

Capítulo 2

Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro

L. A. Mroginski*

W. M. Roca**

* Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.

** Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Introducción

La amplitud de la definición de 'cultivos de tejidos' y los numerosos objetivos que éstos persiguen constituyen serios escollos en cualquier intento de generalización sobre los factores que afectan el establecimiento de tales cultivos *in vitro*, y obligan a consideraciones previas para delimitar los alcances de los mismos.

En primer término, el cultivo de tejidos *in vitro* comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Esta acepción amplia, si bien imprecisa, es actualmente aceptada; sin embargo, existen sugerencias de algunos autores (Street, 1977a; Steward, 1983) para restringir su empleo.

En segundo término, los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Brevemente, las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; y f) conservación e intercambio de germoplasma.

De estas consideraciones surge que el establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez dependerán del objetivo perseguido. En otras palabras, las técnicas que se emplean para cultivar protoplastos no son exactamente las mismas que se usan para cultivar meristemas; del mismo modo, un determinado sistema de cultivo puede ser de gran utilidad para el logro de un objetivo pero puede no ser útil para otro.

Las características particulares de los diferentes sistemas de cultivo se tratarán en capítulos específicos, mientras en el presente se discutirán aspectos comunes al establecimiento de los cultivos. De manera especial se harán consideraciones generales sobre: a) el explante; b) las normas de asepsia; c) los medios de cultivo; y d) las condiciones ambientales de incubación; la interacción de estos factores determinará las respuestas que se obtengan *in vitro*, algunas de las cuales se ilustran en la Figura 2.1.

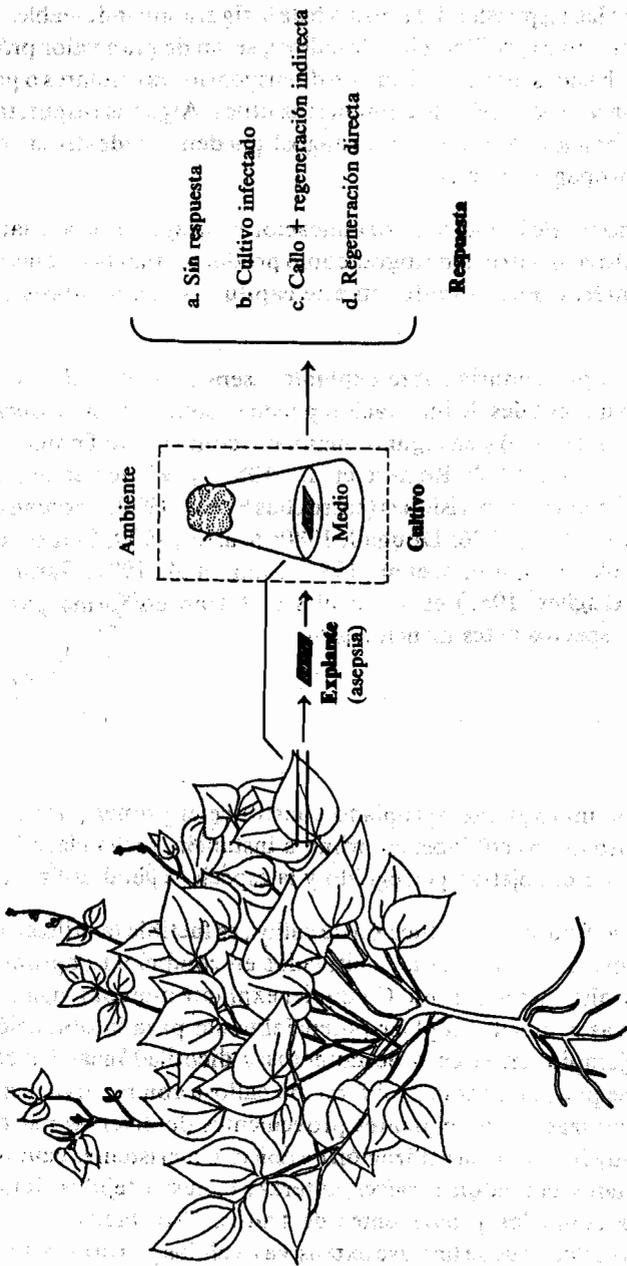


Figura 2.1. Respuestas morfológicas de cultivos vegetales in vitro.

La respuesta obtenida con el cultivo *in vitro* de un determinado explante decidirá sobre su utilidad para el logro de un objetivo propuesto. Es indudable que las respuestas del tipo a o b de la figura son indeseables; pero respuestas del tipo c (proliferación de callos), serán de gran valor práctico para estudios básicos, para la iniciación de suspensiones celulares o para la bioconversión y producción de compuestos útiles. Algunas respuestas del tipo d (proliferación de múltiples vástagos) pueden ser ideales si se pretende micropropagar plantas.

Es necesario recalcar que, para su aplicación en la agricultura, cualquier sistema de cultivo *in vitro* debe lograr como producto final la regeneración de plantas enteras. Por lo tanto, en este capítulo se hará énfasis en ese aspecto.

Literatura suplementaria sobre explante, asepsia, medios de cultivo y condiciones ambientales de incubación puede encontrarse en la obra clásica de Gautheret (1959) y en algunos manuales como los de Thomas et al., 1975; Dodds et al., 1982; Reinert et al., 1982; y Wetter et al., 1982. Asimismo existen varias revisiones (entre ellas Street, 1977; Yeoman et al., 1977; Gamborg et al., 1976; Dougall, 1980; Martin, 1980; Seibert et al., 1980; Seabrook, 1980; Biondi et al., 1981; Evans et al., 1981; Gamborg et al., 1981; y Hughes, 1981) en las cuales se tratan en forma parcial o conjunta los aspectos antes mencionados.

Explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada.

Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes que, cultivados en condiciones apropiadas, permiten la proliferación callosa. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos; por ejemplo, en el caso de numerosas dicotiledóneas herbáceas (Figura 2.2) se puede lograr la proliferación callosa con relativa facilidad mediante la utilización de explantes provenientes de diversas partes del vegetal. Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemas caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos. Esta facilidad para la proliferación callosa puede hacerse extensiva a células y protoplastos, con el empleo de técnicas y medios de cultivo más elaborados.

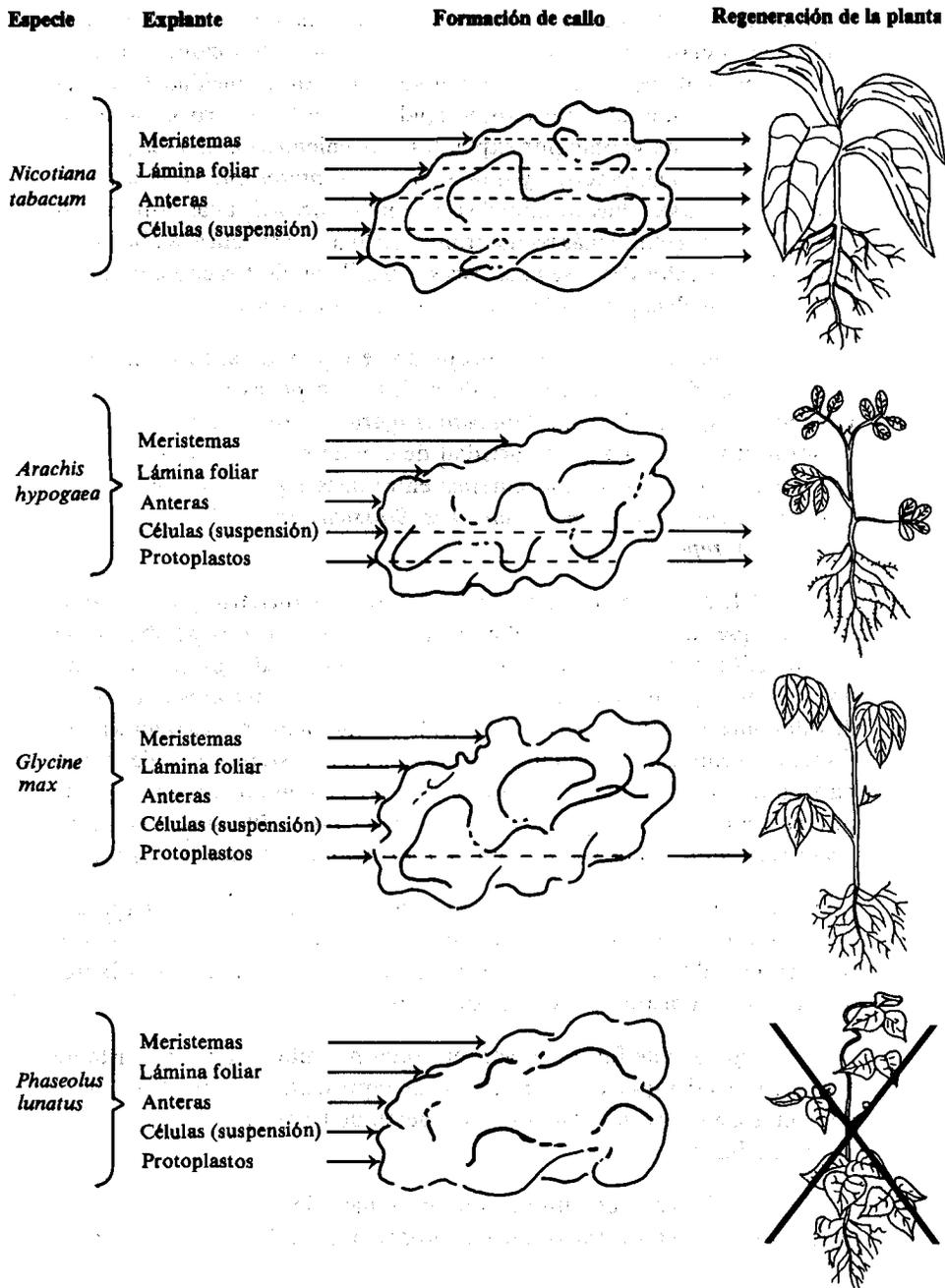


Figura 2.2. Inducción de callos y regeneración de plantas en el cultivo in vitro de diferentes explantes de cuatro especies de dicotiledóneas herbáceas.

En el caso de vegetales en los cuales la obtención de callos no esté limitada por el tipo de explante, éste se seleccionará por razones prácticas como disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos, y rápida respuesta in vitro; es probable que en estos casos se opte por explantes provenientes de plantas jóvenes que crecen en invernaderos, y una alternativa interesante sería usar los provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas. Sin embargo, hay otros vegetales más recalcitrantes en lo que respecta a la obtención de callos, y en estos casos se hace necesario utilizar ciertos explantes; esto ocurre con muchas plantas leñosas y algunas gramíneas.

