Hort.,* **131**, 15-22, 1983.
WENZEL y FOROUGHI-WEHR: In: *Vasil,* 293-301, 1984.
WERSUHN y FRITZE: *Biochemie Physiol. Pflanzen,* **180**, 79-83, 1985.
WESTON y STREET: *Ann. Bot.,* **32**, 521-529, 1968.
WHITE: *Plant Physiol.,* **9**, 585-600, 1934.
—: *Phytopath.,* **24**, 1.003-1.011, 1934a.
—: *Am. J. Bot.,* **26**, 59-64, 1939.
WICKSON EN THIMANN: *Physiol. Plant.:* **11**, 62-74, 1958.
WIDHOLM: *Newsl. I.A.P.T.C.,* **23**, 2-6, 1978.

WIDHOLM: *Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture*, **5**, 609-612, 1982.
WILLIAMS: *New Zeal. J. Bot.*, **16**, 499-506, 1978.
WILLIAMS y LAUTOUR, DE: *Bot. Gaz.*, **141**, 252-257, 1980.
WILLIAMS y MAHESWARAN: *Ann. Bot.*, **57**, 443-462, 1986.
WILLIAMS *et al.*: *Hort. Sci.*, **20**, 1.052-1.053, 1985.
WIMBER: *Am. Orchid Soc. Bull.*, **32**, 105-107, 1963.
WINTON: *Science*, **160**, 1.234-1.235, 1968.
WITHERS: *Tissue culture storage for genetic conservation. Rep. Int. Board Plant Gen. Res.* FAO, Roma, 1-91, 1980.
—: In: *Vasil*, 101-136, 1980a.
—: *Institutes working on tissue culture for genetic conservation. Rep. Int. Board Plant Gen. Res.*, FAO, Roma, 1-104, 1982.
—: *Span*, **26**, 72-74, 1983.
—: In: *Withers and Alderson*, 261-276, 1986.
—: In: *Yeoman*, 96-140, 1986a.
WHITERS y ALDERSON: *Plant tissue culture and its agricultural applications.* Butterworth, Londres, 1-526, 1986.
WHITERS y STREET: In: *Barz et al.*, 226-244, 1977.
WITHNER: *The Orchids*, J. Wiley, Nueva York, 1-604, 1974.
WOLTERING: *Acta Bot. Neerl.*, **35**, 50, 1986.
WOOD: In: *Dixon*, 193-214, 1985.
WULLEMS *et al.*: In: *Fujiwara*, 505-506, 1982.
—: In: *Evans et al.*, 197-220, 1986.
WURM: *Flora*, **149**, 43-76, 1960.

YAMAGUCHI y NAKAJIMA: In: *Plant Growth Substances 1973*, Hirokawa Publ. Co., Tokío, Japón, 1.121-1.127, 1974.
YEOMAN: *Plant cell culture technology*. Blackwell Scient. Publ., Oxford, 1-375, 1986.
YEUNG *et al.*: In: *Thorpe*, 253-271, 1981.
YOSHIDA y OGAWA: *Techn. Bull. Food Fertilizer Techn. Center*, Taiwan, **73**, 1-20, 1983.
YOSHIDA *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **14**, 329-339, 1973.
YOUNG *et al.*: *Plant Sci. Lett.*, **34**, 203-210, 1981.
ZAENEN *et al.*: *J. Molec. Biol.*, **86**, 109-127, 1974.
ZAGAJA: *Hort. Res.*, **2**, 19-34, 1962.
ZENK: *Vorträge Rhein. Westf. Akad. Wiss.*, **N257**, 27-55, 1986.
ZENKTELER: *Acta Soc. Bot. Poloniae*, **40**, 305-313, 1971.
—: In: *Vasil*, 137-156, 180a.
ZENKTHELER y STRAUB: *Z. Pflanzenzüucht.*, **82**, 36-44, 1979.
ZIEBUR y BRINK: *Am. J. BVot.*, 38, 253-256, 1951.
ZIMMER *et al.*: *Deut. Gartenbau*, 36, 1.195-1.197, 1981.
ZIMMERMAN: *Biochim. Biolhys. Acta*, **694**, 227-277, 1982.
—: In: *Henke et al.*, 165-177, 1985.
ZIMMERMAN *et al.*: *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops.* M. Nijhoff, Dordrecht, 1-371, 1986.
ZIV: In: *Withers and Alderson*, 187-196, 1986.
ZIV y HALEVY: *Hort. Sci.*, 18, 434-436, 1983.

* La serie en tres volúmenes, que indicamos a continuación, apareció cuando el manuscrito de este libro estaba en prensa.

BONGA y DURZAN: *Cell and Tissue Culturee in Forestry*, 1987.
Vol. 1: General Principles and Biotechnology, 1-422.
Vol. 2: Specific Principles and Methods: Growth and Developments, 1-447.
Vol. 3: Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms, 1-416.
Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Países Bajos.

