

17.553

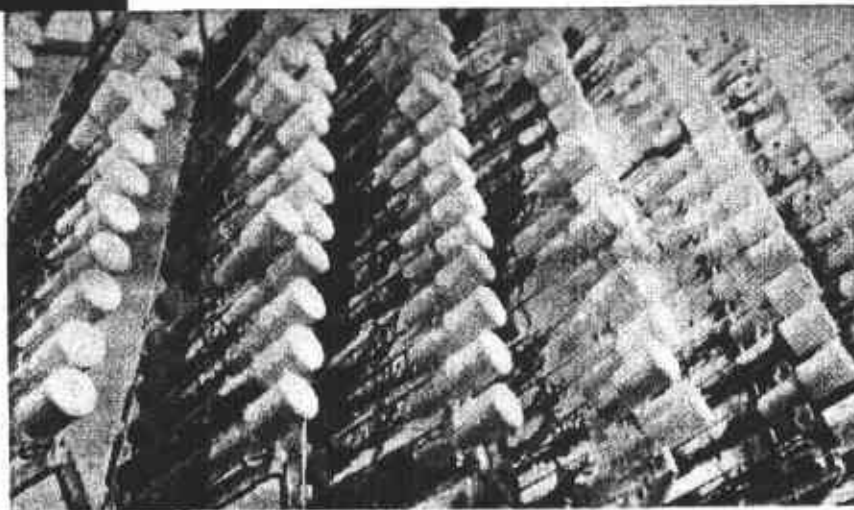
BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA
02 SET. 1996



CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA

REGIONAL 7

CURSO: INTRODUCCION AL CULTIVO DE TEJIDO EN PLANTAS



Organizado por: C. I. CIMPA
Fecha: 22 y 23 de agosto, 1996
Profesor invitado: Dr. Luis Lago

Investigador Principal Visitante

CORPOICA, Regional Uno.

Introducción al cultivo de Tejido en Plantas

La Agricultura constituye una actividad muy importante dentro de las economías de los Países Sub-Desarrollados y en algunas instancias constituye la mayor actividad económica. Aunque es una necesidad de dichos países el incremento de la producción de alimento para su propia subsistencia, la producción de cultivos dedicados a la exportación continúa siendo relevante por la generación de exportaciones que ello implica y por consiguiente la generación de ingresos por concepto de exportaciones, crecimiento económico y generación de empleos. La Biotecnología ofrece nuevas y excitantes oportunidades, en especial para el mejoramiento de importantes limitaciones no solucionables mediante los métodos convencionales, expresados en especial por la falta de material de siembra.

El rol potencial que la Biotecnología se ve expresado en especial en las siguientes esferas:

- Producción de material libre de enfermedades para ser usado como material de siembra
- Propagación rápida de genotipos de interés
- Reducción del tiempo de creación de una variedad
- Mantenimiento de Germoplasma "in vitro"
- Mapeo genómico para facilitar el proceso de selección
- Desarrollo de plantas transgénicas con resistencia o tolerancia a importantes enfermedades, plagas y estrés abiótico
- Desarrollo de diagnóstico para la detección de patógenos

Producción de material de siembra libre de enfermedades.

Se considera que es la base de todo Programa de producción de semilla de reproducción vegetativa. Por tal razón se dan algunos elementos que deben de tenerse en cuenta.

Cultivo de tejidos para la Eliminación de Patógenos:

Los patógenos vegetales, tales como nemátodos, hongos, bacterias y virus, pueden ser transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas. Sin embargo, no todas las células resultan infectadas; los tejidos meristemáticos se encuentran algunas veces libres de enfermedades por lo que es posible recobrar plantas no infectadas mediante técnicas de cultivo "in vitro" de meristemas, y lograr su crecimiento como plantas sanas.

Uno de los aspectos que afectan el valor de uso de cualquier semilla de reproducción vegetativa, es la presencia de enfermedades y plagas que la afectan, de ahí que el Cultivo de tejidos para la Eliminación de Patógenos, adquiere una gran importancia pero en un contexto de utilización de la Biotecnología como una vía de reproducción acelerada del material de siembra.

1 Esterilización de la superficie

Si la superficie del material vegetal está contaminada por patógenos o saprófitos, y éste es sembrado en un medio de cultivo, algunos de los contaminantes crecen rápidamente y pueden matar al tejido y al órgano (explanje) de la planta. La mayoría de los contaminantes de superficie, tales como bacterias y hongos, pueden ser eliminados por esterilización de la superficie del material vegetal con un agente esterilizador apropiado.

Los agentes esterilizadores de la superficie se aplican normalmente durante 10 a 15 minutos. Bajo condiciones asépticas, la solución esterilizadora es luego eliminada y el material vegetal lavado 3 ó 4 veces durante 5 minutos cada vez por agitación en agua destilada estéril. El lavado es muy importante para eliminar el exceso del agente esterilizador el cual puede inhibir el crecimiento de la planta.

a) Etanol (alcohol)

El alcohol es un agente esterilizador común de la superficie para eliminar bacterias y hongos, y es frecuentemente utilizado como un breve lavado antes de aplicar otros tratamientos de esterilización de la superficie de las plantas. Tiene una baja tensión superficial y puede penetrar fácilmente entre las pilosidades foliares y mojar la superficie de la planta. El etanol al 70% es mas efectivo como agente esterilizador que el 5% ó 100%.

b) Hipoclorito de sodio o de calcio

La superficie del material vegetal puede también ser esterilizada con soluciones acuosas de hipoclorito de sodio (NaOCl) o de hipoclorito de calcio (CaOCl). La sal de calcio es preferida porque es menos fitotóxica. Muchos laboratorios utilizan lejía de uso doméstico tal como Clorox. Estos productos comerciales contienen normalmente 5.25% de NaOCl como principio activo. Cuando se les diluye con agua (una parte de la lejía por 9 partes de agua), la solución esterilizadora resultante deberá contener no menos de 0.5% de NaOCl.

