

Capítulo 3

Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación

A. D. Krikorian*

* Department of Biochemistry, State University of New York at Stony Brook (SUNY), Nueva York, E. U.

Principios Generales y Estrategias de Diseño

Para crecer, las células requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados de plantas superiores e inferiores. Los nutrimentos orgánicos, al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles: uno macro y otro micro. Generalmente, las células en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministradas por el medio de cultivo; sin embargo, existe además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento.

A menudo, la necesidad de los factores orgánicos de crecimiento se hace evidente sólo cuando se considera un crecimiento largo y continuado o potencialmente indefinido. Aunque una planta verde intacta es autótrofa, las células de sus regiones de crecimiento pueden ser acentuadamente heterótrofas y requerir la aplicación de un número de estimulantes orgánicos complejos que, en el caso de la planta intacta, generalmente se derivan de las células verdes.

En consecuencia, la nutrición orgánica de las plantas es un tema muy amplio que se extiende desde la nutrición de bacterias y hongos, los variados requerimientos nutricionales de partes aisladas de plantas, los requerimientos especiales de embriones aislados, los tejidos cultivados, las células y protoplastos hasta el tema tan discutido de si las plantas superiores obtienen un beneficio especial de las complejas sustancias orgánicas que se encuentran presentes en el estiércol natural y en las coberturas protectoras. Este último punto incluye problemas diversos y de controversia como el del papel de la micorriza y el que discute si el papel de las sustancias orgánicas en el suelo es directo o si se debe a su efecto positivo en la solubilidad y disponibilidad de ciertos elementos esenciales.

En cuanto a los tejidos de plantas, desde 1940 se ha desarrollado una gran cantidad de trabajos sobre sus requerimientos nutricionales en medios estrictamente definidos. En términos generales, la mayor parte de tales tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de varias mezclas de sales minerales diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos. A menudo se utiliza la sacarosa como una fuente de energía. Algunos tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio completamente definido, mientras muchos otros no presentan crecimiento en soluciones salinas relativamente simples, a menos que se complementen con ciertos microelementos, vitaminas y otras sustancias promotoras del crecimiento de naturaleza completamente indefinida, tales

como el agua de coco (AC), la caseína hidrolizada (CH), los extractos de levadura y de malta, el endosperma líquido de la castaña de Indias, y otros semejantes.

¿Dónde se empieza? La literatura sobre el cultivo de tejidos en plantas se ha vuelto inmensa y desde hace mucho tiempo no ha podido ser examinada por una sola persona; es rica y muy variada. En este capítulo se trata de describir el desarrollo alcanzado en cuanto al diseño, la composición y la preparación de medios de cultivo, desde la perspectiva de las actuales bases clásicas. Es obvio que se hace referencia a publicaciones recientes más o menos especializadas en su tema, pero se le concede una atención especial a la literatura pionera sobre los fundamentos y principios al respecto. También se han incluido algunos títulos que tratan de la química y de la acción de los reguladores del crecimiento.

Es lamentable que no exista una sola fuente global de información libre de errores a la que se pueda dirigir un principiante; el problema se agrava por el hecho de que existen diversas filosofías o enfoques en los laboratorios y no hay uno solo que se prefiera sobre otro: "De un éxito nacen otros" (De Fossard, 1976; Evans et al., 1983; Sharp et al., 1984; Ammirato et al., 1984; Vasil, 1984, 1985, 1986; George et al., 1984).

Posiblemente, la formulación del medio para el cultivo de tejidos es más un arte que una disciplina por derecho propio; la experiencia es el mejor maestro en este tipo de trabajo, y éste es el mejor consejo u orientación que se le puede dar a un principiante.

Se debería interpretar el problema desde una perspectiva tan amplia como sea posible y comprender la parte básica del sistema biológico con el que se trabaja. Se debería, además, trabajar con materiales que estén definidos con precisión desde el punto de vista taxonómico, genético y del desarrollo; existen muchas evidencias que sugieren que la variación en la respuesta al cultivo de tejidos según el genotipo utilizado depende de la forma como se haga el cultivo. Sólo mediante una caracterización rigurosa del material biológico se puede empezar a investigar, tabular y comprender el rango y la magnitud de esta variación.

Al escudriñar la amplia literatura existente sobre cultivo de tejidos, a menudo se afronta el problema de interpretar con precisión qué material biológico o qué medio se ha utilizado en un conjunto dado de pruebas o experimentos. Son abismales a menudo las descripciones morfológicas de los orígenes del explante. La designación de fórmulas, generalmente por el nombre o los nombres de los investigadores que primero las publicaron,

resulta frecuentemente enredada por las adiciones, supresiones, o modificaciones de varios o de muchos de los componentes; adicionalmente, muchas publicaciones oscurecen, voluntaria o involuntariamente, lo que realmente constituyó una falta de precisión en el informe.

Para los informes, se debería adoptar en lo posible el sistema de taquigrafía, ya que permite tanto una precisión en el informe mismo como una claridad en el pensamiento en relación con el diseño del medio. Uno de tales sistemas útiles debería incluir la designación de las sales minerales utilizadas, el tipo y la cantidad de hierro, la fuente de carbono, los suplementos del crecimiento y el pH. Este sistema se explicará en detalle más adelante.

