UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Micropropagación

(Manual de prácticas)

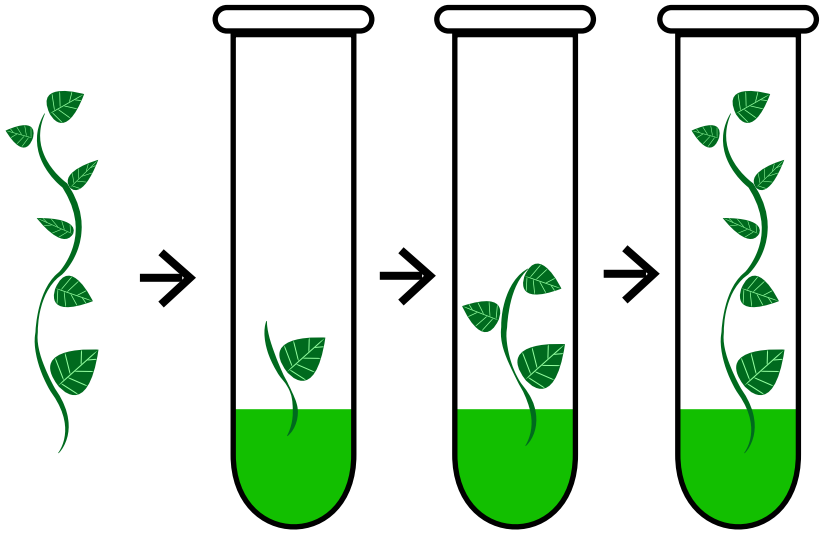
UNAM
CUAUTITLÁN

Ediciones FESC

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Micropropagación
(Manual de prácticas)



Ingeniería Agrícola

M. C. Francisco Cruz Pizarro

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
SECCIÓN DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

Micropropagación
(Manual de prácticas)

Asignatura: Micropropagación
Clave: 1818

Carrera: Ingeniería Agrícola
Clave: 11825

Autores:
M. C. Francisco Cruz Pizarro

Revisión: 25 de Marzo 2012

Índice

pág.

Introducción..... 4

Objetivo general de la asignatura..... 5

Objetivo del curso experimental..... 5

Vinculación teoría-práctica..... 5

Reglamento interno de los laboratorios del departamento de Ciencias Agrícolas 6

PRÁCTICA 1. Elaboración de medio de cultivo y desarrollo de explantes doble fase 10

PRÁCTICA 2. Extracción y cultivo in vitro de meristemos y ápices de tallo 15

PRÁCTICA 3. Rescate in vitro de embriones asexuales de cítricos 19

PRÁCTICA 4. Enraizamiento de explantes bajo condiciones in vitro y ex vitro 23

PRÁCTICA 5. Aclimatación de plantas obtenidas in vitro y transferencia a suelo 27

Anexo práctica 5. Características físicas de algunos sustratos y mezclas que se utilizan en la aclimatación de vitroplantas 31

Introducción

La micropropagación es una de las aplicaciones de mayor impacto dentro del cultivo de tejidos vegetales y se define como la multiplicación asexual, basada en la totipotencia vegetal, realizada en condiciones in vitro.

La obtención de plantas mediante micropropagación involucra una serie de etapas o fases que abarcan desde los procedimientos previos al establecimiento de los cultivos en forma aséptica, los que se encargan de la selección y manejo de la planta madre, el establecimiento mismo, la proliferación o multiplicación a través de subcultivos periódicos, el enraizamiento, que puede realizar in vitro o ex vitro (fuera del tubo de cultivo), hasta la aclimatación del material obtenido y su trasplante a condiciones de campo.

La aplicación de la técnica de micropropagación se enfrenta a una serie de limitantes que dificultan la realización de algunas de sus fases o etapas. Entre éstas sobresale el enraizamiento, ya que algunas especies no presentan una respuesta consistente a la aplicación de hormonas que lo estimulan, y la aclimatación del material. La aclimatación involucra aspectos relativos a la anatomía, fisiología y prácticas de manejo del material, que deben conocerse para aplicar procedimientos que permitan aclimatar el material vegetal y lograr su supervivencia, lo que constituye uno de los factores más limitantes de esta técnica.

Este manual tiene como objetivo brindar información que ha sido recopilada e integrada, relativa al conocimiento y desarrollo de protocolos de micropropagación de diversas especies.

La asignatura de Micropropagación se imparte en la carrera de Ingeniería Agrícola y forma parte del paquete terminal en Biotecnología.

Objetivo general de la asignatura

Ofrecer una visión general sobre la micropropagación y su importancia económica en México, sus métodos, aplicaciones y problemática actual, así como las ventajas de la biotecnología, sus beneficios y consecuencias socioeconómicas.

Objetivo del curso experimental

Que el alumno se familiarice con las fases o etapas que componen la micropropagación de diversas especies de interés, agrícola, forestal y ornamental. Identificar los aspectos relacionados con las limitantes a superar durante el desarrollo de esta técnica, desde el establecimiento hasta la aclimatación del material.

Vinculación Teoría-Práctica

Número de práctica	Título de la práctica	Número y nombre de la unidad temática en el programa de la asignatura
1	Elaboración de medio de cultivo y desarrollo de explantes en doble fase	II.Generalidades y factores limitantes de la micropropagación
2	Extracción y cultivo *in vitro* de meristemos y ápices de tallo	II. Generalidades y factores limitantes de la micropropagación
3	Rescate *in vitro* de embriones asexuales de cítricos	II. Generalidades y factores limitantes de la micropropagación
4	Enraizamiento de explantes bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*	II. Generalidades y factores limitantes de la micropropagación III. Aclimatación de plantas micropropagadas
5	Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* y transferencia a suelo Anexo de la práctica 5. Características físicas de algunos sustratos y mezclas utilizadas para el enraizamiento *ex vitro* y aclimatación de plantas obtenidas *in vitro*	III. Aclimatación de plantas micropropagadas

Reglamento de Laboratorio

Para el Laboratorio de Micropropagación se aplicará el reglamento general de los laboratorios de enseñanza experimental del departamento de Ciencias Agrícolas.

REGLAMENTO INTERNO DE LABORATORIOS DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAPÍTULO PRIMERO. DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 1. El presente reglamento tiene por objeto establecer las normas relativas a la organización y funcionamiento de los laboratorios pertenecientes al Departamento de Ciencias Agrícolas.

Artículo 2. Para los efectos del presente reglamento, se entenderá por usuarios:

I. Los alumnos de la carrera de Ingeniería Agrícola que oficialmente se encuentren inscritos y cursando alguna asignatura que requiera la realización de prácticas en los laboratorios, algún trabajo de investigación o servicio social.
II. Los académicos de la facultad que estén impartiendo alguna de las asignaturas adscritas a alguno de los laboratorios o que requieran el uso de ese espacio, previa autorización del responsable del laboratorio.
III. Los estudiantes que hayan concluido con sus estudios y que se encuentren desarrollando alguna de las opciones señaladas en el Reglamento de Evaluaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán para obtener su titulación, previa solicitud al responsable del área en la que se esté desarrollando la opción por titulación y que demuestre que necesita el laboratorio para su trabajo.
IV. Personal administrativo adscrito al laboratorio.

Artículo 3. Las disposiciones de este reglamento son de orden general y se aplicarán sin perjuicio de las particularidades que cada laboratorio tenga, de acuerdo a las actividades propias de cada asignatura práctica que se imparta en ellos.