Debido a la disociación completa, el hipoclorito tiene una actividad relativamente pequeña a un pH superior a 8.0 y es mas efectivo fijando la solución alrededor de un pH de 6.0. La superficie del tejido, disectado y discretamente sumergido completamente en la solución de hipoclorito, queda esterilizada después de una exposición de 10 ó 15 minutos. A continuación del tratamiento, el material tratado debe ser lavado cuidadosamente con varios cambios de agua destilada para eliminar completamente el desinfectante.

c) Biclورو de mercurio

El bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) ha sido utilizado como desinfectante pese a que es extremadamente tóxico. La solución de bicloruro de mercurio es volátil a temperatura ambiente y puede provocar envenenamiento por mercurio. Por lo tanto recomendamos su uso como agente esterilizador.

d) Bactericidas y fungicidas

Con el material que se encuentra fuertemente contaminado algunos investigadores recomiendan el lavado en una mezcla bactericida / fungicida comercial antes de proceder a la esterilización de la superficie. Debe recordarse, sin embargo, que este tratamiento no tiene efecto sobre infecciones sistémicas. La sección 5 da una lista de bactericidas y fungicidas conjuntamente con información referente a su uso.

e) antibióticos:

A pesar de ser utilizados rutinariamente en el cultivo de células animales para prevenir contaminaciones bacterianas, los antibióticos no han sido muy utilizados en el cultivo de tejidos vegetales. Los fisiólogos, a finales de los años 50, sabían que los productos naturales pueden alterar el crecimiento y desarrollo de los cultivos "in vitro" de tejidos vegetales. De hecho, los tejidos vegetales son sensibles a los antibióticos y muestran una respuesta variable de acuerdo a su genotipo.

La mayoría de los especialistas en cultivo de tejidos no confían en los antibióticos para eliminar los contaminantes superficiales en las disecciones. Estos productos son caros y ninguno es

efectivo contra todos los tipos posibles de organismos contaminantes. Los antibióticos son utilizados sólo cuando los microorganismos son difíciles de eliminar por otros medios. Los siguientes antibióticos o combinaciones de los mismos han sido exitosamente aplicados:

- Cefotaxina
- Gentamicina
- Rifampicina
- Nistatina + Carbenecilina
- Gentamicina + Amfotericina B
- Vancomicina HCl + Micostatin
- Estreptomycin + Carbenecilina

En algunos casos se ha encontrado fitotoxicidad causada por:

- Penicilina
- Estreptomycin
- Bactericina
- Esparsomicina

En el CIP, para erradicar bacterias o levaduras se está utilizando con cierto éxito la incorporación de antibióticos al medio de cultivo. En caso de bacterias, se recomienda usar Rifampicina (Rimactán 300 - CIBA) a una concentración de 40 g/l o Cefotaxima sódica (Claforán ROUSSEL) a 200 mg/l.

Se prepara una solución concentrada del antibiótico a utilizar (Rifampicina 12000 mg/l o Claforán 40 000 mg/l), se esteriliza por filtración y se coloca en pequeños cuadrados de papel filtro estéril (5 x 5 mm), los cuales se dejan secar en una cámara de flujo laminar. Se colocan aproximadamente 0.03 ml de solución concentrada por cada cuadrado del papel. Se recomienda no utilizarlos después de siete días de haberlos preparado, ya que pierden progresivamente su eficacia.

Este trabajo debe realizarse bajo condiciones de asepsia. Los cuadros de papel son introducidos en el medio de cultivo junto a la yema sembrada, y esta debe ser transferida a medio fresco con otro papel - antibiótico cada 3 ó 5 días. También se pueden usar otros antibióticos como Cefoxitina (Mefoxin MERCK) en dosis de 500 ppm.

En el caso de la contaminación sea por levaduras, se recomienda usar Amfotericina B en dosis de 0.25 ppm a 0.5 ppm, siguiendo en todos los casos el mismo sistema del papel filtro.

Frecuentemente las plantas de reproducción vegetativa son infectadas sistemáticamente por virus, viroides, hongos, bacterias y micoplasmas.

En algunos casos como el del banano, la infestación por nemátodos constituye un serio problema para aquellos campesinos que continuamente producen su propio material de siembra.

La Biotecnología ofrece una apropiada y simple solución para dichos problemas, mediante el desarrollo de técnicas de cultivo "in vitro" para la eliminación de infecciones sistémicas y la producción de material de siembra libre de enfermedades.

Un ejemplo a señalar lo constituye el caso del banano en la Rep. de Cuba, en la cual el deterioro de las plantaciones originaba el uso de semilla-vegetativa tratada térmicamente. Ello conllevaba a grandes costos de producción en el procesamiento de la semilla y en diversos casos era cuestionada la efectividad de la misma.

Con la aparición de las aplicaciones de la biotecnología en dicho país, se ha garantizado que todo el material de siembra proceda del cultivo de tejido.

El país organizó una red de "bio-fabricas" que permitan la producción de 40 millones de plantas por año, garantizando así el material de siembra libre de problemas fitosanitarios.

Cultivo de brotes y meristemo: se ha demostrado su utilidad en banano, palmera, piña y caucho, pero continua siendo un problema en cacao, café, coco, palma de aceite y pimienta. En el caso de cítricos, el micro-injerto "in vitro" ha obviado la necesidad del cultivo de brotes o meristemas.