Medio Basal: Elementos Minerales

El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas. Se deben incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, y Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl); además, existe evidencia de que se debería añadir níquel en la lista (Eskew et al., 1984).

En los primeros tiempos del estudio de la nutrición mineral, los investigadores solían suministrar los elementos por medio de soluciones de cultivo de 'tres sales': KH_2PO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y MgSO_4 ; se incluía un poco de hierro, generalmente como fosfato ferroso $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$. Actualmente se sabe que los microelementos se suministraban involuntariamente como contaminantes. El conocimiento acerca de los requerimientos de nutrimentos minerales y de la formulación de las soluciones ha progresado mucho desde esos primeros tiempos (Hewitt, 1966; Lauchli et al., 1983; Saric et al., 1983), pero cabe recordar la base tan antigua de las fórmulas más recientes.

Nomenclatura general

Existe una variedad de fórmulas de sales minerales que se utilizan corrientemente en el cultivo de tejidos vegetales (Dougall, 1972; Kruse et al., 1973; Gamborg et al., 1976; Rechcigl, 1977, 1978; Thorpe, 1981; George et al., 1984). Según se mencionó antes, estas fórmulas generalmente recibieron su nombre de investigadores; hubiese sido preferible que nunca se hubieran adoptado estos nombres como códigos de fórmulas específicas, pero el hecho histórico es que se han utilizado así.

Con el fin de evitar cualquier posible confusión se definirán aquí las **sales minerales** como el medio basal; una **B** mayúscula indica que se trata de sales minerales. Si se utiliza la fórmula de sales minerales de Murashige et al. (1962), la designamos como B_{MS} ; si se utilizan las sales minerales de White entonces escribimos B_W ; las de Shenck y Hildebrandt (1972) se reducen a B_{SH} y así sucesivamente. Si la concentración de las sales se disminuye a un cuarto o a la mitad, o si se aumenta al doble o a otro factor, se deben hacer los respectivos ajustes al subíndice; por ejemplo: $B_{MS}\frac{1}{4}$, o $B_{MS}\frac{1}{2} + o B_{MS}x2$.

Como ha habido una confusión considerable en relación con las fórmulas de hierro que se han utilizado o se utilizan actualmente en varios laboratorios, se recomienda suministrar con precisión la que se utilice (Singh et al., 1980). A continuación se presenta como ejemplo la preparación de quelato de hierro (200X) según la fórmula de Murashige et al. (1962).

Disuelva 7.45 g de Na_2 -EDTA. $2H_2O$ en 900 ml de agua destilada, en un recipiente caliente; añada 5.57 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ mientras revuelve. Después que se haya formado el complejo, y se haya disuelto y enfriado, ajuste el volumen a 1000 ml. Consérvelo en una botella ámbar o en un recipiente oscurecido con papel de aluminio; puede almacenarlo a la temperatura del laboratorio.

Utilice 5 ml de esta solución madre para la preparación de un litro del medio final. Con esta fórmula se obtiene una solución 0.1 mM Fe-EDTA

Nota: si se forma un precipitado, deberá preparar una solución más diluida (por ejemplo 10X). Cuando se utiliza Na_2 EDTA (anhidro), sólo se requieren 6.72 g.

La fuente de carbono se designa más convenientemente por el porcentaje del peso en el volumen (p/v). La fórmula original de MS (1962) para los callos del tabaco utilizaba 3% de sacarosa, pero se hace necesario ensayar otros niveles para diferentes partes de la planta, especies o cultivares.

Aditivos como las vitaminas, el nitrógeno reducido en forma de caseína hidrolizada (ácida o enzimáticamente) o el inositol pueden designarse por + CH (seguido por la cantidad exacta), o + INOS (seguido por la cantidad exacta), respectivamente. Los aditivos tales como el AC y los reguladores del crecimiento (auxinas, citocininas o giberelinas) también pueden designarse por las abreviaturas correspondientes.

Si se sigue ese procedimiento, existen pocas posibilidades de malentendidos. Por ejemplo, $B_{MS} \frac{1}{2} + AC 10\% v/v + 2,4-D (1 \text{ mg/litro}) + \text{inositol} (500 \text{ mg/litro}) + CH (200 \text{ mg/litro})$ enzimática + 5% sacarosa + tiamina-HCl (0.1 mg/litro) + $FeNa_2-EDTA (0.1 \text{ mM})$, ajustado a un pH 5.0, significa claramente que se utilizaron las sales minerales de MS a la mitad de la concentración, pero se utilizó el hierro a la concentración completa. Se suplementó con agua de coco en 10% del volumen final. Se utilizó 1 mg/litro de 2,4-D, 500 mg/litro de inositol, y así sucesivamente. Se añadieron 5 g de sacarosa por cada 100 ml de medio preparado.

Este método no sólo suministra una información más comprensible y precisa de la composición del medio, sino que permite comparar y hacer contrastar los resultados de diferentes ensayos con relativa facilidad. Los efectos de los componentes simples sólo se pueden comparar si se cambia uno solo de los factores o pocos a la vez.