CAPÍTULO SEGUNDO. DE LA ESTRUCTURA

Artículo 4. La administración, vigilancia y operación de equipo especializado depende directamente del departamento de Ciencias Agrícolas a través del responsable del laboratorio, quien se auxiliará del personal administrativo adscrito al laboratorio para ejercer sus funciones.

Artículo 5. El responsable de laboratorio tiene como funciones las siguientes:

I. Dirigir el laboratorio de acuerdo a su reglamento.
II. Velar por el buen funcionamiento del equipo a su cargo.
III. Coordinar las actividades académicas del laboratorio.
IV. Coordinar las actividades del laboratorista y del auxiliar de laboratorio.
V. Otras funciones que le sean asignadas por el jefe del departamento de Ciencias Agrícolas.

Artículo 6. Las funciones del jefe de laboratorio son las siguientes:

I. Supervisar y controlar el funcionamiento del laboratorio.
II. Elaborar y presentar informes periódicos del laboratorio.
III. Realizar todas aquellas actividades inherentes al puesto que apruebe la comisión mixta de tabuladores.

Artículo 7. Son funciones del laboratorista:

I. Mantener el material y equipo en condiciones de higiene y limpieza.
II. Llevar el inventario de material, equipo y reactivos del laboratorio, reportando al responsable de laboratorio cualquier inexistencia.
III. Reportar fallas en equipo y en el suministro eléctrico, de agua, gas y vacío.
IV. Suministrar el material a los usuarios del laboratorio.
V. Cumplir el horario que se le asigne para atender las necesidades que se tengan en el laboratorio.
VI. Realizar todas aquellas actividades inherentes al puesto que apruebe la comisión mixta de tabuladores.

Artículo 8. Son funciones del auxiliar de laboratorio:

I. Asear, lavar, esterilizar, secar y guardar el material, instrumental, equipo y mobiliario.
II. Apoyar en el levantamiento del inventario del laboratorio.
III. Proporcionar, recuperar y controlar el material, substancias, equipo e instrumental del laboratorio, reportando faltantes, desperfectos y anomalías al responsable del laboratorio.
IV. Asear, lavar y mantener ordenada el área del laboratorio.
V. Trasladar mobiliario y equipo de laboratorio, instrumental y substancias a los lugares que le sean indicados.
VI. Realizar todas aquellas actividades inherentes al puesto que apruebe la comisión mixta de tabuladores.

CAPÍTULO TERCERO. DE LAS RESTRICCIONES

Artículo 9. Dentro de los laboratorios queda prohibido:

I. Ingresar y consumir cualquier tipo de alimento o bebida.
II. Fumar.
III. Usar teléfono celular o localizador.
IV. Cometer desorden, bullicio o cualquier acto de indisciplina que vaya en contra de la Legislación Universitaria.
V. Realizar acciones que pongan en peligro la integridad física de los demás usuarios del laboratorio.
VI. Utilizar y manipular cualquier instrumento, equipo o reactivo sin autorización del profesor responsable de la práctica o del responsable del laboratorio.
VII. El ingreso de toda persona ajena que interfiera con el desarrollo de las actividades que se realizan en estos.
VIII. Almacenar cualquier material ajeno a las labores propias del laboratorio.

Artículo 10. Se deberá respetar el horario asignado para el desarrollo de cada práctica. Los usuarios que estén desarrollando trabajos de investigación, servicio social u otros, no podrán realizar trabajos durante el horario asignado a las prácticas de las materias que se impartan en alguno de los laboratorios.

CAPÍTULO CUARTO. DEL USO Y LOS USUARIOS DEL LABORATORIO

Artículo 11. Todos los usuarios de los laboratorios tienen los mismos derechos y obligaciones.

Artículo 12. El usuario tiene la obligación de conocer las normas del presente reglamento para ejercer sus derechos y cumplir con las obligaciones y responsabilidades derivadas del uso del laboratorio.

Artículo 13. Los usuarios del laboratorio tendrán derecho a utilizar el material y equipo necesario para la realización de sus prácticas curriculares.

Artículo 14. Los usuarios tienen el derecho de ser atendidos con eficiencia para el desarrollo de las prácticas programadas.

Artículo 15. Los profesores que tengan programado realizar prácticas de laboratorio deberán elaborar una lista de los requerimientos al inicio del semestre para que el responsable o laboratorista proporcione el material solicitado en tiempo y forma.

Artículo 16. Para el uso de los equipos de laboratorio debe revisarse el manual de uso de cada equipo y registrar el tiempo de uso.

Artículo 17. Para utilizar el equipo de laboratorio el usuario debe llenar el formato correspondiente y dejar credencial de la universidad. El formato deberá ser autorizado por el responsable de la práctica o responsable del laboratorio y quedará como garantía en caso de deterioro o descompostura del equipo.

Artículo 18. El material y equipo deben entregarse a los laboratoristas en las mismas condiciones en que fueron recibidos. En caso de que el manual de operación del equipo que se utilizará indique algún procedimiento previo, éste deberá realizarse.

Artículo 19. El usuario conservará y mantendrá el orden y limpieza de las instalaciones y equipo del laboratorio.

Artículo 20. El usuario deberá reportar inmediatamente cualquier falla del equipo ante el profesor titular del grupo, responsable del laboratorio o laboratorista, para deslindar responsabilidades.

Artículo 21. Está prohibido que los alumnos pasen al interior de los anexos.

Artículo 22. Cuando el manual de prácticas lo indique, los usuarios deberán usar bata, lentes de protección, guantes, o ropa especial.

Artículo 23. El tiempo de tolerancia para llegar y entrar al laboratorio será fijado por el responsable de la práctica.

Artículo 24. Al término de la práctica el usuario debe cerciorarse que las llaves de gas, vacío y agua queden

cerradas, y que el equipo eléctrico quede desconectado.

Artículo 25. Los residuos generados durante la realización del trabajo experimental deben ser manejados de acuerdo con el procedimiento específico indicado para el desarrollo de la enseñanza experimental de los laboratorios de Ciencias Agrícolas en el nivel licenciatura.

Artículo 26. En caso de accidente, se debe avisar inmediatamente al profesor o a los laboratoristas.

CAPÍTULO QUINTO. DE LAS SANCIONES

Artículo 27. Toda persona ajena que ingrese sin la autorización correspondiente se hará responsable de los daños ocasionados a los experimentos o prácticas que se realizan, y se fincará responsabilidad de acuerdo con la legislación universitaria vigente.

Artículo 28. El usuario deberá reponer el material consumible que haya extraviado o deteriorado.

Artículo 29. Cualquier uso indebido del laboratorio, equipo u otros recursos dará lugar, según la gravedad y circunstancias del caso, a cualquiera de las sanciones que aplican en la legislación universitaria.

ARTÍCULOS TRANSITORIOS

Todo lo no previsto en el presente reglamento será turnado al H. Consejo Técnico de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán para ser solucionado.

PRÁCTICA 1

ELABORACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO Y DESARROLLO DE EXPLANTES EN DOBLE FASE

Introducción

En la propagación de especies vegetales actualmente se recurre cada vez más a la biotecnología con el fin de mejorar las técnicas de producción y solucionar problemas en los procesos existentes. Por ejemplo, para muchas especies vegetales los sistemas de propagación tradicional no satisfacen la demanda de estos cultivos, y para algunas especies endémicas y/o en peligro de extinción la propagación in vitro puede ser una vía alterna para su rescate y conservación.