La regeneración mediante organogénesis ofrece considerables oportunidades para diferentes cultivos si se pueden desarrollar hasta una escala comercial.

Se puede considerar que el desarrollo y aplicación de tecnologías "in vitro" para la eliminación de enfermedades, en el contexto de los países subdesarrollados tiene grandes implicaciones en la calidad de la producción agrícola.

2. Aislamiento y cultivo de meristemas

El punto de crecimiento del ápice de la planta es el meristema. Es una zona pequeña compuesta de células meristemáticas que se dividen rápidamente.

El domo de la yema contiene las verdaderas células meristemáticas y está rodeada por primordios foliares y hojas primarias, debido a que los tejidos vasculares más diferenciados se encuentran alejados de los meristemas (hacia los tejidos más viejos del tallo), los elementos vasculares de los primordios foliares son incipientes, y no han hecho aún contacto con la parte principal del sistema vascular del tallo. Por lo tanto, las partículas de virus que pueden estar presentes en el sistema vascular pueden llegar a la zona merismática del ápice solamente moviéndose de célula en célula, un proceso muy lento. Esta es una de las razones principales del porque una planta infectada con virus la concentración de estos disminuye acropetalmente hacia los meristemas tanto del ápice como de las yemas axilares.

El aislamiento en condiciones asépticas de la porción apical, llamada punto meristemático, y su cultivo en un medio nutritivo adecuado e igualmente aséptico, permite el desarrollo de plántulas. En principio, esta secuencia de desarrollo sigue un patrón similar al de aquel presente en una planta normal. Las células del meristema se dividen y la diferenciación de nuevos tejidos continua. La nutrición de la sección disectada de la planta es proporcionada por el medio artificial. Esta técnica, llamada cultivo de meristemas, fue aplicada por primera vez para la erradicación de virus en dalias hace unos 30 años por Morel y Martin (1952), y lleva a la obtención de plantas libres de patógenos.

La disección aséptica del meristema es un proceso delicado y requiere muchas horas de práctica. El procedimiento es el siguiente:

Se cortan los tallos de la planta, que acaba de ser sometida a termoterapia, en segmentos que contengan cada uno un nudo con su yema auxiliar. Se remueven las hojas cuidadosamente. Se desinfectan los segmentos de tallo durante 30 segundos en alcohol al 70%, y a continuación con hipoclorito de calcio 2,5 % durante 15 minutos. Luego los tallos son lavados cuatro veces, por cinco minutos cada vez con agua destilada estéril para eliminar el exceso de hipoclorito.

Bajo un microbio binocular de disección, se eliminan las hojuelas que rodean el punto de crecimiento hasta que quede solamente la cúpula de la yema apical y unos cuantos primordios foliares (generalmente dos). La cúpula y dos primordios foliares son disectados y transferidos al medio de cultivo meristemático A (ver sección 8). El meristema disectado es transferido semanalmente al medio B. Después de 6 a 8 semanas, las pequeñas plántulas son subcultivadas para un mayor crecimiento y micropropagación.

Después de la regeneración a partir de los meristemas, las plantas son probadas para detectar cualquier infección persistente de virus.

3. Mantenimiento de cultivo

El material "in vitro" puede ser conservado en cultivos por un tiempo indefinido cuando se toman suficientes precauciones para evitar contaminaciones y cuando la transferencia a medio frasco es realizada a intervalos apropiados. Las plántulas "in vitro" probadas contra patógenos pueden ser mantenidas como colecciones base para la propagación en un programa de semilla.

**BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA**

Para mantenimiento de un periodo corto, las plantas son mantenidas en tubos sobre el medio de propagación C o D (ver sección 8). Los tubos son sellados con tapas de plástico autoclaveables. Estas son mejores que los tapones de algodón que pueden ser penetrados fácilmente por las esporas de hongos presentes en el aire y por insectos.

La tasa de crecimiento de las plántulas depende de la temperatura de incubación, la composición del medio y del genotipo.

Los medios E y F para almacenamiento (ver sección 8) ejercen un estrés osmótico sobre las plántulas y pueden ser utilizados para almacenamiento a 25 °C; el estrés reduce la tasa de crecimiento y da lugar a entrenudos cortos. Muchos nudos están así disponibles cuando se inicia la propagación del material almacenado. El material almacenado bajo estas condiciones necesita normalmente ser transferido solamente una vez al año.

Si la temperatura puede bajarse a 6 °C, esto reduce significativamente la tasa de crecimiento de las plántulas y las transferencias son requeridas solamente una vez cada dos o tres años.

Es posible, por lo tanto, mantener una colección de germoplasma bajo condiciones de almacenamiento descritas anteriormente. Cuando se recibe un pedido para la exportación de un determinado genotipo probado contra patógenos, éste puede sacarse del almacenamiento, ser micropropagado, y luego ser distribuido "in vitro".

4. Medios de cultivo

Todos los medios utilizados para este trabajo están basados en las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962). Las soluciones concentradas de sales son normalmente preparadas en cuatro partes separadas:

Sales
MgSO₄
Hierro
Vitaminas

a) Solución concentrada de sales

NH ₄ NO ₃	35.0	g
KNO ₃	40.0	g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	9.0	g
KH ₂ PO ₄	3.5	g
H ₃ BO ₃	0.1	g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.5	g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.4	g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	g
ZnSO ₄ · H ₂ O	0.2	g
KI	0.02	g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.005	g

Disuelva cada sal en 200 ml de agua destilada:

Disuelva 5 mg (0.005 g) de CuSO₄ · 5H₂O y 5 mg de CoCl₂ · 6H₂O en 10 ml de agua, agregue 1 ml de esta solución a 200 ml de agua para la solución concentrada.