Componentes del medio de cultivo

Casi cualquiera de las fórmulas salinas basales de las soluciones de cultivo que se tienen actualmente como estándar debería ser más que suficiente para suministrar un mínimo esencial de los elementos requeridos. Sin embargo, sería útil ensayar estas soluciones a diferentes concentraciones totales; por ejemplo, el de Murashige es un medio con relativamente 'alto contenido de sal', mientras el medio de White (Singh et al., 1981) generalmente se considera como de 'bajo contenido de sal'. Muchos explantes crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido, lo que se puede hacer agregando sales de NH_4^+ o suplementando con urea o CH. El valor del medio de MS se atribuye en parte a sus altos niveles de NH_4^+ (y de K).

Todos los medios parecen beneficiarse en cierto grado con los suplementos vitamínicos, a menos que las células se vuelvan verdes o hasta que ello ocurra; los aditivos mínimos usuales son la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina. Por consiguiente, los suplementos vitamínicos son más o menos estándar; en realidad, la tiamina-HCl, como única vitamina añadida, puede ser suficiente en muchos casos (Linsmaier et al., 1965).

Algunos de los primeros aditivos orgánicos como la glicina se consideran actualmente dañinos. El uso frecuente del inositol en cantidades bastante altas (100 mg/litro) se explica ampliamente por su presencia en cantidades grandes en el suplemento del AC, que por sí sola o en combinación con otros compuestos estimula la división celular (Steward et al., 1955; Shantz et al., 1964; Pollard et al., 1961).

Las principales diferencias entre los medios de cultivo se relacionan con los diferentes compuestos utilizados para estimular la división celular. Para esto, se emplean generalmente: AC (5-15% v/w), o también 2,4-D, ANA, AIA, o benzotiazol-2-oxiacético (BTOA) solos o en combinación con el AC; éstos han resultado, generalmente, adecuados para iniciar y mantener cultivos de callos de la mayoría de los tejidos de plantas.

Sin embargo, se sabe que es un problema mayor estudiar todas las interacciones de los componentes (orgánicos e inorgánicos) de un medio de cultivo, y generalmente no es rentable hacerlo en esta etapa del conocimiento. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y luego complementarlo de diferentes formas; el 'arte' consiste en llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido la mejor oportunidad de desplegar su capacidad intrínseca para crecer. Algunos ejemplos recalcarán estos puntos.

Mientras que el medio basal de White sustenta el crecimiento activo de tejidos como los trozos explantados de la raíz de zanahoria (*Daucus carota* var. *sativa*), con tejidos y células de otras plantas se obtiene un mejor crecimiento en un medio de alta salinidad; este hecho resalta la importancia de reevaluar algún día los componentes minerales básicos del medio del cultivo de tejidos para cada tejido en particular. Un caso al respecto son los explantes del floema de raíces de zanahoria que crecen en un medio libre de calcio.

El medio de Nitsch (1951) es esencialmente una modificación de la solución de Knop, una de las primeras soluciones en el cultivo hidropónico (cerca de 1865). Este medio fue útil en el cultivo de partes de flores de tomate; la concentración de sacarosa utilizada era de 5% en lugar de 2% ó 3% utilizado en muchos otros medios.

El medio de Braun et al. (1962) es un medio de White modificado, ya que contiene 845 mg/litro de KCl, 1800 mg/litro de NaNO₃, 300 mg/litro de NaH₂PO₄.H₂O y 790 mg/litro de (NH₄)₂SO₄, además de lo que se encuentra en un medio (mineral) basal de White. También se añaden algunos suplementos orgánicos, por ejemplo la glutamina y la asparagina, y los dos nucleótidos ácido cítdílico y ácido guanílico; el inositol también está presente (100 mg/litro).

Braun et al. (1962) encontraron que las células normales (no habituadas) de *Vinca rosea* L. (*Catharanthus roseus* G. Don.) crecían rápidamente sin una fuente exógena de auxina. Ello se conseguía mediante el refuerzo del medio de White con las sales ya mencionadas, inositol y KIN; un examen cuidadoso de los cultivos mostró que los tejidos podrían sintetizar cantidades significativas de auxina. Los mismos investigadores encontraron

también que el efecto del NH_4^+ en el crecimiento de las células era sorprendente; cuando éste se añadía al medio básico que contenía niveles elevados de KCl , NaNO_3 y NaH_2PO_4 (como también KIN e inositol), el crecimiento era el doble del que se encontraba en un medio similar con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Se especuló que el inositol facilitaba sobremanera la absorción o la utilización de iones esenciales para activar ciertos sistemas biosintéticos en tejidos de *Catharanthus* (Braun et al., 1962). Murashige et al. (1962) recomendaron un medio MS para ensayos de médula de tabaco con el fin de obtener una alta tasa de crecimiento y un aumento en la respuesta a los factores orgánicos de crecimiento con un mínimo de interferencia con otros nutrimentos orgánicos e inorgánicos. Los extractos foliares del tabaco producían un aumento en el crecimiento de tejido medular aislado o en cultivos de callo de *Nicotiana tabacum* var. Havana Wisconsin 38; esto se debía, en parte, a constituyentes inorgánicos del extracto, especialmente el N y el K.

El medio 'revisado' que propusieron Murashige y Skoog es esencialmente una modificación de la fórmula basal original de White, a la que se añadieron 1650 mg/litro de NH_4NO_3 al igual que 170 mg/litro de KH_2PO_4 . El CaCl_2 reemplazó al $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; por consiguiente, este medio es de alta salinidad y puede esperarse que sustente el crecimiento de ciertos cultivos que requieren concentraciones más altas de iones.