Aunque la biotecnología aún no cumple con todas las expectativas, para algunos cultivos recalcitrantes se continúa con la búsqueda de técnicas que permitan lograr mayor número de plantas sanas y con capacidad de desarrollarse en condiciones de campo.

La micropropagación ha contribuido a hacer eficiente este proceso al lograr mayor número de plantas con menos costos. Por esto, en los últimos años se ha trabajado en el ámbito mundial en la automatización de la micropropagación, ya sea de forma completa o parcial. Los países menos desarrollados deben buscar alternativas que sean sustentables y eficientes para dar el gran salto en la propagación in vitro de especies vegetales de interés agrícola y económico, así como en la conservación de la biodiversidad.

En el esquema de micropropagación en doble fase y una vez que los explantes están establecidos, a los explantes en forma aséptica, en medio sólido y que se encuentran en etapa de multiplicación se les incorpora medio líquido fresco sobre el cultivo en desarrollo para incrementar la tasa de multiplicación. Al agregar al cultivo ya establecido medio líquido de multiplicación, se consigue ahorro de tiempo y dinero.

En algunas especies a las que se ha aplicado este procedimiento, se ha observado una respuesta satisfactoria.

Objetivo

Que el estudiante aprenda a manejar la proliferación in vitro mediante el esquema de doble fase.

Actividades previas a la práctica

Tener en desarrollo explantes en proliferación en medio sólido. Preparar medio de cultivo líquido, utilizando todos los componentes excepto el agar.

Establecer los explantes en etapa de proliferación o multiplicación en medio sólido. Para preparar este medio de cultivo generalmente se elaboran soluciones madre o concentradas, y a partir de su dilución o extracción de alícuotas se establecen los medios de cultivo.

Después de un periodo de tres a cuatro semanas se adiciona un medio fresco de consistencia líquida que debe estar constituido por los siguientes componentes:

I. Sales inorgánicas:

a) Macronutrimentos
b) Micronutrimentos

II. V itaminas
III. Hormonas del desarrollo vegetal
IV. Aminoácidos
V. Carbohidratos
VI. Agua
VII. Agentes gelificantes o solidificantes

Realizar la dilución de la sacarosa por separado con ayuda de espátulas, agitación y calentamiento en horno de microondas. Debe tenerse mucho cuidado con el hervor.

Utilizando un potenciómetro, ajustar el pH a 5.7 ± 0.1. Este ajuste es particularmente importante ya que afecta el tejido. La consistencia del medio cambia de acuerdo con el pH: a un pH menor de 4.8 el gel pierde firmeza y se vuelve blando, y a un pH mayor de 6.0 el gel se endurece. El pH se ajusta con NaOH o HCl 0.1 N.

Depositar el medio en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, sellarlo y dejar reposar en un lugar fresco y seco una semana antes de la práctica.

Una vez llenado y tapado el matraz se esteriliza en autoclave a una temperatura de 120 ºC (20 lb.in2) durante 30 minutos. Verificar que el nivel de agua sea el adecuado para operar la autoclave en condiciones óptimas de seguridad.

Material

Frascos gerber con medio de cultivo de consistencia sólida
Explantes en etapa de proliferación (cactáceas, piña u otras)
Pipetas estériles de 10 ml
Campana de aire de flujo laminar horizontal limpia y funcional
Medio de cultivo de consistencia líquida fresco y estéril

Procedimiento experimental

Esquema de doble fase

Una vez establecido el cultivo en medio sólido y estando en la etapa de proliferación o multiplicación, para establecer el esquema de doble fase se elabora un medio de cultivo fresco de consistencia líquida. Para elaborarlo se utilizan los mismos componentes del medio sólido, a excepción del agar que es el agente gelificante. Adicionar el medio líquido con ayuda de una pipeta de 10 ml previamente esterilizada. Para destapar los contenedores donde están los explantes en proliferación y adicionar el medio líquido se debe utilizar la campana de aire de flujo laminar horizontal. Para realizar comparaciones posteriores deben conservarse algunos cultivos en medio sólido como testigos.

Instrucciones para la entrega del reporte

- Considerar número y longitud de los brotes para realizar una comparación entre los cultivos a los que se les adicionó el medio líquido y los que permanecieron intactos.
- La evaluación y comparación debe realizarse de cuatro a cinco semanas después de adicionar el nuevo medio.
- Realizar gráficas y presentar fotografías de los cultivos antes y después de la adición del medio líquido.

El esquema general para el reporte de las prácticas debe contener los siguientes apartados:

I. Título
II. Introducción
III. Objetivos
IV. Revisión de la literatura
V. Material y método
VI. Resultados
VII. Discusión
VIII. Conclusiones
IX. Bibliografía

- Utilizar letra arial de 12 puntos con interlineado 1.5. Para la introducción y revisión de la literatura se recomienda buscar contenido distinto al que se encuentra en el manual de prácticas entregado por el profesor.
- Los nombres científicos deben escribirse con letra cursiva.
- En caso de que se haya presentado alguna modificación en lo relativo a material y método, deberá indicarse en el reporte. Por ejemplo, tiempo de inmersión, agente esterilizante, especie utilizada, etc.
- Para presentar los resultados utilizar tablas, gráficas, esquemas, o fotografías que permitan mostrar claramente los resultados obtenidos.
- Antes de entregar el reporte de la práctica en forma impresa se puede enviar por vía electrónica para revisión. Una vez realizadas las correcciones entregar en formato impreso.
- En el Laboratorio de Micropropagación se maneja un modelo de prácticas secuenciadas, es decir, que no concluyen en una sola sesión. Considerando esto y el tiempo de respuesta del material vegetal utilizado, las fechas de entrega de los reportes serán fijadas por el profesor. Éstas son

improrrogables y fuera de la fecha indicada no se recibirá ninguna práctica.

Para la bibliografía presentar las citas en sangría francesa o de primera línea, utilizando el formato de la APA que consiste en:

Artículo
Apellidos, A. A., Apellidos, B. B. & Apellidos, C. C. (Año). Título del artículo. Título de la publicación, volumen (número), pp. xx-xx.

Libro
Apellidos, A. A. (Año). Título del libro. Ciudad: Editorial.

Capítulo de libro
Apellidos, A. A. & Apellidos, B. B. (Año). Título del capítulo. En Apellidos, A. A. (Ed.), Título del libro (pp. xx-xx). Ciudad: Editorial.

Bibliografía

Augé, R., Beachesne, G., Bocón-Gibod et Vitalie H. 1990. La culture in vitroetses applications horticoles. Ed. J.B: Bailliere. Paris pp. 41-46.

Cruz-Pizarro, F. 1983. Propagación in vitro de manzano (Malus pumilla Mill) Tesis Prof. Ingeniería Agrícola FES-C. UNAM. 68 p.

Cruz-Pizarro, F. 2000. Niveles de sacarosa y relación NO3- : NH4+ en el cultivo in vitro de vid (Vitis vinfera) 'Málaga Roja' Tesis Maestría en Ciencias, Colegio de Post-graduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de Méx. 78 p.

Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A. and Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. In vitro, 12: 473-478

López, P. C. 1990. Medios de Cultivo. En: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. Rosell, H. C. y Villalobos, A. V. Estudio FAO. Producción y protección vegetal. 105: 15-20.

Margara, J. 1990. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Ed. Mundiprensa pp. 178-193.

Mroginski, L., Sansberro, P. y Flaschland, E. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Edt. Echenique, V., Rubinstein C. y Mroginski, L. Buenos Aires, Argentina.. Ed. INTA pp. 35-42.