Mezcle las diez soluciones de sales individuales juntas para hacer 2000 ml (2 litros) de la solución concentrada de sales.

b) Solución concentrada de sulfato de magnesio

Mezclar 3,7 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en 100 ml de agua destilada

c) Solución concentrada de hierro

Na_2EDTA	0,75 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,55 g

Disuelva $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en 20 ml de agua destilada. Na_2EDTA en 20 ml de agua destilada caliente. Mezcle las soluciones frías y lleve a 100 ml con agua destilada

d) Solución concentrada de vitaminas

Tiamina	0,4 mg/l	20 mg
Glicina	2,0 mg/l	100 mg
Acido nicotínico	0,5 mg/l	25 mg
Piridoxina	0,5 mg/l	25 mg

Disolver cada vitamina y completar hasta 500 ml con agua destilada. Repartir 10 ml de la solución de vitaminas en pequeños envases y mantenerlos congelados. Utilizar un envase por cada litro de medio.

e) Preparación del medio

Prepare 1000 ml (1 litro) del medio básico de Murashige Skoog (MS) mezclando las soluciones concentradas en las siguientes proporciones.

Salas	100 ml
$MgSO_4$	10 ml
Hierro	5 ml
Vitaminas	10 ml
Inositol	100 ml

Agregue las hormonas que correspondan y sacarosa (vea la página siguiente) y ponga el medio, con o sin agar, en autoclave a $121^\circ C$ durante 15 minutos.

Condiciones de crecimiento: en sus inicios el cultivo de tejido "in vitro" llevaba implícito la creación de condiciones artificiales para su cultivo, ellas son:

- 16 horas luz
- 19-20 $^\circ C$
- 16 000 lux

Ello no se puede generalizar para todos los cultivos

La experiencia de la Resp. de Cuba en la organización de Bio fabricas para el cultivo masivo utilizando la iluminación natural han hecho cambiar alguno de dichos criterios.

Por tal razón, las condiciones de cultivo tienen que ser ajustadas de acuerdo al cultivo de que se trate y las condiciones concretas de trabajo.

Propagación rápida: el concepto de propagación rápida debe ser visto dentro del contexto de un conjunto de técnicas biotecnológicas y convencionales que propician el alcanzar un gran número de individuos. Dentro de ellas la micropropagación, de material libre de enfermedades es más aplicable a especies que son perennes, estériles, no autofecundadas, altamente heterocigóticas, que sufren infección sistémica de algún agente.

Una gran variedad de técnicas incluyendo cultivo de brotes y meristemos, organogénesis y embriogénesis somática han sido desarrolladas para banano, chrysanthemum, palmera, palma de aceite, piña, pyretrum, y caucho entre otros.

Mientras que significativos progresos han sido alcanzados en micropropagación en cacao, coco, café, mango, pimiento y algunos forestales, el nivel comercial de operaciones aún no ha sido alcanzado.

El uso cultivo de células en bio-reactores basado en la embriogénesis somática, es quizás la más prometedora y rápida de las técnicas pero aún se encuentra en desarrollo para banano, piña, café y plantas ornamentales.

La micropropagación debemos verla muy relacionada con la eliminación de patógenos mediante cultivo de brotes y meristemos.

Generación de variación genética.

La producción de variaciones somaclonales puede ser útil para el desarrollo de nuevos genotipos con resistencia a estrés biológicos y abióticos, y en especial si tales resistencias no son encontradas dentro de la colección de germoplasma.

Significativos progresos han sido encontrados para resistencia a enfermedades en caña de azúcar, tabaco y otros cultivos.

Plantas transgénicas resistentes/tolerantes a enfermedades, insectos, estrés abióticos.

Transformación con genes reporteros o de interés económico han sido reportados en diferentes cultivos y serán probablemente más diseminados debido al uso de diferentes tecnologías que han venido apareciendo como es el caso de la bio balística (gen gun).

Una de las limitaciones más serias para la diseminación de las técnicas del ADN para el mejoramiento de los cultivos, lo constituye las limitaciones que existen en las técnicas de regeneración en diferentes cultivos.

Plantas transgénicas conteniendo genes de *Bacillus thuringiensis* (Bt), inhibidores de proteasas, proteína de la capsida viral y otros, pueden tener un significativo impacto en el control de insectos y enfermedades.

En su momento el uso de Plantas transgénicas deberá formar parte del Manejo Integrado de Plagas.

En rasgos generales las tecnologías del ADN Recombinante han tenido su expresión comercial en Países Desarrollados.

El acceso de los Países Sub-Desarrollados a dichas tecnologías no sólo es económico sino educacional, cultural y de priorización del papel que debe de jugar la ciencia en las economías de dichos países.

Ejemplos significativos de científicos e instituciones existen en Colombia, México, Argentina, Brasil y Cuba entre otros.

La existencia del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) creado en 1986 significó un ejemplo del rol que las tecnologías del ADN Recombinante deben jugar dentro de una sociedad comprometida en su desarrollo social y económico.

Reducción del tiempo de mejoramiento: se ha considerado que el tiempo requerido para la creación de una nueva variedad es de alrededor de 10 años. El largo tiempo requerido en algunos cultivos como café, cacao, coco, caucho y forestales, plantea un serio problema en el mejoramiento.

Trabajando con variedades de caña de amplio uso en la producción de azúcar en la Rep. de Cuba se han logrado somaclones que mejoran la composición varietal dentro de la actividad productiva del cultivo y se ha reducido considerablemente el tiempo de su creación.