La elección de un explante apropiado se complica si se pretende la regeneración de plantas a partir de callos. Son pocas las especies que pueden sumarse a *Nicotiana tabacum* (Figura 2.2) en su característica de permitir el uso de una gran variedad de explantes para producir callos capaces de regenerar plantas enteras; entre tales especies se encuentran: *Daucus carota*, *Stylosanthes guianensis*, *Brassica napus*, *Medicago sativa*, y *Trifolium repens*.

El modelo representado en la Figura 2.2 con el maní (*Arachis hypogaea*) muestra que no todos los explantes que producen callos posibilitan la regeneración de plantas. La soya (*Glycine max*) se puede considerar como un excelente ejemplo de la facilidad con que se obtienen callos por cultivo de diferentes explantes, pero en el cual la regeneración de las plantas está limitada al empleo de explantes que contengan meristemas apicales caulinares o laterales; respuestas similares se obtienen en muchas especies de interés económico (entre ellas *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Cicer arietinum*, *Vicia sativa*, *Desmodium canum*, y *Manihot esculenta*).

Por último, la Figura 2.2 muestra el caso de *Phaseolus lunatus*, en el cual es factible inducir el crecimiento calloso pero no se ha logrado aún la regeneración de plantas, a pesar de que se han ensayado unas 40 variantes que involucran medios y sistemas de cultivo.¹

Es de esperar que futuras investigaciones permitan ampliar la lista de especies vegetales que se ajusten al modelo representado en el tabaco, para aumentar así las posibilidades de aplicación de las técnicas del cultivo in vitro de tejidos.

El establecimiento de cultivos que persiguen determinados objetivos puede limitar aún más la elección del tipo de explante. Para la obtención de

1. Rubluo et al. Información sin publicar.

haploides se cultivan anteras y, en menor medida, inflorescencias, microsporas u ovarios; también con el mismo objetivo se pueden cultivar en el caso de la cebada embriones haploides derivados del cruzamiento de *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum* (Jensen, 1977; Yeung et al., 1981). Para la obtención de plantas libres de patógenos se cultivan meristemas, lo mismo que para la conservación de germoplasma (ver Capítulos 9, 11, 12 y 15).

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Es muy frecuente que, en idénticas condiciones de medio y ambiente, las respuestas in vitro del cultivo de un determinado explante de una especie difieran con el cultivar empleado. Entre cultivares de mandioca o yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se encuentran diferencias hasta de 100% en el peso seco de los callos (Rey et al., 1980), y en el pimiento (*Capsicum annum*) tales diferencias llegan hasta 250%.²

También se aprecian diferencias en la regeneración de plantas por cultivo de hojas jóvenes entre cultivares de maní (*Arachis hypogaea*) (Mroginski et al., 1981c; Pittman et al., 1983) y arveja (*Pisum sativum*) (Rubluo et al., 1982), como también por cultivo de discos foliares de *Lycopersicon esculentum* (Frankenberger et al., 1981a; 1981b). Otros buenos ejemplos son el cultivo de meristemas de frutilla o fresa (*Fragaria x ananassa*) (Boxus et al., 1977) y el cultivo de anteras de trigo (*Triticum vulgare* L.) (Clapham, 1977). En cultivos in vitro de alfalfa (*Medicago sativa*) las respuestas varían con el cultivar (Bingham et al., 1975), e inclusive hay diferencias entre plantas de un mismo cultivar (Kao et al., 1980; 1981).

Ligeros cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en lo que se refiere a los reguladores de crecimiento, pueden ser de utilidad para obviar este efecto del genotipo del material vegetal.

Las respuestas de los explantes cultivados in vitro pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos. El éxito en la obtención de plantas haploides por cultivo de anteras depende en gran medida de su estado de desarrollo al momento de su cultivo (Mroginski, 1975; Sunderland, 1974). La propagación in vitro de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles (Bonga, 1980; Dodds, 1983); en plantas herbáceas como el maní o la arveja, la regeneración de plantas a partir de hojas

2. Mroginski. Información sin publicar.

está limitada al empleo de explantes jóvenes (Mroginski et al., 1981b; 1981c; Rubluo et al., 1982).

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de los cultivos; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello trae aparejadas mayores probabilidades de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos. Existe un tamaño mínimo del explante, variable según el material vegetal, por debajo del cual no se obtienen proliferación callosa u otras respuestas deseables.

El efecto del tamaño del explante puede apreciarse en cualquier sistema de cultivo e independientemente de la fuente de donde proviene dicho explante; su importancia ha sido señalada en cultivos de meristemas (Hu et al., 1983), anteras (Xu et al., 1982), suspensiones celulares (Street, 1977b), embriones (Monnier, 1976) y protoplastos (Kao et al., 1980). En general, el cultivo de explantes muy pequeños requiere el empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados (Street, 1977b); otra alternativa es el cultivo de varios explantes en un mismo recipiente, en lugar de su incubación en forma individual.

Se debe tener en cuenta la incidencia de otros factores que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados; entre estos factores están la época del año en que se realizan los cultivos, especialmente cuando los explantes se obtienen de plantas de invernadero o campo. Otro factor serían los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos.

Asepsia

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación.

Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra; por ejemplo, es probable que los virus presentes en el explante persistan en los cultivos. Hecha esta salvedad, para establecer cultivos

asépticos es conveniente o necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y d) realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia (ver Capítulo 1).

Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico (agua de lavandina). Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$, 6% a 12%] y el cloruro de mercurio (HgCl_2 , 0.1% a 1.5%), aunque hay que recalcar que este compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante.

En algunos casos resulta útil el agregar algún agente tensoactivo (por ejemplo, Tween-20, del 0.01% al 0.1%), pero puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol 70%. Asimismo, es conveniente agitar (80-150 rpm) el explante conjuntamente con la solución desinfectante.

Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes es necesario remover de él los restos del producto, mediante varios lavados con agua destilada estéril y operando en la cámara de transferencia. Es aconsejable lavar los explantes con un volumen por lo menos 10 a 20 veces mayor de agua estéril, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos.

Los antibióticos aplicados al medio de cultivo pueden ser de utilidad para la desinfección de los explantes. Sin embargo, en general, su empleo solamente se justifica en casos de excepción y en cultivos de corta duración, ya que la alta especificidad de los antibióticos implica que no previenen la proliferación de todos los microorganismos; además, tales productos modifican la composición de los medios de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes.

El procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes. No es factible recomendar un procedimiento general para este propósito, y se deben considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explante.

En el Cuadro 2.1 se incluyen varios procedimientos utilizados para la desinfección de explantes. Es interesante observar que, si bien en ocasiones se emplea sólo etanol, o solamente NaOCl, lo más frecuente es la utilización de ambos, es decir, una inmersión (generalmente de corta duración) en etanol 70%, seguida de una en NaOCl y de varios lavados con agua estéril.

Cuadro 2.1. Algunos ejemplos de los procedimientos que se usan para la desinfección de explantes.

| Parte vegetal desinfectada | Explante cultivado | Especie | Tratamiento desinfectante ^a | | | Referencia |
|----------------------------|--------------------|--------------------------------|--|----------|--------|---------------------------|
| | | | En etanol 70% (seg.) | En NaOCl | | |
| | | | | (%) | (min.) | |
| Apices caulinares | Meristema | <i>Lycopersicon esculentum</i> | — | 1.2 | 10 | Kartha et al., 1977 |
| | Meristema | <i>Manihot esculenta</i> | 10 | 0.8 | 10 | Rey et al., 1978 |
| | Hoja joven | <i>Ilex paraguariensis</i> | 60 | 2.0 | 15 | Rey, no publicado |
| Inflorescencias | Antera | <i>Arachis hypogaea</i> | 10 | 0.8 | 5 | Mroginski et al., 1979 |
| | Antera | <i>Oryza sativa</i> | 4 | — | — | Oono, 1981 |
| | Ovario | <i>Paspalum alatum</i> | — | 0.8 | 10 | Bovo et al., 1983 |
| Frutos | Ovulo | <i>Carica papaya</i> | — | 2.0 | 20 | Litz et al., 1981 |
| | Nucela | <i>Citrus</i> spp. | — | 0.5 | 10 | Evans et al., 1981 |
| Hojas | Lam. foliar | <i>Stylosanthes guianensis</i> | — | 1.2 | 20 | Mroginski et al., 1981a |
| | Lam. foliar | <i>Lycopersicon esculentum</i> | — | 1.2 | 10 | Kartha et al., 1976 |
| Semillas | Cotiledón | <i>Lotononis bainesii</i> | — | 1.6 | 10 | Bovo et al., no publicado |
| | Meristema | <i>Coffea arabica</i> | — | 1.2 | 20 | Kartha et al., 1981a |
| Tallo | Médula | <i>Nicotiana tabacum</i> | 20 | 2.0 | 30 | Reinert et al., 1982 |
| Raíz tuberosa | Raíz tuberosa | <i>Daucus carota</i> | — | 2.0 | 30 | Reinert et al., 1982 |

a. En todos los ejemplos, los explantes se lavan finalmente varias veces con agua estéril, con excepción de las inflorescencias de *Oryza sativa*; seg. = segundos; min. = minutos; Lam. = lámina.

Otros procedimientos incluyen una doble desinfección, como ocurre con el cultivo de hojas jóvenes del maní (*Arachis hypogaea*) (Mroginski et al., 1981c). En este caso las semillas se sumergen en etanol al 70% (10 seg), luego en NaOCl al 1.2% (10 min), y posteriormente se lavan y se ponen a germinar asépticamente. A los 3-5 días, las plántulas resultantes se desinfectan con NaOCl al 0.6% (10 min.) y después se lavan con agua destilada estéril; luego se retiran de ellas las hojas jóvenes para los cultivos. Un procedimiento similar se utilizó en arveja (*Pisum sativum*) (Mroginski et al., 1981b).

Algunos procedimientos emplean la preincubación de los explantes. En el caso de las hojas del café, se desinfectan con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ al 1% (15 min), se lavan con agua estéril y se cortan en pequeños trozos que se incuban en una solución salina (sales de Murashige et al., 1962, diluidas a la mitad) y sacarosa; al cabo de 48 h se seleccionan los explantes no contaminados y que mantienen la coloración normal, para establecer los cultivos (Sondahl et al., 1979). Litz et al. (1979) emplearon un procedimiento similar para la desinfección de pecíolos de *Carica stipulata*. Los ápices caulinares del manzano utilizados en micropropagación se desinfectan levemente, se incuban por 24 h en el medio de cultivo, se desinfectan de nuevo, y se cultivan (Jones et al., 1977).