Rosales, M. E., Rodríguez, F. L., Alvarado, G. O y Cárdenas, C. M. 2003. Diseño y cons trucción de un sistema de inmersión temporal La Habana, Cuba. Centro Agrícola, 30 (1) enero-marzo, 2003 69-72

PRÁCTICA 2

EXTRACCIÓN Y CULTIVO IN VITRO DE MERISTEMOS Y ÁPICES DE TALLO

Introducción

El meristemo se define como un conjunto integrado e intercalado de células que sufre una serie de cambios durante la ontogenia de las plantas. Los meristemos están formados por células que retienen su actividad embrionaria durante toda la vida de las plantas. La formación de nuevas células, tejidos y órganos a partir de la actividad meristemática se relaciona con la división celular. Ciertas células de los meristemos se dividen de tal manera que una de las células resultantes de la división pasa a ser una nueva célula del cuerpo, mientras que la otra permanece en el meristemo. Las que permanecen en el meristemo se llaman iniciales y las que pasan a integrar el cuerpo son las derivadas, por lo que el término de meristemo apical se refiere al complejo de células compuestas por las iniciales y derivadas inmediatas.

Existen varios tipos de meristemos: primarios, secundarios e intercalares. El meristemo apical del tallo es el tejido más próximo al primordio foliar más joven del tallo. Tiene forma de cúpula diminuta de 0.1 a 0.5 mm de diámetro, cumple con funciones de autoperpetuación y generación de las células y órganos del tallo.
En la micropropagación el cultivo de meristemos es uno de los procedimientos de mayor uso, con el que se obtienen individuos genéticamente idénticos a la planta madre. Se utiliza para la obtención de plantas libres de patógenos y virus.

La mayoría de las plantas que se propagan de manera convencional mediante métodos sexuales y asexuales corren el riesgo de infectarse con microorganismos como virus, hongos, bacterias y micoplasmas, si se descuidan aspectos de orden fitosanitario. Las plantas infectadas desarrollan trastornos fisiológicos que afectan su calidad, longevidad, vigor y que principalmente disminuyen sus índices de producción.

En las plantas la distribución de los virus es irregular. En los puntos de crecimiento la concentración del virus disminuye ya que en la regiones apicales y meristemáticas hay una acelerada división mitótica celular y una elevada actividad metabólica. Los virus no pueden controlar su mecanismo biosintético dentro del hospedero, además en estos puntos de crecimiento el desarrollo del tejido vascular definido es limitado, lo que disminuye la libre trayectoria del virus, aunado a la alta concentración auxínica endógena que puede inhibir la replicación del virus.

Las técnicas de diagnóstico de patógenos en plantas que incluyen el uso de microinjertos, plantas indicadoras, microscopía electrónica y el empleo de marcadores moleculares, junto con herramientas del cultivo in vitro, permiten cumplir satisfactoriamente los programas de diagnóstico, certificación y producción de plantas libres de patógenos a nivel comercial.

Objetivo

Que el alumno desarrolle habilidades y capacidades en la disección y extracción de meristemos y ápices de vástagos de diversas especies, y que pueda comprobar la influencia de diversos constituyentes del medio de cultivo en la regeneración de brotes in vitro.

Actividades previas a la práctica

Realizar la colecta de esquejes de plantas de crisantemo que crezcan en invernadero, se presentarán imágenes de meristemos capturadas en microscopio estereoscópico.

Material

Varetas de diversas especies vegetales
Bisturíes de mango largo y corto
Navajas de bisturí número 11 y 22
Pinzas largas de disección
Microscopio estereoscópico
Cajas de Petri estériles
Tubos de ensaye con medio de cultivo fresco y estéril
Alcohol etílico al 70% en frascos de boca ancha
Lámpara de alcohol
Gradillas para tubo de ensaye

Procedimiento experimental

Utilizar esquejes de plantas como el crisantemo (Dendranthema hortorum Tzvelev), las cuales deben estar creciendo en condiciones de invernadero de tipo vegetativo. También se pueden utilizar brotes de consistencia herbácea de vid, manzano o ciruelo provenientes de un huerto de alta densidad. Utilizar como explantes meristemos apicales y laterales, así como ápices.

Eliminar las hojas del material vegetal para someterlo al siguiente método de desinfestación:

1.- Lavar el material vegetal en un vaso de precipitado con solución jabonosa y cuatro gotas de tween-20 durante 10 minutos.
2.- Enjuagar y pasar a una solución de alcohol etílico (un minuto para crisantemo y de dos a tres minutos para las especies frutales).
3.- Sin enjuagar pasar a una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex® en dilución comercial) al 20% durante 20 minutos para el crisantemo y de 25 a 30 minutos para las especies frutales.
4.- Dentro de la campana de aire de flujo laminar, bajo condiciones asépticas, enjuagar tres veces con agua destilada estéril. Desechar el agua de los enjuagues en otro recipiente.
5.- Con ayuda de un microscopio estereoscópico eliminar las hojas apicales, escamas o brácteas hasta localizar el meristemo con primordios de hojas, cuyo tamaño es menor de 0.5 mm. El meristemo se puede extraer con ayuda del bisturí largo de mango delgado con la punta de la navaja (número 11). Mantener el meristemo en la punta de la navaja para implantarlo en el medio de cultivo colocándolo verticalmente, sin

acostarlo o sumergirlo. El instrumental debe ser previamente esterilizado, sumergiéndolo en alcohol y poniéndolo en la flama de la lámpara de alcohol.
6.- Poner la tapa a los tubos y sellar con kleen pack o ega pack.
Cabe hacer mención que el desarrollo de esta práctica para la obtención de brotes es de 2 meses observacionales.
7.- Colocar los explantes sembrados en el cuarto de incubación.

Nota: para obtener resultados de los brotes cultivados en esta práctica deben transcurrir dos meses durante los cuales se realizarán observaciones de los cultivos.

Instrucciones para la elaboración del reporte

Evaluar las siguientes variables:

Contaminación
Sobrevivencia de explantes
Inducción de brotación
Inducción de callo
Niveles de oxidación-necrosamiento
Meristemos y ápices con y sin respuesta
Desarrollo de brotes

El tiempo para la formación de brotes a partir del establecimiento, si los cultivos no presentan contaminación, puede ser de hasta diez semanas.
Para presentar los resultados se sugiere utilizar gráficas de barras, fotografías de los cultivos, etc.

Bibliografía

Cruz-Pizarro, F. 1983. Propagación in vitro de manzano (Malus pumilla Mill) Tesis de Licenciatura. UNAM-FES-C Ingeniería Agrícola. Cuautitlán Izcalli Méx. 80 p.

Esau, K. 1982. Anatomía de las plantas con semilla. Edt. Hemisferio Sur Trad. P. Izagui rre de A. y A. M. Larguardia. pp. 8-11.

Margara, J-. 1990. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 51-58.

Navarro U. S. 1987 Cultivo de Meristemos. In Cultivo de tejidos vegetales por Hurta do M. D y Merino M. M compiladores. Ed. Limusa México pp. 133-148

Ochoa A. N. 1990. Establecimiento de cultivos in vitro. In: Fundamentos teóri co-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. Rosell, C. H y Villalobos A. V. EstudioFAO Producción y Protección vegetal 105: 25-29

Pierik, R. L.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 209-217.