Una modificación del medio MS (Lin et al., 1962) ha sido útil para la iniciación y mantenimiento de callos de menta (*Mentha piperita*). El uso de una alta concentración de inositol (5 g/litro) en estos cultivos plantea un interrogante en relación con los efectos osmóticos globales del medio de alta salinidad, en combinación con el inositol; no obstante, el efecto benéfico de la composición mineral de este medio en la iniciación del callo en la menta parece ser real.

Microelementos suplementarios

Los microelementos presentan un problema especial. Se supone que todos los conocidos y necesarios para las plantas enteras lo son también para las células y tejidos cultivados; sin embargo, los estudios detallados de Steward et al. (1968) se relacionan solamente con los requerimientos de Mn, Mo, Cu y Fe en explantes del floema radical de la zanahoria.

En términos generales, muy raras veces las soluciones basal de White modificada y otras son limitantes respecto a los elementos anteriores; en el

agua de coco, mediante un procedimiento rígido de purificación y resumen, se pueden obtener con dificultad cultivos deficientes en Mn, Mo y Cu; el requerimiento de Mo se reduce sobremedida en presencia de nitrógeno orgánico. En resumen, un medio de cultivo general (preparado con reactivos analíticos), con un suplemento de AC, muy raras veces resulta tóxico o deficiente a causa de los microelementos.

Nuevamente, el crecimiento está más limitado por las sustancias promotoras de la división celular que por los microelementos; sin embargo, cuando estas sustancias se conozcan totalmente, se puede investigar acerca de sus interacciones con los macro o los microelementos. Cuando parezca aconsejable utilizar elementos inorgánicos adicionales, se puede emplear la fórmula de Heller (1954) para los microelementos (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Solución madre (1000X) de microelementos de Heller para la preparación de un medio basal.^a

Compuesto	Cantidad (mg/litro)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1000
H ₃ BO ₃	1000
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.010
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.030
AlCl ₃	0.030
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.030
KI	0.010
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O ^b	0.250

a. Usar 1 ml de esta solución madre por litro de medio basal.

b. Este compuesto no forma parte de la fórmula original de Heller.

FUENTE: Heller, 1954.

Agua de Coco (AC) y Otros Endospermas Líquidos

En 1942, van Overbeek, Conklin y Blakeslee mostraron que los embriones en desarrollo de *Datura* se podían cultivar in vitro hasta su madurez, utilizando el endosperma líquido del coco (*Cocos nucifera*) como suplemento de un medio de cultivo estándar (van Overbeek et al., 1942; van Overbeek, 1942). Rápidamente aparecieron otros usos del AC (Ball, 1946).

En 1948, Caplin y Steward se dieron cuenta del potencial del AC (erróneamente llamado leche de coco) para inducir la división celular en tejidos diferenciados; lo observaron por primera vez en el parénquima del

floema secundario de la raíz de la zanahoria cultivada. Se sabía que el AC era sólo uno de los líquidos que, al ser nutritivos para los embriones inmaduros, podía producir el mismo efecto en tejidos y en células explantadas.

El endosperma líquido de *Zea mays* suministra una fuente alterna del AC para promover el crecimiento, pero con una diferencia importante. En el coco, una gran cantidad de endosperma líquido se desarrolla muy precozmente, y sirve para almacenar nutrimentos para el embrión en desarrollo; mientras el embrión siga latente, el endosperma líquido del coco inducirá la división celular. En el maíz, el endosperma crece inmediatamente después de la fertilización, y sólo en la llamada 'etapa lechosa' presenta una actividad estimuladora del crecimiento; esto generalmente ocurre, como máximo, dos semanas después de la polinización. En la madurez del grano, la actividad casi desaparece.

Los endospermas líquidos de los *Juglans* (nuez) (Steward et al., 1952a) y de *Aesculus woerlitzensis* (castaña de Indias) (Steward et al., 1959) provocan respuestas similares a las del AC (Shantz et al., 1964).

Un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular de explantes fue la observación de que el AC, a niveles relativamente bajos (5%-10% v/v), podía interactuar con las auxinas y promover el crecimiento, en situaciones en que por sí sola era ineficiente. El uso del AC y de 2,4-D en tubérculos de papa (Steward et al., 1951) y del AC y ANA por Morel et al. (1951) en las monocotiledóneas, fueron otros progresos importantes. Estas observaciones constituyen las bases para el uso del AC y sus sinergias en la nutrición de células y tejidos cultivados in vitro.

Composición del AC

El agua de coco (AC) es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos (Cuadro 3.2); tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y no es raro encontrar sales en ella. Aunque el AC es muy rica en magnesio y fosfato, no todos los elementos minerales que contiene son indispensables, y se pueden remplazar por un medio salino basal. El contenido de azúcar, de alrededor de 2.5%, no es algo fuera de lo común y se puede remplazar (se han identificado sustitutos como glucosa, fructosa, sacarosa y otros azúcares). Adicionalmente, se encuentra en ella nitrógeno no proteínico soluble en forma de aminoácidos.