Las técnicas de Cultivo de Tejido tales como cultivo de antera y micropropagación ofrecen soluciones viables para diferentes cultivos.

Más aún, la biotecnología puede ayudar al mejoramiento genético en cultivos en los cuales la incompatibilidad es una barrera en el uso de germoplasma.

Conservación de Germoplasma: la conservación de germoplasma *in-situ* de cultivos perennes puede ser muy costoso, por su demanda de espacio y ser riesgoso debido a su exposición a las enfermedades o a los riesgos climáticos. Experiencias desagradables existen al respecto.

El cultivo de tejido y la cryopreservación ofrecen posibles soluciones a estos problemas en cultivos tales como banano, cacao, palma de aceite, caucho, mango, aguacate y caña de azúcar.

Mapeo Genómico: el mapeo genómico de plantas por las técnicas de Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) y la de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) son consideradas altamente prometedoras para el mejoramiento genético en diferentes cultivos.

Diagnóstico: la efectividad con la cual podemos realizar la correcta prevención y control de una enfermedad depende de la precisa identificación del organismo causal.

Las enfermedades más importantes en rasgos generales son identificables, pero aún existen organismos para los cuales no existen técnicas definidas de identificación.

El diagnóstico debemos verlo en su relación con el cultivo de brotes y meristemas así como con la micropropagación de material libre de enfermedades.

Su valor es ubicado en el contexto de la epidemiología, el control y la producción de material de siembra.

La aplicación de los métodos de diagnóstico en el caso de la Tristeza de los Cítricos en la producción de yemas certificadas ha permitido a la Rep. de Cuba la estructuración de un Programa de cítricos moderno y acorde con las necesidades actuales de la agricultura moderna.

Tabla 1. Adiciones al medio MS básico para la propagación de tipos específicos de medios

Medios	Medio MS *	los siguientes ingredientes
A Para meristemas	0,1 mg/l 0,04 mg/l 2,5% 0,6%	ácido giberélico kinetina sacarosa agar'
B Para meristemas	0,1 mg/l 20,2 mg/l 2,5% 0,6%	ácido giberélico putrescina HCl sacarosa agar'
C Para propagación	1,0 mg/l 50,0 mg/l 4,0 mg/l 2,0 mg/l 10,0 mg/l 3,0% 0,8%	ácido fólico agua de coco L-arginina HCl Pantotenato de calcio putrescina HCl sacarosa agar'
D Para propagación	0,1 mg/l 2,5 mg/l 0,8 mg/l	ácido giberélico sacarosa agar'
E Para almacenamiento	4,0 % 2,0% 0,8%	sorbitol sacarosa agar'
F Para almacenamiento	4,0% 3,0% 0,8%	manitol sacarosa agar'

*Otros agentes gelificantes como Phytigel o Gelfite (marca registrada) se pueden utilizar en lugar de agar. Phytigel se añade en mitad de la concentración de agar y Gelfite se utiliza a un cuadro de la concentración del mismo.

SISTEMA PARA LA PROPAGACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR (Saccharum spp.)

Resultados tomados del Congreso Biotecnología Habana'95

El empleo de métodos rápidos y seguros de propagación que permitan multiplicar, en periodos cortos, plantas libres de enfermedades de variedades en explotación o la introducción de nuevas variedades, ha sido considerado una necesidad en los programas de producción de semillas de caña de azúcar. Es por esto que se han desarrollado diversos métodos para la multiplicación de nuevas variedades y la producción de semilla, considerándose la tecnología del cultivo "in vitro" la de mayor potencial para expandir material libre de enfermedades y producir grandes cantidades genéticamente uniformes.

Proceso:

1. La propagación se inicia a partir de ápices meristemáticos (0.5-0.8 mm) mediante la inducción de brotes axilares en un medio basado en las sales de Murashige y Skoog (MS)
2. El crecimiento de las plantas se realiza en cámaras con iluminación natural, empleándose medios de cultivo solidificados con agar para el establecimiento de los ápices y los 3 primeros subcultivos de multiplicación, para el resto el proceso de propagación y el enraizamiento de los brotes se utilizan medios líquidos.
3. La adaptación de las vitroplantas a condiciones ambientales es realizada en bandejas de poliespuma de 120 orificios (22 cm²) iluminosidad reducida a un 60% mediante una malla.
4. Las vitroplantas son transplantadas a campo entre las 4 y 5 semanas en dependencia de la época de siembra.

Resultados:

1. La regeneración de los ápices y la multiplicación de los brotes se estimulo con la adición de 6 BAP, observándose un aumento en el coeficiente de multiplicación a medida que se dan más subcultivos "in vitro", respondiendo los genotipos de forma diferencial. No obstante se lograron coeficientes de multiplicación superiores a 6 en los 13 genotipo propagados.
2. El Phytigel (2 g/l) y Agargel (5g/l) fueron superiores al agar para la multiplicación de los brotes.
3. Al emplear medios de cultivos líquidos disminuye el tiempo entre subcultivos de tres a dos semanas con lo cual se incrementa el número de brotes producidos por unidad de tiempo en comparación con los medios gelificados.
4. El enraizamiento y crecimiento de las plantas se estimuló con el aumento de la concentración de la sacarosa (4%) y la adición AIA (1,3 mg/l).
5. Las plantas micropropagadas tuvieron un rendimiento agrícola (ton caña/ ha) significativamente superior a la semilla tradicional, debido a un incremento en el número de tallos entre 14 y 50 % en dependencia de genotipos, siendo las principales características de las vitroplantas el aumento en el número de tallos y la disminución en el diámetro y el peso de

estos sin diferencias en los demás componentes de rendimiento aunque se observaron comportamientos diferenciales entre los genotipos.