Quak. F. Meristem culture and virus-free plants. En: Reinert, J and Bajaj Y. P. (edts) Plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlang. Germany pp. 598-615.

Rodríguez, O. J. 2007. Cultivo in vitro de meristemos y ápices de tallo de crisantemo (Dendranthema hortorum Tzvelev) En: Cultivo in vitro de células, tejidos y órganos vegetales-Manual de prácticas. U. A. Chapingo pp. 29-35.

Villalobos, M. V. y A. G. Velázquez. 1982. Plantas de clavel (Dianthus caryophyllus L.) libres de virus por cultivo in vitro de meristemos y ápices vegetativos. Agro-ciencia 48: 107-118

PRÁCTICA 3

RESCATE IN VITRO DE EMBRIONES ASEXUALES DE CÍTRICOS

Introducción

Otra aplicación del cultivo in vitro se encuentra en el mejoramiento genético de algunos cultivos, particularmente en durazno, trigo y cítricos. Algunas especies crecen en cultivares con un período corto de floración a maduración del fruto, por lo que generalmente los embriones no alcanzan a completar su desarrollo y permanecen inmaduros e incapaces de germinar por los métodos convencionales o tradicionales. Existen otros casos donde las cruzas no prosperan debido a problemas de incompatibilidad sexual, lo que impide que el embrión se forme o no alcance su madurez.

El rescate in vitro de embriones inmaduros es una técnica de cultivo de tejidos que permite rescatar y cultivar embriones cigóticos inmaduros de manera aséptica sobre un medio de cultivo. Una vez rescatados, los embriones cultivados in vitro pueden alcanzar su madurez y germinar hasta llegar a ser plantas completas gracias a la adición de reguladores o promotores de la germinación en el medio de cultivo y al control de luz y temperatura, condiciones ambientales básicas para su desarrollo.

Después de llevar a efecto la fertilización in vitro o ex vitro, el subsecuente aislamiento y establecimiento aséptico bajo condiciones estériles, los embriones inmaduros pueden presentar inhibición en su crecimiento, desarrollo y madurez. Sin embargo, este problema se puede solucionar para permitir su germinación y desarrollo normal. Cuando un embrión es cultivado in vitro es posible estudiar sus requerimientos nutrimentales para detectar los factores que regulan su desarrollo y madurez.

Una aplicación práctica del rescate de embriones y su cultivo in vitro es la obtención de híbridos de cruzas interespecíficas e intergenéricas que presentan problemas de incompatibilidad que afectan al embrión formado, en el que la formación del endospermo generalmente es incompleta o no alcanza la madurez para su posterior germinación.

En semillas poliembriónicas puede haber desarrollo de embriones sexuales y asexuales en una misma semilla, los embriones pueden presentar un desarrollo diferencial además de diferir de origen. En los cítricos se presenta el fenómeno de apomixis de tipo nucelar en semillas poliembriónicas. En este fenómeno se desarrolla un embrión cigótico que proviene de la fecundación de un óvulo con un grano de polen dentro del ovario de la flor, además se desarrollan embriones a partir de la nucela que es un tejido extracarpelar. Estos embriones son de naturaleza somática.

Objetivo

Que el alumno se familiarice con la técnica de cultivo de embriones sexuales y asexuales in vitro.
Determinar el efecto del medio y condiciones de luz y oscuridad en el crecimiento de los embriones.

Actividades previas a la práctica

Realizar una colecta de frutos de naranjo (Valencia, Washington navel), durazno y ciruelo. Los frutos deben estar limpios, sanos y enteros.

Material

Semillas de cítricos (mandarina, naranja, toronja)
Vasos de precipitados de 100 y 150 ml
Probeta de 100 ml
Pinza larga estéril
Bisturíes de mango corto y largo
Navajas para bisturí números 11 y 22
Cajas de Petri estériles
Tubos de ensaye con medio (MS 50% sin hormonas)
Cloro comercial (Cloralex®)
Acido ascórbico
Acido cítrico
Campana de aire de flujo laminar, limpia y funcional

Procedimiento experimental

Lavar los frutos con agua corriente y detergente. Extraer las semillas y exponerlas a una solución antioxidante (150 mg/l de ácido cítrico y 150 mg/l de ácido ascórbico) durante diez minutos. Posteriormente colocarlas en una solución de alcohol al 70% por tres minutos, enjuagarlas con agua destilada estéril y se colocarlas en Cloralex® comercial al 70% por diez minutos. Una vez que las semillas pasaron por el procedimiento anterior se colocan en la campana de aire de flujo laminar. Sobre una caja de Petri estéril previamente flameada, colocar una semilla y eliminar la testa con ayuda de un bisturí de punta fina número 11, con cuidado para no dañar el embrión o embriones. Aislar cada embrión con su par de cotiledones y colocarlos en los tubos que contienen medio de cultivo, procurando que queden en la superficie.

Sellar los tubos con película plástica kleen pack y etiquetarlos. Trasladarlos al cuarto de cultivo para que crezcan con una intensidad luminosa de 48 $\mu Mol.m^{-2}.seg^{-1}$, fotoperiodo de 16/8h luz/obscuridad y temperatura de 25º C ± 2.0.

Para embriones que requieren posmaduración como los frutales de clima templado (durazno y ciruelo) se considera la exposición al frío durante 200 horas (8 días aproximadamente). Esto se realiza introduciendo los tubos con el medio dentro de un refrigerador comercial. Posteriormente se trasladan al cuarto de cultivo.

Instrucciones para la elaboración del reporte

Se evaluarán las siguientes variables:

Presencia de contaminantes, hongos y bacterias
Necrosis (oxidación de embriones)
Sobrevivencia del explante
Respuesta a la formación de callos
Tiempo a la germinación: crecimiento del tallo o vástago y presencia de radícula

Se sugiere realizar gráficas de la longitud del vástago y raíz, y de la relación establecida entre ambos. Presentar gráficos y fotografías de los eventos morfogénicos en los embriones.

Bibliografía

Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. 1983. Haploid production, En: (Eds.) Plant Tissue culture. Elsevier. Science publishers B. V. Printed in USA pp. 113-142.

López, C. P. 1990. Cultivos de embriones y óvulos. En Rossell, C. H. y Villalobos A. V. (eds), Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO. Roma, Italia pp 49-54

Ortiz, J P A.; Pessino, S C y Quarin, C. L. 2004. Manipulación de la apomixis y su aplica ción en la agricultura. En (eds) Echenique V, Rubinstein, C y Mroginski L. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. INTA-Buenos Aires Argentina. pp 283-292.

Raghavan, V. 1980. Embryo culture In: Vasil, I K. (Ed.) Perspectives in plant cell and tissue culture.Academic Press. New York, pp. 207-237.

Ramming, D. V. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. HortScience 25 (4): 393-398.

PRÁCTICA 4

ENRAIZAMIENTO DE EXPLANTES BAJO CONDICIONES IN VITRO Y EX VITRO

Introducción

En la generación de plantas in vitro intervienen cuatro fases o etapas principales:

1. Establecimiento del cultivo.
2. Desarrollo y multiplicación de vástagos o brotes (proliferación).
3. Enraizamiento.
4. Aclimatación de las plántulas.

Generalmente las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones ex vitro. En algunos casos se considera una etapa previa (etapa "0"), que es la etapa de preparación y acondicionamiento de los explantes para el establecimiento.