El Cuadro 3.3 suministra un análisis representativo de ciertos compuestos de nitrógeno libre en el AC de nueces maduras provenientes de Puerto

Rico y de Filipinas. Se puede observar que en el agua de coco de Puerto Rico hay más aminoácidos totales (aproximadamente tres veces) que en la de Filipinas; ambas aguas son particularmente ricas en alanina y ácido aminobutírico. La ornitina también está presente en cantidades sustanciales en ambas muestras (se trata de una identificación cualitativa obtenida sólo por la posición de la columna de elución). Dependiendo del origen, el AC es rico o pobre en arginina.

Cuadro 3.2. Algunos componentes orgánicos del agua de coco (AC).

Aminoácidos	Vitaminas
Aspártico, glutámico	Acido nicotínico
Serina, aminobutírico	Acido pantoténico
Asparagina, Glicina	Biotina, Riboflavina
β -Alanina, Treonina	Acido fólico
Histidina, Glutamina	Tiamina
Arginina, Lisina	Piridoxina
Valina, Metionina	Acido ascórbico
Tirosina, Prolina	
Homoserina	Sustancias de crecimiento
Fenilalanina	
Hidroxiprolina	Auxina
	Giberelina
Otros compuestos nitrogenados	1,3-Difenilurea
	Zeatina
Amonio, Etanolamina	Glucósido de zeatina
Dihidroxifenilalanina	Ribósido de zeatina
Acidos orgánicos	
	Otros
Shikímico, quínico	ARN-Polimerasa
Pirrolidona-carboxílico	Uracilo, Adenina
Succínico, málico	Leucoantocianinas
Cítrico y desconocidos	Fosfatasa ácida
	Diaxstasa
Azúcares	Deshidrogenasa
	Peroxidasa
Sacarosa, Glucosa	Catalasa
Fructuosa	
Alcoholes de azúcar	
Sorbitol	
m-Inositol	
Siloinositol	

Cuadro 3.3. Compuestos nitrogenados presentes en el agua de coco (AC) de Puerto Rico y de Filipinas, y su contenido en términos de μg de aminoácido y μg de N por mililitro de agua entera.^a

Compuestos nitrogenados	Contenido de aminoácidos y N ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de muestra)			
	AC de Puerto Rico		AC de Filipinas	
	Aminoácido	N	Aminoácido	N
Acido aspártico	76	0.80	16	1.68
Acido glutámico	327	3.11	112	10.70
Serina	65	8.70	7	0.93
Glicina	22	4.09	2	0.37
Treonina	200	23.52	81	9.53
Alanina	468	73.80	183	28.80
Histidina	25	6.77	trazas	—
Lisina	72	13.80	16	3.07
Arginina	77	24.80	ausente	—
Metionina	18	1.69	5	0.47
Prolina	100	12.17	45	5.48
Valina	41	4.90	89	10.60
Isoleucina	30	3.20	1	0.11
Leucina	30	3.20	4	0.43
Fenilalanina	7	0.59	trazas	—
Tirosina	13	1.00	2	0.16
Acido aminobutírico	muy alto	—	muy alto	—
Urea (?)	presente	—	presente	—
Desconocido (139 ml pico de elución)	alto	—	alto	—
Desconocido (646 ml pico de elución)	(?)	—	?	—
Dihidroxifenilalanina (562 ml pico de elución)	ausente	—	presente	—
Ornitina (?)	99	21.00	22	4.68
Amoníaco	presente	—	presente	—
Etanolamina (?)	2	0.46	1	0.23
Total	1672	207.60	586.0	77.21

a. Todas las determinaciones se hicieron en el analizador automático de aminoácidos Spinco. Régimen de análisis de columna larga: pH 3.25 ± 0.01 (concentración de citrato de sodio 0.20 N) y pH 4.25 ± 0.02 (concentración de citrato de sodio 0.20 N); cambio de temperatura (30-50 °C cambio de amortiguación) a las 13 horas y 20 minutos. Régimen de la columna del medio: pH 4.26 ± 0.02 (concentración de citrato de sodio 0.38 N); cambio de temperatura (30-50 °C) a las 11 horas y 20 minutos.

En las muestras de AC de ambos sitios hubo dos aminoácidos que no se pudieron identificar críticamente. Uno de tales aminoácidos fue eluido a 139 ml y estaba presente en cantidad sustancial, como se evidenció por su reacción a la ninhidrina; el otro 'desconocido' apareció aproximadamente

a 646 ml y mediante su reacción a la ninhidrina se comprobó que no era abundante.

En el material de Filipinas se presentaba un aminoácido en la posición de la dihidroxifenilalanina (DOPA), es decir, en su punto de elución, pero no en el de Puerto Rico; tal sustancia pudo haber sido dihidroxifenilalanina aunque ello es cuestionable, ya que el AC rara vez se oscurece al exponerla al aire o a la oxidación.

Aunque en las muestras de coco incluidas en el Cuadro 3.3 no estaba presente el ácido piperólico, E. M. Shantz, quien trabajaba en el laboratorio F. C. Steward en la Universidad de Cornell, lo aisló en gran cantidad del agua de coco entera. También se ha logrado el aislamiento masal de ácido aminobutírico, alanina y ácido glutámico.

Se puede observar que la fuente geográfica de los cocos que se usaron para obtener el AC y, más probablemente, la época del año en que se cosecharon pueden tener una influencia significativa en los aminoácidos solubles presentes en el endosperma líquido; la etapa de desarrollo también desempeña un papel importante. Debido a esta variabilidad y a la falta de precisión en la composición de los lotes, muchos investigadores han abandonado el uso de aditivos naturales e incompletamente definidos.