**BIBLIOTECA AGRPECUARIA
DE COLOMBIA**

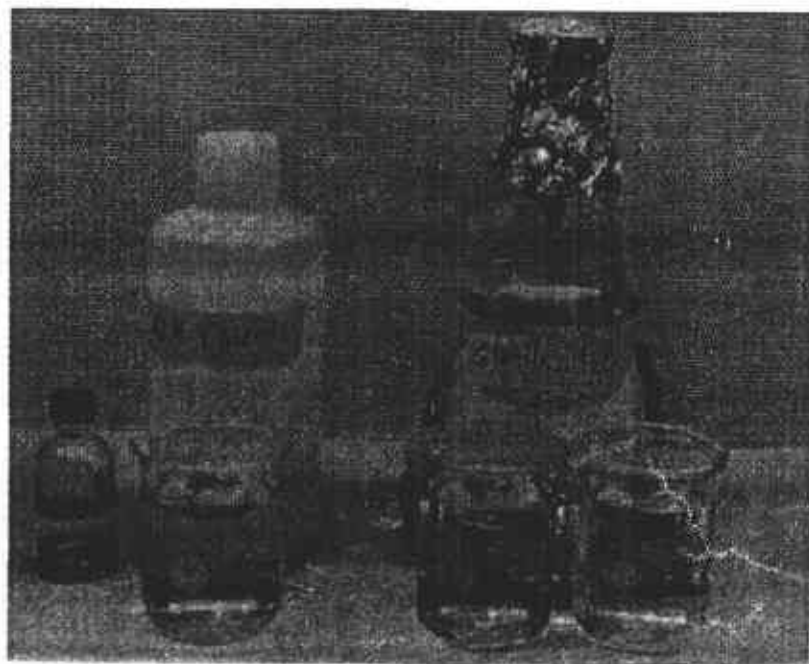
6. El efecto del cultivo *in vitro* se mantiene aún después de dos multiplicaciones clonales en el campo de la semilla que se manifiesta como un aumento en el rendimiento en *pol'ha* de un 17% en comparación con las estacas tradicionales.

7. Las plantas con mayor edad *"in vitro"* (22 subcultivos) presentaron una disminución en la altura, el diámetro y el contenido de azúcar (brix) y un incremento en el número de tallos, pero estas variaciones no tuvieron una base genética ya que desaparecieron con los ciclos de multiplicación en el campo.

8. Sobre la base de estos resultados se estructuró un esquema para la producción comercial de semilla de caña de azúcar por micropropagación que contempló la producción de 10 millones de vitroplantas en 1995.

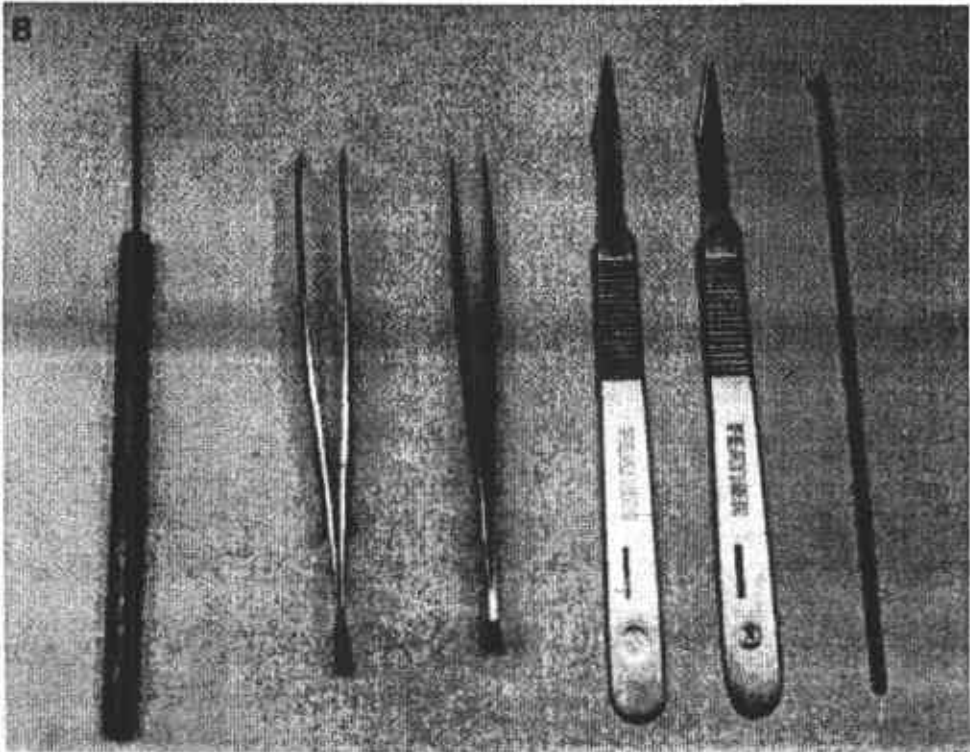
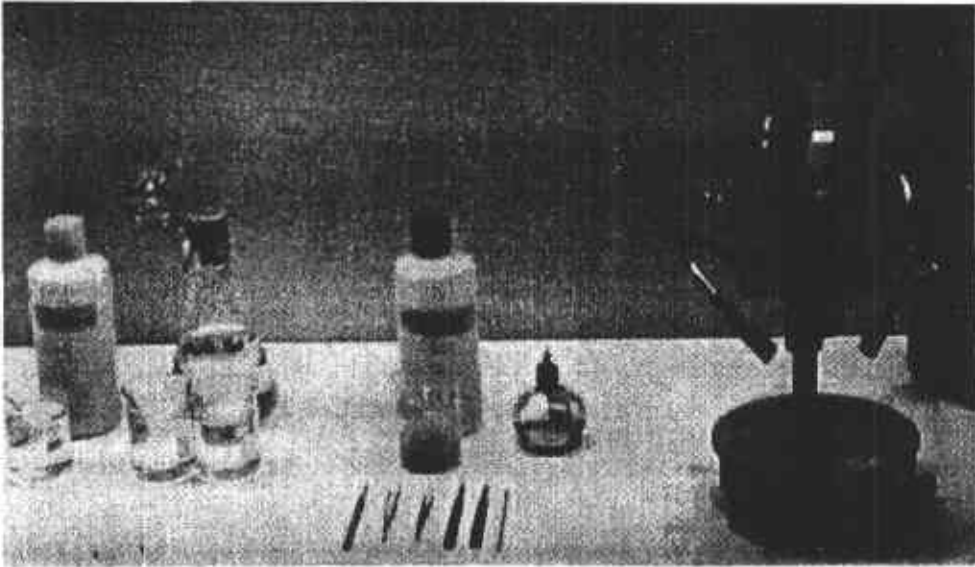
CULTIVOS DE MERISTEMOS