Los explantes provenientes de vegetales que crecen en invernaderos o en cuartos climatizados son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo; también es más fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de materiales adultos. Las aplicaciones de fungicidas o bactericidas, aplicadas previamente a las plantas, pueden ser de utilidad.

Por asepsia en el establecimiento y ulterior manipulación de los cultivos es preciso adoptar algunas precauciones durante las tareas que se llevan a cabo en la cámara de transferencia, así:

- 1) Antes de comenzar a trabajar, desinfectar la mesa y las paredes de la cámara con etanol 70%. Igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo o el agua estéril, antes de introducirlos en la cámara.
- 2) Es necesario que las manos y, eventualmente, los antebrazos del cultivador sean desinfectados con etanol 70%. El uso de máscaras y gorros no es imprescindible, pero reduce la contaminación si se opera en flujos laminares de aire estéril.
- 3) Los instrumentos metálicos empleados se deben flamear previamente con etanol 95%. El material de vidrio utilizado como soporte para las

disecciones (generalmente cajas Petri) debe estar esterilizado al igual que las pipetas que comúnmente se usan en trabajos con suspensiones celulares y protoplastos.

- 4) Realizar las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible a la llama de un mechero. Evitar exposiciones prolongadas de los explantes o de los medios de cultivo en recipientes abiertos.

Para más detalles sobre estos temas, ver Capítulo 1.

Medios de Cultivo

Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo in vitro de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación.

Componentes del medio

En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran:

- a) Carbono.
- b) Nutrimientos minerales.
- c) Vitaminas.
- d) Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos).
- e) Sustancias reguladoras del crecimiento.
- f) Otros compuestos.

Generalmente se hace referencia al conjunto de componentes a+b+c como al medio basal (MB), y algunas de sus formulaciones se encuentran en el Cuadro 2.2.

Fuentes de carbono. Muy pocos cultivos in vitro son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5%) es el azúcar que más se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas. La incorporación de mioinositol al medio (100 mg/litro) generalmente da como resultado un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares.

Nutrimientos minerales. Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micronutrimientos) que se consideran

Cuadro 2.2. Composición de cuatro medios básicos (MB) para el cultivo in vitro de tejidos.

| Componentes | Contenidos en cada medio (mg/ litro) ^a | | | |
|--|---|--------|--------|--------|
| | MS | B5 | N6 | Wh |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 | — | — | — |
| KNO ₃ | 1900 | 2500 | 2830 | 80 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | — | 400 | — |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 440 | 150 | 166 | — |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 | 250 | 185 | 737 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | — | 134 | 463 | — |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | — | — | — | 288 |
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | — | 150 | — | 19 |
| KCl | — | — | — | 65 |
| Na ₂ SO ₄ | — | — | — | 200 |
| KI | 0.83 | 0.75 | 0.80 | 0.75 |
| H ₃ BO ₃ | 6.20 | 3.00 | 1.60 | 1.50 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | — | 10.00 | — | — |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 22.30 | — | 4.40 | 6.65 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8.60 | 2.00 | 1.50 | 2.67 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 | 0.25 | — | — |
| H ₂ MoO ₄ | — | — | — | 0.001 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.025 | 0.025 | — | 0.01 |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ | — | — | — | 2.50 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.80 | 27.80 | 27.85 | — |
| Na ₂ EDTA | 37.30 | 37.30 | 37.25 | — |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 | 0.025 | — | — |
| Glicina | 2.00 | — | 2.00 | 3.00 |
| Tiamina-HCl | 0.10 | 10.00 | 1.00 | 0.10 |
| Piridoxina-HCl | 0.50 | 1.00 | 0.50 | 0.10 |
| Acido nicotínico | 0.50 | 1.00 | 0.50 | 0.50 |
| Mioinositol | 100.00 | 100.00 | — | 100.00 |
| Sacarosa | 30,000 | 20,000 | 50,000 | 20,000 |
| pH | 5.7 | 5.5 | 5.8 | 5.5 |

a. MS = Murashige et al., 1962; B5 = Gamborg et al., 1968; N6 = Chu et al., 1975; Wh = White, 1943. Con modificaciones de Yeoman et al., 1977 y Singh et al., 1981.

esenciales para el crecimiento de plantas enteras. En los medios de reciente desarrollo (MS, B5, N6) cabe destacar las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio con respecto al medio de White (Cuadro 2.2). El nitrógeno se suministra en forma de nitrato y amonio; aunque los cultivos pueden prosperar con solo nitrato o solo amonio como fuente nitrogenada, en este último caso el medio debe contener también ácido cítrico, succínico o málico. Otras fuentes de nitrógeno incluyen glutamina, urea y caseína hidrolizada (CH).

Los medios de cultivo contienen fósforo, calcio, magnesio y azufre en concentraciones de 1 a 3 mM. La adición de hierro conjuntamente con un agente quelante (Na_2EDTA) lo hace disponible en un amplio rango de pH.

Vitaminas. Si bien los medios de cultivo contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de tiamina.

Agente gelificante. En los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar (0.6% a 1.0%). Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizado pueden alterar las respuestas in vitro de los cultivos (Debergh, 1982).

Reguladores de crecimiento. En algunos casos se obtienen en los cultivos in vitro las respuestas deseadas mediante el empleo del MB sin reguladores de crecimiento; entre otros, es el caso de la obtención de plantas por cultivo de meristemas de *Vigna unguiculata* (Kantha et al., 1981b) y por cultivo de anteras de tabaco (Nitsch, 1969). Sin embargo, en la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo de las auxinas o las citocininas.

Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: 2,4-D, ANA, AIA, y AIB; las citocininas que más se emplean son: KIN, BAP, y ZEA.

Las giberelinas, especialmente el AG_3 , han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales como *Phaseolus vulgaris*, *Solanum tuberosum*, *Fragaria x ananassa*, *Manihot esculenta* y otras (ver revisión de Styer et al., 1983). El ácido abscísico (ABA) se emplea en ocasiones.

Otros componentes. Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos, y otros. Entre ellos están el agua de coco, AC, (5% a 15%, v/v), el jugo de frutos de tomate, el extracto de levadura, y el extracto de tubérculos de papa.

Además de glicina, en ocasiones se incorporan al medio otros aminoácidos como asparagina, cisteína y L-tirosina. En general, no son constituyentes esenciales de los medios e inclusive, en concentraciones relativamente altas, pueden tener efectos inhibitorios sobre los cultivos.

En algunos medios se adicionan ácidos orgánicos como el cítrico, el málico, el succínico y el pirúvico, como precursores de aminoácidos;

también es frecuente la adición de L-glutamina y de caseína hidrolizada (0.1% a 1%).

El empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteína, polivinilpirrolidona) puede ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. En estos casos también es útil usar las soluciones antioxidantes durante la preparación del explante, como también incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz. También se suele acortar el intervalo de tiempo entre subcultivos, como un medio para disminuir los efectos nocivos de la oxidación de polifenoles.

El carbón activado (0.1% a 5%), incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos.

Una amplia discusión sobre medios de cultivo se encuentra en el Capítulo 3.

Preparación del medio de cultivo

Es necesario preparar el medio utilizando agua bidestilada o agua desmineralizada-destilada (H₂O, DD) (ver Capítulo 1). Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la acumulación de contaminantes; todas las sustancias químicas usadas para su preparación deben ser de un alto grado de pureza.

El procedimiento para la preparación de los medios dependerá, en primera instancia, del tipo de medio, de su consistencia y de la presencia de componentes termolábiles. En general, se pueden distinguir:

- a. Medios semisólidos sin sustancias termolábiles; su preparación consta de los siguientes pasos:
 - 1) Incorporación del medio basal (MB), de los reguladores de crecimiento o de otros compuestos. Ajuste del pH.
 - 2) Adición y disolución del agar. Distribución en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas Petri, etc.).
 - 3) Esterilización en el autoclave (ver Capítulo 1).
- b. Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles. Para su preparación se sigue el mismo procedimiento de a., pero sin adicionar agar, y haciendo la esterilización por filtración (ver Capítulo 1) en el caso de medios que contengan sustancias termolábiles.

c. Medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles; para su preparación se sugieren las siguientes operaciones:

- 1) Incorporación de los compuestos que pueden ser esterilizados en el autoclave (tanto los del MB como los reguladores de crecimiento u otros compuestos). Ajuste del pH.
- 2) Adición y disolución del agar.
- 3) Esterilización en el autoclave.
- 4) Incorporación (operando en la cámara de transferencia) de la(s) sustancia(s) termolábil(es), previamente esterilizada(s) por filtración (ver Capítulo 1). Los componentes esterilizados (paso 3) se deben mantener a una temperatura entre 40 y 50 °C.
- 5) Distribución (operando en la cámara de transferencia) del medio en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas Petri, etc.) previamente esterilizados en el autoclave.

Preparación del medio basal (MB). En esta sección, y a manera de ejemplo, se describirá el procedimiento de Murashige et al. (1962) para preparar el medio basal (fuente de carbono + nutrimentos minerales + vitaminas); la composición de este medio se detalla en el Cuadro 2.2, columna MS. Si bien la preparación se puede llevar a cabo de diversas maneras, de acuerdo con el consumo y las facilidades disponibles en cada laboratorio, generalmente es conveniente prepararlo 10 veces más concentrado (MS x 10), procediendo de la siguiente manera:

1) Pesar, teniendo presente que se prepara MS x 10:

| | |
|--|-----------|
| NH ₄ NO ₃ | 16,500 mg |
| KNO ₃ | 19,000 mg |
| KH ₂ PO ₄ | 1,700 mg |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 3,700 mg |

Disolver en aproximadamente 300 ml de H₂O, DD.

- 2) Adicionar 10 ml de una solución de CaCl₂.2H₂O (44 g/ 100 ml de H₂O, DD).
- 3) Adicionar 10 ml de una solución que contenga 3.73 g de Na₂EDTA y 2.78 g de FeSO₄.7H₂O, disueltos en 100 ml de H₂O, DD. Esta solución se debe guardar en el refrigerador.

4) Adicionar 10 ml de una solución de KI (83 mg/ 100 ml de H₂O, DD). Esta solución se debe conservar en el refrigerador, en frascos a prueba de luz.

5) Adicionar 10 ml de una solución (conservada en refrigerador) que contenga:

| | |
|---|---------------------------------------|
| H ₃ BO ₃ | 620 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 2,230 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 860 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 25 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 2.5 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 2.5 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |

6) Adicionar 10 ml de una solución (conservada en el refrigerador), que contenga:

| | |
|------------------------|--|
| Glicina | 200 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |
| Tiamina-HCl | 10 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |
| Piridoxina-HCl | 50 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |
| Acido nicotínico | 50 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |
| Mioinositol | 10,000 mg/ 100 ml H ₂ O, DD |

7) Adicionar 300 g de sacarosa.