Steward y Shantz dividieron los componentes de los líquidos que nutren a los embriones inmaduros en dos clases de compuestos: los sinérgicos y los activos, y han designado tales clases como fracciones 'neutras' y 'activas'. En un ensayo con floema radical de zanahoria (Steward et al., 1954a), estas clases resultaron inactivas por separado, pero muy activas en combinación. Adicionalmente, el efecto de esta combinación se estimula aún más por la presencia de nitrógeno reducido en forma de CH. Pollard et al. (1961) aislaron mioinositol, siloinositol, manitol y sorbitol de la fracción neutra del AC; esos alcoholes de azúcar se identificaron críticamente y se encontró que contribuyen de manera apreciable al potencial de esa fracción en la promoción del crecimiento.

Del AC se han aislado varias purinas (por ejemplo: adenina y uracilo) y hay fracciones que muestran la presencia de compuestos polifenólicos como las leucoantocianinas, que pueden promover la división celular. Se han identificado las adenilcitosininas, ZEA y ribosidozeatina (Letham, 1974; van Staden et al., 1974), y muchos investigadores consideran que, en la promoción de la división celular, estas sustancias se pueden sustituir por sustancias químicas. Sin embargo, utilizando ZEA en combinación con otras sustancias que se reconocen como presentes en el AC, nunca se puede alcanzar ni siquiera el crecimiento equivalente en sistemas tales como el del

ensayo del floema radical de zanahoria; este hecho refuerza la idea de que en el AC hay otras sustancias que todavía están por descubrir. Sin embargo, de los varios componentes del AC que promueven el crecimiento de muchos tejidos en cultivo, sólo la fracción activa requiere una identificación más completa (Shantz et al., 1964; Steward et al., 1971 y referencias allí citadas).

De lo anterior se puede ver que, aunque todavía no se conocen completamente todas las fracciones del AC, se sabe bastante sobre ellas. Llegará el día en que este líquido nutritivo sea remplazado por un medio completamente identificado; mientras tanto, su uso se justifica, no sólo por su excelente capacidad amortiguadora sino también porque sus cualidades promotoras del crecimiento frecuentemente son superiores en su totalidad a las de otros medios conocidos. Además, en aquellas áreas donde crece, el coco es significativamente más barato que compuestos purificados o sintéticos tales como la zeatina o el inositol.

Preparación del AC para el medio de cultivo

El procedimiento es el siguiente:

Consiga cocos pelados, preferiblemente recién cosechados y maduros. Abralos perforando dos o tres agujeritos en la parte final de la nuez, por medio de un taladro eléctrico. Drene separadamente el líquido de cada nuez a un vaso de laboratorio y examine su apariencia y olor para ver si hay daño, antes de combinarlo con los otros en un recipiente mayor. Cuele el líquido empleando dos o tres capas de lienzo para extraer pedacitos de cáscara o fibras y otros componentes que caen en el agua durante el procesamiento.

Coloque el agua en un matraz, tápela con algodón no absorbente y esterilícela en el autoclave a 15 libras de presión, durante 20 minutos. Este proceso precipitará gran cantidad de proteínas presentes en el AC.

Después de dejar que el agua se enfríe (preferiblemente a la mañana siguiente), se filtra con papel filtro Whatman no. 2; primero se decanta el líquido claro de la parte superior y, finalmente, la porción que contiene el precipitado floculento. Los embudos Buchner al vacío facilitarán la filtración de la porción inferior. Recombine las porciones, mezcle bien y coloque el agua preparada en cajas o recipientes de congelador (cualquiera que se utilice para congelar vegetales o frutas puede servir). No llene en exceso el recipiente: permita alrededor de una

pulgada de espacio superior, para la expansión durante el congelamiento. Almacene estas cajas o recipientes en el congelador hasta cuando se necesiten.

Cuando se prevea el uso del AC, se descongela (lentamente) un recipiente cada vez, calentando con agua tibia y transfiriendo todo el contenido a un vaso de laboratorio de acero inoxidable o Pyrex. Cuando se haya derretido, se cuele el AC una vez más con tres o cuatro capas de lienzo y se distribuye el contenido en pequeñas botellas (capacidad de 50-100 ml), que puedan quedar paradas en el compartimiento del congelador. En algunas ocasiones se requiere filtrar con Whatman no. 2.

Se utiliza el AC de las pequeñas botellas según las necesidades, teniendo la precaución de no dejarla a la temperatura del cuarto durante mucho tiempo, ya que se contamina muy rápidamente con bacterias. Cualquier cantidad de agua que quede en la botella se vuelve a almacenar en el compartimiento del congelador.

Aminoácidos como Suplementos del Medio Basal

Generalmente se ha reconocido que los aminoácidos, suministrados como extracto de levadura (Sandstedt et al., 1960) o como CH (Shantz et al., 1959), pueden promover el crecimiento de ciertos cultivos; en algunos sistemas de cultivo de tejidos como el del tabaco, dos constituyentes del medio de cultivo (el ácido aspártico y el ácido glutámico) promueven el crecimiento en la misma forma en que lo hace el complemento aminoácido completo presente en el extracto de levadura. Otros investigadores han encontrado que algunos aminoácidos en forma individual pueden ser inhibidores mientras que otros no lo son. Steward et al. (1958) discuten los efectos de varios compuestos nitrogenados en el crecimiento de los cultivos.