Material de partida



Material necesario para
desinfección.

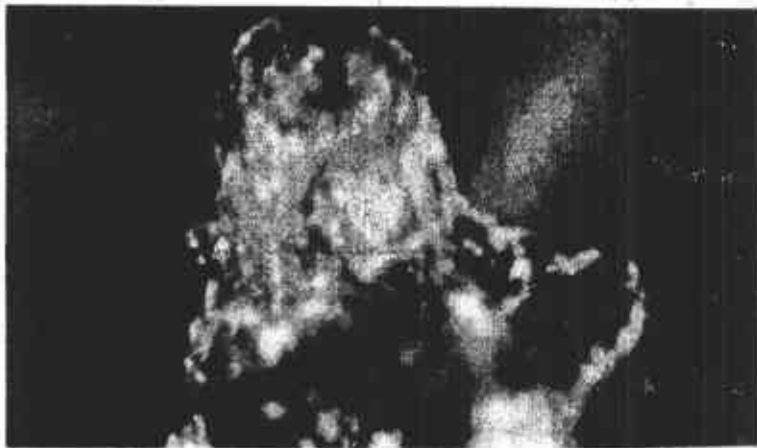
EQUIPAMENTO Y ACCESORIO NECESARIOS.





Antes de eliminar las hojas juvenes.

Antes de reparar el meristemo.
Separar primordios.



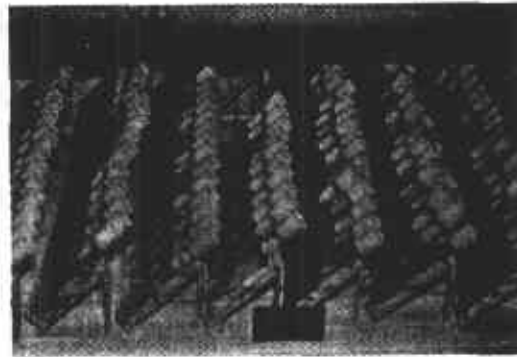
Próximo paso reparar meristemas.

CONSERVACION DE GERMOPLASMA



Mantenido con iluminación natural.

Mantenida en condiciones artificiales de luz y temperatura.



Plantar conservadas "in vitro".

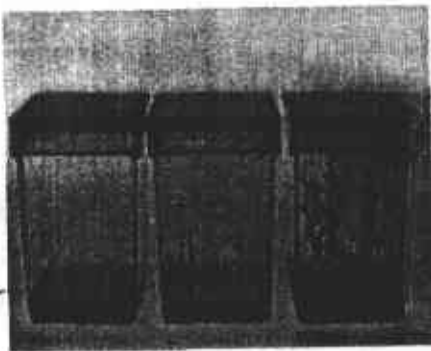
PROCESO DE PROPAGACION "IN VITRO"



Renueve plantas del tubo de ensayos.



Corte en condiciones de asepsia en fragmentos



Evolución de las plantas "in vitro".



Corpoica

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria



Curso: Introducción al cultivo de Tejido.

Fecha: 21 y 22 de Agosto/96

Lugar: CIMPA, Barbosa

Cantidad de Alumnos:

Desarrollo:

21 de Agosto/96

8:30 -9:00 a.m Presentación del Curso.

9:00-10:00 a.m Cultivo de brotes, meristemos y conservación de Germoplasma.

10:00-10:30 a.m Receso.

10:30-12:00 m Cultivo de brotes, meristemos y conservación de Germoplasma.
(continuación)

12:00-1:00 p.m Almuerzo

1:00-2:00 p.m. Práctica No. 1. Desinfección e implantación de material "in vitro"

2:00-3:00 p.m Práctica No. 1. (continuación).

3:00-3:30 p.m Receso

3:30-5:30 p.m Práctica No. 2. Cultivo de brotes y meristemos

-papa

-caña

5:30-6:30 p.m Práctica No. 3 Discusión y preparación de medios.

22 de Agosto/96

8:30 -10:30 a.m Introducción a la propagación "in vitro"

-El caso del cultivo de la papa

-El caso del cultivo de la caña

10:00-10:30 a.m. Receso.