8) Completar hasta 1000 ml con H₂O, DD.

9) Repartir el medio así preparado en recipientes de diferente capacidad (10, 50, 100 cc, de acuerdo con las necesidades del laboratorio). Rotular "MS x 10" y almacenar en congelador (-5 a -20 °C) hasta cuando se utilice. Es aconsejable preparar el MB necesario teniendo en cuenta el consumo del laboratorio en un lapso determinado (un mes, por ejemplo).

Condiciones Ambientales para la Incubación

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados (ver Capítulo 1), por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura; estos dos factores están relativamente poco estudiados, y la información existente sobre ellos suele ser fragmentaria y a menudo contradictoria.

Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación (Martin, 1980; Hughes, 1981), así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (Seibert et al., 1980; Hughes, 1981). El

Cuadro 2.3 ilustra los efectos de algunos factores sobre la regeneración de plantas a partir de diferentes explantes de algunas leguminosas.

Cuadro 2.3. Efecto de la intensidad de la luz y de la temperatura en la regeneración de plantas por cultivo in vitro de meristemas y hojas.

| Luz ^a (lux) | Temperatura ^b (°C) | Explantes ^c que regeneran plantas o vástagos (%) en: | | |
|---------------------------|----------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| | | <i>Pisum sativum</i> (hoja joven) | <i>Vigna unguiculata</i> (meristema) | <i>Glycine max</i> (meristema) |
| 0 | 26/26 | 0 | — | — |
| 0 | 20/20 | 0 | — | — |
| 0 | 26/15 | 0 | — | — |
| 0 | 20/15 | 0 | — | — |
| 1000 | 26/26 | 8 | — | — |
| 1000 | 26/20 | 39 | — | — |
| 1000 | 26/15 | 17 | — | — |
| 1000 | 20/15 | 22 | — | — |
| 2000 | 26/26 | 14 | — | — |
| 2000 | 20/20 | 41 | — | — |
| 2000 | 26/15 | 30 | — | — |
| 2000 | 20/15 | 54 | — | — |
| 1200 | 26/26 | — | 75 | 7 |
| 1200 | 20/15 | — | 38 | 17 |
| 7500 | 26/26 | — | 100 | 35 |
| 7500 | 20/15 | — | — | 8 |

a. Fotoperíodo de 16 horas.

b. Numerador = temperatura durante el fotoperíodo; denominador = temperatura durante el escotoperíodo.

c. El símbolo (—) indica tratamientos no ensayados.

FUENTES: Rubluo et al., 1982 (para *P. sativum*); Kartha et al., 1981b (para *V. unguiculata* y *G. max*).

Para propósitos generales se sugiere utilizar, en el establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes (del tipo 'luz de día') y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperíodo/escotoperíodo de 16/8 h. En general, temperaturas entre 25 y 28 °C son adecuadas para el establecimiento de los cultivos.

Referencias

Bingham, E. T.; Hurley, L. V.; Kaatz, D. M. y Saunders, J. W. 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Sci.* 15:719-721.

- Biondi, S. y Thorpe, T. A. 1981. Requirements for a tissue culture facility. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York. p. 1-20.
- Bonga, J. M. 1980. Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. En: Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R. y Ciferri, O. (eds.). *Plant cell cultures: Results and perspectives*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Holanda. p. 253-264.
- Bovo, O. A. y Quarín, C. L. 1983. Obtención de plantas de *Paspalum alnum* (Gramineae) a partir del cultivo *in vitro* de ovarios jóvenes. *Phyton* 43:29-34.
- Boxus, P. H.; Quoirin, M. y Laine, J. M. 1977. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. Springer-Verlag, Berlín, Alemania. p. 130-143.
- Chu, C. C.; Wang, C. C.; Sun, C. S.; Hsu, C.; Yin, K. C. y Chu, C. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18:659-668.
- Clapham, D. H. 1977. Haploid induction in cereals. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. Springer-Verlag, Berlín, Alemania. p. 279-298.
- Debergh, P. 1982. Physical properties of culture media. En: Fujiwara, A. (ed.). *Plant tissue culture 1982*. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio. p. 135-136.
- Dodds, J. H. y Roberts, L. W. 1982. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press, Cambridge. 178 p.
- . 1983. Tissue culture of hardwoods. En: Dodds, J. H. (ed.). *Tissue culture of trees*. AVI Publishing. Co. Westport, Connecticut, E.U. p. 22-28.
- Dougall, D. K. 1980. Nutrition and metabolism. En: Staba, E. J. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 21-58.
- Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Flick, C. E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, New York. p. 45-113.
- Frankenberger, E. A.; Hasegawa, P. M. y Tigchelaar, E. C. 1981a. Influence of environment and developmental state on the shoot-forming capacity of tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol.* 102:221-232.
- ; ——— y ———. 1981b. Diallel analysis of shoot-forming capacity among selected tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol.* 102:233-242.

- Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- ; Murashige, T.; Thorpe, T. A. y Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro* 12:473-478.
- y Shyluk, J. P. 1981. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture.* Academic Press, Nueva York. p. 21-44.
- Gautheret, R. J. 1959. *La culture des tissus végétaux: Techniques et réalisations.* Masson, París. 863 p.
- Hu, C. Y. y Wang, P. J. 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, R. (eds.). *Handbook of plant cell culture.* MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 177-227.
- Hughes, K. W. 1981. *In vitro* ecology; exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *Env. Exp. Bot.* 21:281-288.
- Jensen, C. J. 1977. Monoploid production by chromosome elimination. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture.* Springer-Verlag, Berlín. p. 299-330.
- Jones, O. P.; Hopgood, M. E. y O'Farrell, D. 1977. Propagation *in vitro* of M.26 apple rootstocks. *J. Hort. Sci.* 52:235-238.
- Kao, K. N. y Michayluk, M. R. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* 96:135-141.
- y ———. 1981. Embryoid formation in alfalfa cell suspension cultures from different plants. *In vitro* 17:645-648.
- Kartha, K. K.; Gamborg, O. L.; Shyluk, J. P. y Constabel, F. 1976. Morphogenetic investigations on *in vitro* leaf culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. *Z. Pflanzenphysiol.* 77:292-301.
- ; Champoux, S.; Gamborg, O. L. y Pahl, K. 1977. *In vitro* propagation of tomato by shoot apical meristem culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102:346-349.
- ; Mroginski, L. A.; Pahl, K. y Leung, N. L. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. *Plant Sci. Lett.* 22:301-307.
- ; Pahl, K.; Leung, N. L. y Mroginski, L. A. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes: Soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. *Can. J. Bot.* 59:1671-1679.
- Litz, R. E. y Conover, R. A. 1979. Development of systems for obtaining paraxial *Carica* hybrids. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 92:281-283.

- y —— . 1981. In vitro polyembryony in *Carica papaya* L. ovules. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:285-288.
- Martin, S. M. 1980. Environmental factors; B: Temperature, aeration, and pH. En: Staba, J. E. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 143-148.
- Monnier, M. 1976. Culture in vitro de l'embryon immature de *Capsella bursa-pastoris* Moench. *Rev. Cyt. Biol. Végét.* 39:1-120.
- Mroginski, L. A. 1975. Plantas haploides de *Nicotiana* spp. obtenidas por cultivo in vitro de anteras. En: *Memorias de la Segunda Reunión Nacional Técnica del Tabaco*. Corrientes, Argentina. v. 1, p. 97-111.
- y Fernández, A. 1979. Cultivo in vitro de anteras de especies de *Arachis* (Leguminosae). *Oléagineux* 34:243-248.
- y Kartha, K. K. 1981a. Regeneration of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. *Plant Sci. Lett.* 23:245-251.
- y —— . 1981b. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L. cv. Century) plants by in vitro culture of immature leaflets. *Plant Cell Rep.* 1:64-66.
- ; —— y Shyluk, J. P. 1981. Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by in vitro culture of immature leaves. *Can. J. Bot.* 59:826-830.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nitsch, J. P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19:389-404.
- Oono, K. 1981. In vitro methods applied to rice. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York. p. 273-298.
- Pittman, R. N.; Banks, D. J.; Kirby, J. S.; Mitchell, E. D. y Richardson, P. E. 1983. In vitro culture of immature peanut (*Arachis* spp.) leaves: Morphogenesis and plantlet regeneration. *Peanut Sci.* 10:21-25.
- Reinert, J. y Yeoman, M. M. 1982. *Plant cell and tissue culture: A laboratory manual*. Springer-Verlag, Berlín. 83 p.
- Rey, H. Y. y Mroginski, L. A. 1978. Cultivo in vitro de ápices caulinares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Phyton* 36:171-176.
- ; —— y Fernández, A. 1980. Inducción de callos y raíces en explantos de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Phyton* 39:161-170.
- Rubluo, A.; Mroginski, L. A. y Kartha, K. 1982. Morphogenetic responses of pea leaflets cultured in vitro. En: Fujiwara, A. (ed.). *Plant tissue culture 1982*. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio. p. 151-152.

- Seabrook, J. E. A. 1980. Laboratory culture. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 1-20.
- Seibert, M. y Kadkade, P. G. 1980. Environmental factors; A: Light. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 123-141.
- Singh, M. y Krikorian, A. D. 1981. White's standard nutrient solution. Ann. of Bot. 47:133-139.
- Sondahl, M. R.; Spahlinger, D. A. y Sharp, W. R. 1979. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 94:101-108.
- Steward, F. C. 1983. Reflections on aseptic culture. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, R. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 1-10.
- Street, H. E. 1977a. Introduction. En: Street, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 1-10.
- . 1977b. Cell (suspension) cultures-techniques. En: Street, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 61-102.
- Styer, D. J. y Chin, C. K. 1983. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation. Hort. Rev. 5:221-277.
- Sunderland, N. 1974. Anther culture as a means of haploid induction. En: Kasha, K. J. (ed.). Haploids in higher plants: Advances and potential. The University of Guelph, Guelph, Canadá. p. 91-122.
- Thomas, E. y Davey, M. R. 1975. From single cells to plants. Wykeham Publ., Londres. 171 p.
- Wetter, L. R. y Constabel, F. 1982. Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada, Saskatoon, Canadá. 145 p.
- White, P. R. 1943. A handbook of plant tissue culture. The Ronald Press, Nueva York. 261 p.
- Xu, Z. y Sunderland, N. 1982. Inoculation density in the culture of barley anthers. Scientia Sinica (ser. B) 25:961-969.
- Yeoman, M. M. y MacLeod, A. J. 1977. Tissue (callus) culture-techniques. En: Street, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 31-59.
- Yeung, E. C.; Thorpe, T. A. y Jensen, C. J. 1981. In vitro fertilization and embryo culture. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 253-271.