Se puede encontrar una fácil explicación para tales contradicciones. Frecuentemente, y por razones que no son claras, los aminoácidos adicionados al medio de cultivo corresponden a la forma DL, la cual es a menudo inhibidora, mientras la forma L es benéfica; además, obtener muestras estrictamente puras de muchas de estas sustancias es más difícil de lo que se espera. Por otra parte, si los aminoácidos se esterilizan en un autoclave en contacto con un medio de cultivo, a menudo los compuestos de nitrógeno simples producen muchos otros que pueden ser inhibidores. Por ejemplo, la urea, ensayada como urea-C¹⁴, produjo por lo menos 25 sustancias, una de las cuales es poderosa inhibidora de la división celular (Pollard, 1962);

por otra parte, el triptófano puede producir sustancias que son estimuladoras (Nitsch et al., 1957; Shantz et al., 1964).

Algunos aminoácidos y sus efectos

En cualquier caso, el papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales cultivadas se debe considerar como un problema complejo, ya que muchos tejidos responden diferentemente a los suplementos de aminoácidos. La interpretación de la literatura no siempre es fácil, debido a sus contradicciones inherentes.

Trabajando con células tumorales de abeto, Risser et al. (1964) encontraron que de 17 aminoácidos, la tirosina, la glutamina, la fenilalanina, la asparagina, y los ácidos aspártico y glutámico eran necesarios y no se podrían remplazar. Se encontró que la alanina, la glutamina y los ácidos glutámico y aspártico, así como el ácido aminobutírico tenían un efecto sobresaliente en el crecimiento de los tejidos de zanahoria, en ausencia de nitratos.

Las funciones estratégicas de estos aminoácidos (especialmente la alanina y la glutamina) en el metabolismo ofrecen una explicación directa de la actividad de estos compuestos. Aunque es interesante observar que los cultivos de zanahoria pueden sintetizar la glutamina a partir del ácido aminobutírico (o de la urea), puede no haber un requerimiento específico para la glutamina como tal. La asparagina también serviría como una fuente de nitrógeno, pero sus efectos son un poco menores que los de la glutamina. Los beneficios aparentes de L-asparagina (180 mg/litro) en cultivo de tejidos de frutos (Letham, 1960) ilustran este caso. Igualmente, aunque la alanina es un buen estimulante del crecimiento, puede prescindirse de ella ya que es fabricada fácilmente por los cultivos de tejidos a partir de otros sustratos (Bidwell et al., 1964).

Se ha encontrado que los aminoácidos leucina y glicina tienen efectos muy profundos en la morfogénesis. Waris (1962), trabajando con la umbelífera *Oenanthe lachenalii* encontró que L-leucina, en una concentración muy crítica, inducía la reproducción vegetativa de nódulos similares al callo, que presentaban constricción y se desprendían de los ápices de vástagos de la planta original. El cambio morfológico era irreversible. La glicina también indujo estos llamados 'neomorfos' pero sus efectos fueron reversibles.

Es interesante observar que la glicina es un constituyente normal de los suplementos orgánicos de White (White, 1963; Singh et al., 1981). El

motivo principal por el que White (1939; 1943) utilizó el extracto de levadura fue que lo encontró especialmente benéfico en algunos casos, tales como en los cultivos de raíces de tomate, donde la glicina representaba alrededor del 0.5% de su contenido de aminoácidos; sin embargo, Linsmaier et al. (1965) encontraron que no tenía efecto benéfico y que incluso era tóxico para los cultivos de tabaco, por lo que suprimieron del medio basal todas las sustancias 'microorgánicas' con excepción de la tiamina.

Aunque las proteínas de las plantas contienen cantidades bajas de aminoácidos sulfúricos como la cisteína y la metionina (Durzan et al., 1983), éstos son necesarios para un crecimiento y desarrollo normales.

Se ha demostrado que la cisteína puede tener dos efectos completamente diferentes según la modalidad de esterilización (Nitsch et al., 1957); cuando se esteriliza con filtro, es inhibidora al nivel de 1-2 μmol , y cuando se usa el autoclave, aparentemente se descompone y actúa como una fuente de azufre. Letham (1960) consideraba que la cisteína, a un nivel de 10 mg/litro, era necesaria para el cultivo de tejidos de manzana; sin embargo, la cisteína no tiene un efecto aparente en muchos otros tejidos que crecen en cultivos.

No obstante, parece razonable que para cualquier tejido recalcitrante se debería ensayar una fuente de aminoácido con azufre como la cisteína o la metionina. La mayoría de los suplementos aminoácidos estándar y, por supuesto, los complejos contienen una o ambas de estas dos sustancias.

Asimismo, los aminoácidos aromáticos, especialmente la tirosina, el triptófano y la fenilalanina, presentan problemas para su interpretación. Skoog y su grupo clasificaron la tirosina como efectiva para promover el desarrollo de yemas en el cultivo de tabaco (Skoog et al., 1957); en comparación, la fenilalanina sólo tenía un pequeño efecto y el triptófano (que es desaminado oxidativamente para producir AIA) era inactivo.