10:30-12:00 m. Introducción a la propagación "in vitro" (continuación)

-Tuberización "in vitro" (formación de órganos "in vitro")

-Cultivo de células embriogénicas

-Embriodénesis somática

12:00-1:00 p.m. Almuerzo

1:00-3:00 p.m. Práctica No. 4. Propagación "in vitro"
-papa

3:00-3:30 p.m. Receso

3:30-4:30 p.m. Práctica No. 4. (continuación). Propagación "in vitro"

5:30 p.m. Conclusión del Curso.

Práctica No. 1. Desinfección e Implantación de material "in vitro".

Temas:

1. Principios generales de la manipulación de material para la siembra "in vitro"

- condiciones de trabajo
- materiales requeridos
- ¿Diagnóstico?"

2. Conceptos generales para la desinfección de material de siembra.

3. Los problemas de fenolización y/o contaminación (superficial y/o sistémica)

4. Implantación y cultivo de brotes y/o meristemas.

Práctica No. 1. Desinfección e implantación de material "in vitro".

Temas:

1. Principios generales de la manipulación de material para la siembra "in vitro"

- condiciones de trabajo
- materiales requeridos
- ¿Diagnóstico?

2. Conceptos generales para la desinfección de material de siembra.

3. Los problemas de fenolización y/o contaminación (superficial y/o sistémica)

4. Implantación y cultivo de brotes y/o meristemas.

Actividades Prácticas.

1. Desinfección del material de siembra.
2. Siembra de brotes de papa "in vitro".
3. Siembra de meristemas de caña.

Materiales necesarios en general para la práctica:

1. Un flujo laminar o una cámara de transferencia rustica.

2. Facilidades de laboratorio:

- ph metro
- destilador de agua
- autoclave u olla de presión casera
- balanza
- cocina a gas o eléctrica

3. Cristaleria para actividades generales de laboratorio

Insumo	Cantidad
Beaker (de 1-2 litros)	2
Probeta (de 2 litros)	4
Probeta (de 200 ml)	2
Beaker (de 50 ml)	10
Capsulas de petri	20
tubos de ensayo (lo ideal 20 mmX100 mm)	50
Frascos de conserva con tapa	20

4. Insumos generales

Insumo	Cantidad
Papel de aluminio	1 rollo
Papel kraft	2-3 metros
cauchos	1-2 cajitas
alcohol	1 litro
tijera niquelada (de uso en hospitales)	1 (20-25 mm de longitud)
pinzas niqueladas (de uso en hospitales)	1 (20-25 mm de longitud)
bisturi+hoja	1
mechero de alcohol	1
cloro	0.5 litros
estereoscopio	1

FAX

A: Dr. Ricardo Cortes, Creced Prov. de Vélez

De: Dr. Luis Lago

Fecha: 16/08/96

No. de page.:

Asunto: Curso.

1. Recibí su FAX.
2. Le estoy adjuntando listado general de reactivos que se utilizan para la preparación de medios de cultivo "in vitro", no con el objetivo de que los compren de inmediato, pero sería bueno saber si tienen algo de ellos.
3. Yo llevaría medio de cultivo ya preparada a los efectos de la práctica.
4. Sería muy útil para mí saber en No. estimado de asistentes, para poder organizar las prácticas.
5. De ser posible sería bueno tener al menos 5 ápices de caña para que cada alumno sembrara 5 meristemos. Cada alumno pudiera sembrar los meristemos de una variedad. El tamaño aproximado de dicho ápice es de 20-30 cms. de largo.
6. Al no tener cámara de flujo laminar, sugiero construir una cámara de madera con cristal como la que vi en CORFOICA, cuyas dimensiones son de 60 cms de largo, 60 cms de alto y 30 de profundidad. Recuerde que uno de los lados, el que sea más cómodo para trabajar, no debe de llevar cristal.

Al tanto de sus comentarios.

Luis Lago



Reactivos comunemente usados en cultivo de tejidos.**a) Solución concentrada de sales**

NH_4NO_3	35,0 g
KNO_3	40,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9,0 g
KH_2PO_4	3,5 g
H_3BO_3	0,1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,4 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
KI	0,02 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,005 g

Disuelva cada sal en 200 ml de agua destilada:

Disuelva 5 mg (0,005 g) de $\text{Cu(NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 5 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 10 ml de agua, agregue 1 ml de esta solución a 200 ml de agua para la solución concentrada.

Mezcle las diez soluciones de sales individuales juntas para hacer 2000 ml (2 litros) de la solución concentrada de sales.

b) Solución concentrada de sulfato de magnesio

Mezclar 3,7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua destilada.

c) Solución concentrada de hierro.

Na_2EDTA	0,75 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,55 g

Disuelva $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de agua destilada, Na_2EDTA en 20 ml de agua destilada caliente. Mezcle las soluciones frías y lleve a 100 ml con agua destilada.

d) Solución concentrada de vitaminas

Tiamina	0,4 mg/l	20 mg
Glicina	2,0 mg/l	100 mg
Acido nicotínico	0,5 mg/l	25 mg
Pridoxina	0,5 mg/l	23 mg

Disolver cada vitamina y completar hasta 500 ml con agua destilada. Repartir 10 ml de la solución de vitaminas en pequeños envases y mantenerlos congelados. Utilizar un envase por cada litro de medio.

e) Preparación del medio

Prepare 1000 ml (1 litro) del medio básico de Murashige - Skoog (MS) mezclando las soluciones concentradas en las siguientes proporciones:

Sales	100 ml
MgSO ₄	10 ml
Hierro	5 ml
Vitaminas	10 ml
Inositol	100 ml

Hormonas:

- IA (ácido indol acético)
- IBA (ácido indol butírico)
- Ac. Giberelico
- BAP (benzil amino purina)

Otros:

- carbón activado
- agar