29
RECONOCIMIENTOS

El autor y los editores desean agradecer el permiso recibido para publicar las siguientes ilustraciones:

Fig. 2.5	Vakblad Bloemisterij	Misset, Doetinchem
Fig. 3.1	Landbouwkundig Tijdschrift	Koninklijk Genootschap voor Landbouwwetenschap
Fig. 4.1	Vakblad Bloemisterij	Misset, Doetinchem
Fig. 6.9	Vakblad Bloemisterij	Misset, Doetinchem
Fig. 6.11	Zeitschrift Pflanzenphysiologie	G. Fischer Verlag, Stuttgart
Fig. 6.14	Landbouwkundig Tijdschrift	Koninklijk Genootschap voor Landbouwwetenschap
Fig. 12.3	Netherlands Journal Agricultural Science	Koninklijk Genootschap voor Landbouwwetenschap
Fig. 13.3	Netherlands Journal Agricultural Science	Koninklijk Genootschap voor Landbouwwetenschap
Fig. 13.6	Zeitschrift Pflanzenphysiologie	G. Fischer Verlag, Stuttgart
Fig. 16.3	Proc. Am. Soc. Hort. Sci. L. Nickell	American Society of Horticultural Science Arkansas, EEUU
Fig. 18.1	Révue Géneral Botanique	Editions Belin, Paris
Fig. 18.2	Révue Géneral Botanique	Editions Belin, Paris
Fig. 18.3	Landbouwkundig Tijdschrift	Koninklijk Genootschap voor Landbouwwetenschap
Fig. 18.4	American Orchid Society Bulletin	American Orchid Society
Fig. 19.1	Landbouwkundig Tijdschrift	Koninklijk Genootschap voor Landbouwwetenschap
Fig. 19.2	Landbouwkundig Tijdschrift	Koninklijk Genootschap voor Landbouwwetenschap
Fig. 19.5	Proc. 18th Intern. Hort. Congr.	International Society for Horticultural Science
Fig. 20.1	Acta Horticulturae	International Society for Horticultural Science
Fig. 20.3	Acta Horticulturae	International Society for Horticultural Science
Fig. 24.3	Euphytica	Hoofdredacteur Euphytica, Wageningen

Fig. 24.8	:	Canadian J. Genet. Cytology	The Genetic Society of Canada
Fig. 24.9	:	Vakblad Bloemisterij	O.L. Gamborg Fort Collins, EEUU
Fig. 25.2	:	Vakblad Bloemisterij	Misset, Doetinchem
Fig. 25.4	:	Planta Medica	Misset, Doetinchem
Fig. 25.7	:	Groente en Fruit	Hippocrates Verlag, Stuttgart
			Hoofdredacteur Groente en Fruit, Den Haag

Primera edición holandesa de este libro (1975) Thieme, Zutphen
Segunda edición holandesa de este libro (1985) RLM Pierik, Wageningen.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
POTENTIOR EST
OMNIUM
SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

SIB - UCE

FECHA DE DEVOLUCIÓN		

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
OMNIUM POTENTIOR EST SAPIENTIA
FUNDADA EN 1620
QUITO

R
631.532
P616

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FUNDADA EN 1620
QUITO

ESTE LIBRO ES PROPIEDAD DEL SIB-UCE

SU VENTA ESTÁ PENADA POR LA LEY

Esta obra tiene como destinatarios a los profesionales o estudiantes universitarios, que quieran iniciarse en este tema de evidente futuro, o también a las personas que trabajando de forma habitual en un laboratorio de cultivo de tejidos necesitan disponer de un manual bien provisto de datos, en el que consultar las numerosas cuestiones prácticas que surgen cada día. En sus páginas encontrará el lector indicaciones sobre aspectos tan sencillos como seleccionar el equipo de laboratorio, preparación de medios nutritivos, esterilización del material vegetal, etc., hasta los fundamentos teóricos de la manipulación genética. Se trata de un texto escrito desde una gran experiencia, con un lenguaje directo y conciso, que cumple su objetivo de dar mucha información con la máxima claridad. Esta obra contiene más de 900 citas bibliográficas, de trabajos específicos muy actuales, que servirán para introducirse en aspectos concretos a todo aquel que lo desee. También contiene una excelente colección de fotografías e ilustraciones aclaratorias. La presente edición castellana ofrece también un anejo de gran utilidad en el que se detallan los nombres de las instituciones y laboratorios españoles en los que se hace cultivo in vitro de vegetales.

El traductor, Luis Ayerbe Mateo-Sagasta, es Doctor Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Madrid, Profesor Titular excedente de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid, y actualmente investigador coordinador del Area de Agronomía, del Centro de Investigación y Tecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.

9 788471 142672

ISBN 84-7114-267-8

1284