Un informe anterior de Reinert y White (1956) decía que la tirosina permitía el crecimiento de tejido tumoral de abeto, que de otra forma sería recalcitrante; se suponía, con poca evidencia, que esta sustancia retrasaba o evitaba la formación de melanina en los tejidos de *Picea glauca* y así les permitía crecer. Sin embargo, aquí la lógica parece inconsistente con lo que se sabe sobre la formación de melanina; en realidad, ese mismo medio puede ocasionar ennegrecimiento en algunos tejidos.

Por otra parte, la amplia gama de suplementos propuesta por Reinert y White (1956) pone en tela de juicio la pureza de los componentes utilizados. Estos investigadores no han tratado de purificar adicionalmente tales

compuestos; en el Cuadro 3.4, que presenta los numerosos suplementos del medio usado por ellos, se puede ver fácilmente la justificación de nuestro cuestionamiento sobre las conclusiones de sus experimentos. Aun así, los cuadros suministran un buen ejemplo de las varias fórmulas de este tipo, complejas 'a la fuerza', que se encuentran ocasionalmente.

Cuadro 3.4. Suplementos de Reinert y White (1956) utilizados para el establecimiento de cultivos de *Picea glauca*, y su dosis de medio mineral basal 1942 de White. Todos los suplementos se esterilizan mediante filtración.

Aminoácidos	Cantidad (mg/litro)	Suplementos orgánicos	Cantidad (mg/litro)
L-lisina-HCl	15.6	Inositol	100.00
L-arginina-HCl	7.8	Biotina	0.01
L-histidina-HCl	2.6	Pantotenato de calcio	0.10
DL-metionina	13.0	Acido ascórbico	0.10
DL-treonina	13.0	Riboflavina	0.10
DL-valina	10.4	Cloruro de colina	10.00
DL-fenilalanina	5.0	L-asparagina	20.00
L-leucina	15.6	Glutamina	50.00
L-triptófano	4.0	Hipoxantina	25.00
Acido L-glutámico	14.0	Tirosina	40.00
Acido L-aspártico	6.0		
L-prolina	5.0	[2,4.-D	0.05]
Glicina	10.0		

FUENTE: Singh et al., 1981.

Caseína hidrolizada (CH)

De los pocos ejemplos mencionados anteriormente se puede deducir que, por lo menos, se debería ensayar un suplemento de los aminoácidos, como la CH (200 mg/litro); ésta se puede aplicar, en forma rutinaria, en muchos casos en que se desee ver si se puede aumentar el crecimiento por medio del suministro de una fuente de nitrógeno reducido.

El Cuadro 3.5 muestra la composición de la caseína hidrolizada ácida y enzimáticamente, según se ha determinado en un analizador de aminoácidos.

La CH digerida enzimáticamente se ha utilizado de forma rutinaria como un suplemento de medios de cultivo para plantas (Steward et al., 1954b); se prefiere esta caseína porque la hidrólisis ácida destruye el

Cuadro 3.5. Componentes nitrogenados^a de la caseína hidrolizada con ácidos y con enzimas.

Componentes	Contenido según hidrólisis (mg/100 mg CH)			
	En hidrólisis ácida		En hidrólisis enzimática	
	Aminoácido	N	Aminoácido	N
Acido cisteico	Presente	—	Presente	—
Acido aspártico	4.18	0.435	0.836	0.088
Acido glutámico	10.80	1.030	3.550	0.338
Serina	2.39	0.319	2.250	0.300
Glicina	2.18	0.405	0.334	0.062
Treonina	3.32	0.390	1.490	0.175
Alanina	1.63	0.257	1.380	0.217
Histidina	1.39	0.376	0.403	0.109
Lisina	3.35	0.642	2.810	0.538
Arginina	1.08	0.347	0.836	0.269
Metionina	1.02	0.096	1.270	0.119
Prolina	4.65	0.566	0.941	0.115
Valina	3.23	0.386	3.080	0.368
Isoleucina	1.22	0.130	2.150	0.230
Leucina	3.32	0.352	3.910	0.418
Fenilalanina	1.10	0.093	2.530	0.215
Triptófano	0.00	—	2.040	0.280
Tirosina	0.181	0.014	1.540	0.119
Amoníaco	0.509	0.419	0.208	0.171
Total	45.50	6.26	31.56	4.13

a. Se expresan en términos de mg de aminoácidos o mg de N por 100 mg de CH. Las determinaciones se efectuaron en un analizador automático de aminoácidos Spinco. Los compuestos no identificados eluidos a 40, 43, 99, 105, 155, 162, 195, 210, 430, 442 ml, y otros picos, se identificaron como citrulina, ácido amino-n-butírico y cistationina sólo por la posición en que estaban presentes en la caseína hidrolizada enzimáticamente; estaban ausentes en la caseína ácido-hidrolizada.

triptófano presente en la sustancia. Sin embargo, en la caseína digerida enzimáticamente hay un gran número de compuestos que no se han identificado, aunque están presentes en cantidades mínimas; en las muestras mencionadas aquí, se han identificado algunos únicamente en forma tentativa, mientras otros simplemente se mencionan como una interrogante de 'X' ml de eluido.

Se desconoce la importancia que las sustancias presentes, pero no identificadas, tienen como promotoras del crecimiento y generalmente estamos obligados a suponer que simplemente se añaden al suministro de nitrógeno total disponible.