El objetivo del enraizamiento es promover la inducción, iniciación y diferenciación radical en los explantes provenientes de la proliferación o multiplicación. El enraizamiento es la etapa que presenta más problemas para la aplicación de esta técnica a nivel comercial. Durante el enraizamiento se emplean procedimientos como reducir la concentración de sales minerales del medio a la mitad de su composición, aumentar la concentración de auxinas, eliminando las citocininas, disminuir la concentración de azúcares, disminuir la intensidad luminosa, adición de carbón activado, entre otros. Se ha identificado que las raíces producidas in vitro usualmente son delgadas y no forman raíces abundantes (tipo cabellera), y que pueden presentar callo en la base de los explantes, lo que conduce al establecimiento de conexiones vasculares interrumpidas entre raíces y vástagos.

El enraizamiento ex vitro se realiza fuera del tubo directamente en sustratos que contienen suelo, agrolita, vermiculita y peatmoss entre otros. Se ha encontrado que al utilizar esta técnica se ahorra tiempo y espacio, además se economiza en reactivos ya que, al mismo tiempo que se lleva a cabo el enraizamiento, también se logra la aclimatación del material vegetativo o explante. Además, se ha encontrado que las plantas enraizadas directamente al suelo presentan raíces de mayor consistencia y disminuye la incidencia de la formación de callo en la base del brote, lo que asegura una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la evapotranspiración acelerada durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por eso es importante contar con instalaciones como invernaderos y cámaras de nebulización que brinden la temperatura y humedad relativa necesarias para alcanzar la adaptación llamada "rusticación" o "endurecimiento" de la planta.

Objetivo

Que el alumno observe y se familiarice con las técnicas de enraizamiento in vitro y ex vitro, y que pueda identificar las diferencias entre ambas y cómo éstas afectan los resultados.

Actividades previas a la práctica

Adquirir brotes de diversas especies cultivados in vitro. Estos pueden proceder de prácticas anteriores o del material que se propaga regularmente en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y micropropagación de la FESC.

Conseguir el sustrato, con tierra o sin ella (inerte), previamente tamizado y esterilizado.

Material

Frascos gerber o tubos de ensaye con medio de cultivo y explantes en etapa de proliferación
Frascos gerber o tubos de ensaye con medio fresco y estéril para enraizamiento
Pinzas de disección
Bisturíes de mango corto y largo
Navajas de bisturí números 11 y 22
Sustrato (mezcla en diferentes proporciones de agrolita, vermiculita, germinaza, peatmoss, etc.) tamizado y estéril
Enraizador comercial (a partir de auxinas Radix, Raizone plus®)
Fungicidas (Benomyl®, Captan® al 1.5 % p/v diluido con agua destilada)

Procedimiento experimental

Enraizamiento in vitro

Dentro de la campana de aire de flujo laminar, transferir los explantes que se encuentran en etapa de multiplicación o proliferación a un medio al cual se le han eliminado las citocininas y aumentado las auxinas en proporciones de 0.0, 0.5 y 1.0 $mg.l^{-1}$. Individualizar los explantes colocando uno por tubo con ayuda de unas pinzas previamente flameadas, cuidando de no dañarlos. Sellar los tubos y colocarlos en el cuarto de incubación o de cultivo para observar el desarrollo del sistema radical.

Enraizamiento ex vitro o directo a suelo

Utilizar brotes establecidos y previamente expuestos a proliferación de cactáceas (Mammillaria sp. o Wilcoxia sp.), dracenas, violeta africana, papa, vid, entre otros.

Sacar los explantes del tubo de ensaye, individualizarlos y lavarlos con agua destilada para eliminar restos de agar. Sumergirlos en una solución de Benomyl® o Captan® (1.5 $g.l^{-1}$) para evitar que se desarrollen microorganismos.

En seguida impregnar la parte basal con Radix® 1500 y colocarla en un recipiente, puede ser un semillero de unicel, charola de plástico o unicel, vaso u otro, que contenga el sustrato previamente preparado y humedecido. Realizar una cavidad en el sustrato y, una vez introducido el sistema radical, compactar ligeramente alrededor del mismo con los dedos, evitando dejar espacios con aire. Cubrirlos recipientes utilizados con una bolsa de polietileno y colocarlos en el invernadero o cuarto de cultivo. Ir descubriendo gradualmente los recipientes y realizar perforaciones en la cubierta.

En el enraizamiento ex vitro hay que tener especial cuidado en mantener las condiciones óptimas relativas al régimen de humedad, ya que condiciones por debajo del óptimo provocan que el material vegetativo se marchite y un exceso de humedad favorece la proliferación de hongos.

Instrucciones para la elaboración de reporte

• Durante seis semanas, a partir de la realización de la práctica, se deberán tomar datos con intervalos semanales. Se evaluará el porcentaje de enraizamiento así como la calidad del enraizamiento (número y longitud de las raíces formadas).

• Se recomienda realizar observaciones de hojas, yemas y tallos en el microscopio estereoscópico.

• Realizar gráficas que muestren la relación entre el porcentaje de enraizamiento y el tiempo transcurrido. Para el enraizamiento ex vitro otra variable a considerar será la sobrevivencia de los explantes.

Bibliografía

Augé, G. R., Beauchesne, G. J., Boocon-Gibod L, Decurtye, B. et Vitalie H. 1990. La culture in vitro et ses applications horticoles. Ed. J. B. Baillere, Paris pp. 72-90

Cruz-Pizarro, F. 2000. Niveles de sacarosa y relación NO3- : NH4+ en el cultivo in vitro de vid (Vitis vinfera) 'Málaga Roja' Tesis Maestría en Ciencias, Colegio de Post-graduados, Montecillo, Texcoco, Edo. De Méx. 78p.

Margara, J-. 1990. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 82-89

Olmos, S, Luciani, G. y Galdeno E. 2004. Micropropagación. In. Biotecnología y Mejo ramiento Vegetal. Edt. Echenique, V., Rubinstein C. y Mroginski, L. Buenos Aires, Argentina.. Ed. INTA pp. 163-168

Pierik, R. L.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 191-203.

Villalobos, A. V. 1990. Organogéneis. In: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. Rosell, C. H y Villalobos A. V. Estudio FAO Producción y Protección vegetal 105: 29-32

PRÁCTICA 5

ACLIMATACIÓN DE PLANTAS OBTENIDAS IN VITRO Y TRANSFERENCIA A SUELO

Introducción

La aclimatación es una etapa fundamental de la micropropagación porque de ella dependen la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas in vitro. Las plantas obtenidas por este método, en comparación con las obtenidas por métodos convencionales, presentan un comportamiento diferente en condiciones de invernadero o de campo. Es decir, sufren una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que ocasionan una pérdida importante de plantas al momento de trasplante. Por esta razón es necesario aplicar técnicas de adaptación al cambiar las plantas de condiciones in vitro a ex vitro.

La aclimatación permitirá que la planta alcance un crecimiento autotrófico en ambientes de menor humedad relativa, con más luz y sustratos sépticos. Éstas son las condiciones que prevalecen en el invernadero y el campo donde las plantas provenientes del cultivo in vitro crecerán.

La eficiencia del proceso de adaptación depende, entre otros factores, de la elección del sustrato y de una relación adecuada entre los componentes de la mezcla que asegure una buena supervivencia del trasplante. Dicho sustrato deberá poseer las mejores condiciones de textura y estructura, capacidad de retención de humedad y espacio poroso que permitan el crecimiento adecuado de las plantas en condiciones controladas.

La aclimatación de plántulas de condiciones in vitro a condiciones ex vitro se considera el periodo más crítico en la micropropagación, ya que durante el cultivo in vitro están bajo condiciones de alta humedad relativa (entre 85 y 100%), generalmente baja irradiación, carencia de CO2, presencia de fuentes de carbono y reguladores del crecimiento en el medio. Estas condiciones inducen a la planta a desarrollar una estructura y fisiología que difieren de aquellas obtenidas por métodos convencionales, por ejemplo, sus raíces son muy vulnerables al daño físico, la tasa de fotosíntesis es muy baja y su aparato estomatal es poco funcional, además presentan cambios en el tamaño, la forma y la densidad estomatal. Con estas características las plantas propagadas in vitro tienen pocas probabilidades de adaptarse al ambiente exterior donde la humedad relativa es menor y muy variable (entre 30 y 80%, dependiendo de la hora del día y de la temporada del año), y el sustrato es áspero y sin fuente de carbono. Al experimentar un cambio tan drástico en las condiciones ambientales, las plantas mueren principalmente por la elevada tasa de transpiración y la ausencia de una fuente de carbono, así como por el daño mecánico que el sustrato ocasiona en las raíces.

Existen diversos estudios que demuestran la gran importancia que tiene la estructura, morfología y funcionalidad del aparato estomatal durante la aclimatación de las plantas producidas in vitro. Entre los cambios observados se reportan variaciones en la densidad estomatal (reducción-incremento) y en la forma de los estomas. Con relación a la morfología de los estomas se han observado aperturas estomatales más grandes en plántulas desarrolladas en condiciones in vitro en comparación con las plantas aclimatadas. Al comparar el crecimiento de los tejidos vegetales cultivados in vitro bajo condiciones fotoautotróficas (sin saca

rosa, medio enriquecido con CO_2 y alto flujo fotosintético de fotones en el medio) y bajo condiciones foto mixotróficas (20 g•litro-1 de sacarosa en el medio), se observa que en el primer caso los estomas se comportan normalmente (apertura en luz y cierre en la oscuridad), y que la densidad estomatal de las plántulas crecidas bajo estas condiciones es dos veces mayor comparada con la de las plántulas crecidas en condiciones fotomixotróficas.
El retraso en el desarrollo de la cutícula y la escasa funcionalidad del aparato estomático que presentan las hojas de la mayoría de las especies cultivadas in vitro determinan que la tasa de transpiración sea alta, lo que puede ocasionar la muerte por deshidratación. El control de este proceso fisiológico es de vital importancia durante la aclimatación. Algunos autores denominan este proceso como el endurecimiento del material vegetal.
Para este proceso es conveniente contar con invernaderos o cámaras de crecimiento que proporcionen condiciones de temperatura y humedad adecuadas para lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva. Bajo condiciones ex vitro se utilizan diferentes sustratos y mezclas de los mismos, que de preferencia deben ser esterilizados. En algunos casos se utilizan cubiertas de polietileno con perforaciones, de mayor tamaño y número a medida que avanza el proceso de aclimatación, también se utilizan antitranspirantes, fungicidas, mallas sombras, soluciones nutritivas y humidificación entre otros factores.
Cabe mencionar que algunos sistemas de micropropagación consideran una integración entre las etapas de enraizamiento y aclimatación en las que la producción de raíces adventicias se realiza en condiciones ex vitro con adición de hormonas, y en condiciones de humidificación. En algunas especies se llega a reducir la tasa de supervivencia de las plántulas.

Durante la aclimatación la estrategia a implementarse debe contemplar el control minucioso de los parámetros ambientales (humedad, temperatura y luz), de tal manera que se pueda disminuir la deshidratación y al mismo tiempo estimular la fotosíntesis con el objeto de generar un rápido crecimiento de las vitroplantas.

Objetivo

Que el alumno identifique los procesos asociados a la transferencia de las plantas obtenidas in vitro a sustratos y su desarrollo posterior en ambiente in vivo. Que pueda evaluar diferentes tipos de sustratos y mezclas de estos para la aclimatación del material vegetal generado in vitro.

Actividades previas a la práctica

Realizar mezclas de diversos sustratos, con y sin tierra, en diferentes proporciones. Seleccionar diferentes tipos de recipientes.

Material

Autoclave
Sustratos (agrolita, vermiculita, tierra de monte, germinaza, composta, etc.)
Enraizadores comerciales (Radix® y Raizone®)
Vasos cónicos de papel o plástico
Vasos de unicel (de 250 a 400 ml de capacidad)
Charolas de plástico

Balanza granataria
Fungicidas (Benomyl® o Captan® al 1.5% p/v)

Procedimiento experimental

Esta práctica se dividirá en dos etapas:

a) Determinación de las características físicas de los sustratos

Consiste en evaluar diversos sustratos, y mezclas de los mismos, utilizando el procedimiento para la caracterización física de algunos sustratos y mezclas (ver el formato anexo a esta práctica). Esto permitirá determinar la densidad, espacio poroso (macro y microporos), capacidad de retención de humedad, entre otros factores.

b) Aclimatación de vitroplantas

Se utilizará material vegetal que ha sido cultivado in vitro en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Utilizar brotes con raíz de violeta africana y cactáceas (Mamillaria sp. y Wilcoxia sp.) cultivados en etapa III y creciendo bajo las condiciones ambientales del cuarto de cultivo del laboratorio (intensidad luminosa de 50 µ mol.m-2.s-1, 16 horas luz y ocho de obscuridad, y temperatura de 25º C ± 2).
Sacar las vitroplantas o plántulas de los tubos de ensaye con ayuda de pinzas largas y lavarlas con agua destilada para eliminar residuos de agar. Para prevenir el desarrollo de microorganismos se sumerge temporalmente la parte basal en una solución de Benomyl® (1.5 g.l-1). En seguida impregnarla de Radix® 1500 y colocarla en el sustrato contenido en vasos de unicel, charola o almeja, los que deben cubrirse con una bolsa de plástico a la cual se le realizarán perforaciones periódicas conforme avanza la fase de aclimatación. Colocar el material en el invernadero o cuarto de cultivo del laboratorio de micropropagación. El riego se realizará con atomizador y solución de fungidas y nutrimentos foliares.

Tabla de resultados experimentales

En el anexo de esta práctica se presenta una tabla relativa a los procedimientos para determinar las características físicas de los sustratos para la aclimatación de vitroplantas. Esta tabla debe llenarse por equipo con los resultados obtenidos de los procedimientos indicados.

Instrucciones para la elaboración del reporte

Considerar como variable de estudio el número inicial de hojas y la longitud de tallo en su caso. El tiempo a evaluar será de seis a ocho semanas y al finalizar se determinará el incremento en el número de hojas, la longitud, la densidad del sistema radical, y el porcentaje de supervivencia.

Bibliografía

Augé, G. R., Beauchesne, G. J., Boocon-Gibod L, Decurtye, B. et Vitalie H. 1990. La culture in vitro et ses applications horticoles. Ed. J. B. Baillere, Paris pp. 47-57.

Conger, B. V. Cloning Agricultural plants via In vitro techniques.CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 273p

Cruz-Pizarro, F. 2000. Niveles de sacarosa y relación NO3- : NH4+ en el cultivo in vitro de vid (Vitis vinfera) 'Málaga Roja' Tesis Maestría en Ciencias, Colegio de Post-graduados, Montecillo, Texcoco, Edo. De Méx. 78p.

Deberg, P. C: and R. H. Zimmerman. 1991. Micropropagation. Technology and Appli cation Kumer Academic Publishers.London 483 p.

Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A. and Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. In Vitro, 12: 473-478

Hartmann, H. T., D. E. Kester and F. T. Davies Jr. 1990.Plant Propagation, Principles and Practices.Prentice Hall.Eglewood Cliffs. New Jersey. USA 647 p.

Kyte, L. 1990. Plants from tes tubes.An Introduction to Micropropagation.Timber Press.Pórtland, Oregon USA. pp. 62-70

Margara, J. 1988. Multipliación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemos y la orga nogénesis. Ed. Mundi-Prensa 239 p.

Mroginski, L., Sansberro, P. y Flaschland, E. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Edt. Echenique, V., Rubinstein C. y Mroginski, L. Buenos Aires, Argentina..Ed. INTA pp. 35-42

Olmos, S.; G. Luciani y E. Galdeano. 2004. Micropropagación. In Biotecnología y mejoramiento vegetal. Edit. V. Echenique, Clara Rubinstein y L. Mroginski. Ediciones INTA .Buenos Aires. pp. 163-172.

Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa Madrid. pp. 37-47.

Roca, M. W. y Mroginski, L. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 953 p.

Rodríguez, De La O. J., García R. J: y Aguilar D. N. 2007. Aclimatación de plantas obtenidas in vitro y transferencia a suelo. In: Cultivo in vitro de células, tejidos y órganos vegetales. Manual de prácticas. U. A. Chapingopp69-74 .

ANEXO PRÁCTICA 5

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE ALGUNOS SUSTRATOS Y MEZCLAS QUE SE UTILIZAN EN LA ACLIMATACIÓN DE VITROPLANTAS

Introducción

Para que las plantas dispongan de humedad dentro de un contenedor se requiere que el suelo (o la mezcla) tenga buena porosidad. La porosidad es la cantidad de macroporos y microporos presentes en el sustrato. En los macroporos se almacena el aire para que las raíces puedan obtener oxígeno y llevar a cabo la respiración, mientras que en los microporos se almacena el agua que requieren las raíces. El tamaño de los poros determina el volumen real de agua y aire que permanecen en un recipiente una vez que se ha escurrido el excedente de agua después del riego, así los poros más pequeños retienen agua (porosidad de retención de humedad) y los poros más grandes retienen aire (espacio aéreo).

Para un buen desarrollo se requiere un suelo con un 30 a 60% de espacio poroso, dependiendo del cultivo. Por lo menos, la mitad de éste debe estar constituido por macroporos que son los que se drenan inmediatamente después del riego y se llenan de aire para permitir un intercambio gaseoso adecuado en las raíces. La otra mitad del suelo se encargará de retener el agua y los nutrimentos que lleve disueltos.

Generalmente, entre menos profundidad tenga un contenedor y más fina sea la textura del suelo la capacidad de retención de humedad es mayor, pero el espacio de aire es menor. Por el contrario, en recipientes más profundos y suelo con textura más gruesa la capacidad de aireación mejora, pero disminuye la capacidad de retener humedad. Por ello es muy importante considerar la profundidad de los recipientes y la textura del suelo que se va a utilizar en la propagación de plantas.

Objetivo

Determinar la densidad, espacio poroso total, capacidad de retención de humedad y espacio aéreo de al menos cinco sustratos de uso frecuente en la aclimatación de vitroplantas.

Material

Balanza granataria
Sustratos (agrolita, vermiculita, peat-moos, germinaza, etc.)
Probeta de 100 ml
Conos de papel y/o plástico

Procedimiento experimental

Cada equipo evaluará al menos tres sustratos distintos, además de una mezcla del material que se utilizará en la fase de aclimatación y el trasplante a un sustrato.

Las mezclas a evaluar son las siguientes:

1. Agrolita, peat-moss y vermiculita 1:1:1 v/v
2. Agrolita, peat-moss y germinasa 2:1:1 v/v
3. Agrolita, peat-moss y tierra 1:2:1 v/v

El procedimiento para realizar la evaluación de sustratos se describe a continuación:

1. Pesar un cono de papel y anotar el peso en la hoja anexa.
2. Verter agua en el vaso (l ml=l g= 1 cm3), anotar el volumen alcanzado.
3. Marcar el nivel de agua en el vaso y desecharla.
4. Llenar el vaso, hasta el nivel marcado, con el medio seleccionado y apretarlo suavemente.
5. Pesar el vaso incluyendo el medio y anotar.
6. Restar el peso del vaso del peso obtenido en el paso 5 y anotar el peso del medio.
7. Dividir el valor obtenido en el paso anterior entre el volumen alcanzado (paso 2) y anotar el resultado. Este valor equivale a la densidad (peso/volumen).
8. Con una probeta graduada verter agua cuidadosamente sobre el medio hasta que todos los espacios porosos se llenen. Anotar el volumen de agua requerido, que equivale al espacio poroso total del medio.
9. Con cuidado invertir el vaso desechable sobre papel absorbente y dejar que el agua se filtre libremente.
10. Una vez que haya terminado el filtrado volver a pesar el envase junto con el medio.
11. Restar el peso del medio (paso 6) del peso obtenido en el paso 10 y anotarlo. Esta diferencia es igual a la capacidad de retención de humedad.
12. Restar el agua retenida a capacidad de campo de espacio poroso total equivale a espacio con aire a capacidad de campo.

Presentar los resultados en la tabla anexa y entregar la práctica 15 días después de haberse realizado. Discutir los resultados con ayuda de los gráficos necesarios.

Bibliografía

Davidson, H. et al. Nursery mangement, administración and culture. Prentice Hall, New Jersey. Pp 246-248.

Fretz, A.T. et al. Plant Propagation Lab. Manual.3rd. Ed. Burgess Po.Co. Minneapolis, Minnesota.pp 29-35.

Martínez, M. F. 1994. Manual Básico de Sustratos. Edt. F. Martínez. 29 p.

Spomer, L.A. 1977. How mouch total water retentin and aeration porosity in my container mix. State Florist Aassoc. Bull. 369: 13-15.

White, J. W.And J. W. Mastalerz. 1966. Soil moisture as related to container capacity. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 89: 758-765.

TABLA DE RESULTADOS DE LA PRÁCTICA DE SUSTRATOS UTILIZADOS EN LA ACLIMATACIÓN

Sustratos	Paso 1 (Peso del vaso de papel) (g)	Paso 5 (Peso del vaso + el medio) (g)	Paso 6 (peso del medio) (g)	Paso 7 Peso del medio entre volumen requerido = densidad	Paso 8* Volumen de agua requerida = espacio poroso total	Paso 10 Peso drenado (g)	Paso 11* Peso drenado - peso del medio (paso 6) = capacidad de retención de humedad	Paso 12* Espacio poroso total (paso 8) - agua retenida (paso 11) = espacio con aire
Agrolita								
Vermiculita								
Peat-moss								
Tierra								
Mezclas								

Micropropagación
(Manual de prácticas)

La micropropagación es una de las aplicaciones que mayor impacto tiene en los cultivos vegetales, sin embargo, la realización de esta técnica conlleva una serie de limitaciones que dificultan el desarrollo de algunas de las etapas del proceso. Este manual brinda información recopilada de conocimientos y desarrollo de protocolos de micropropagación en diversas especies para que el alumno se familiarice con sus etapas e identifique y supere las limitantes durante el desarrollo de esta técnica.

colección: manuales de ciencias biológicas, químicas y de la salud