

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN (Modalidad Pasantía)

Título: “Propagación de plantas *in vitro*” Autor:

Renzo Pablo Cramazzi

Docente Asesor: Lic. (Dra.) Natalia Dolce

Lugar de trabajo: Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, Departamento de Básicas Agronómicas. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Cátedra de Fisiología Vegetal.

Tribunal: (Dra.) Fabiana D. Espasandin, Ing. Agr. Florencia Galdeano y Lic. (Dra.) Elsa C. Lattar

INTRODUCCIÓN

Con el nombre de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se engloba un grupo heterogéneo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal que puede ser un órgano, tejido, células, protoplastos) es incubado asépticamente en medios de composición química definida y bajo condiciones ambientales controladas (Mroginski y Roca, 1991), con el propósito de proporcionarle las condiciones apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (hongos, bacterias).

Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales se remontan hacia finales del siglo XIX, pero recién en 1922 se logró el primer experimento exitoso: la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas (Knudson, 1922). Actualmente esta técnica tiene numerosas aplicaciones, que pueden resumirse brevemente en las siguientes:

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos o en vías de extinción.
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables.
- Saneamiento de plantas (incluyendo la obtención de plantas libres de virus).
- Germinación de semillas y embriones aislados.
- Producción de semillas sintéticas.
- Mejora genética de plantas (incluyendo obtención de nuevos híbridos y plantas transgénicas).
- Producción de plantas haploides.
- Conservación e intercambio de germoplasma.
- Producción y bioconversión de compuestos útiles.
- Estudios básicos de fisiología, genética y bioquímica.

Considerando las numerosas y diferentes aplicaciones que puede tener el cultivo de tejidos vegetales, surge que el establecimiento de los cultivos, 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. 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 (Mroginski y Roca, 1991).

Bases biológicas del cultivo de tejidos: la totipotencialidad celular. El principio de “totipotencialidad de las células vegetales” expresa que toda célula viva, cualquiera sea su grado de especialización, conserva su genoma intacto y en consecuencia posee la capacidad potencial para dar origen a todos los tipos de células diferenciadas de un organismo dado, así como para convertirse en una planta entera exactamente igual a la que le dio origen. El mismo constituye el principio rector del cultivo *in vitro* de los vegetales (Steward et al., 1958; Krikorian y Berquam, 1969). Esta capacidad de las células vegetales es un factor clave en el desarrollo de plantas transgénicas dado que, una vez realizada la transformación (ya sea por *Agrobacterium* o por el método de biobalística) el paso siguiente es el cultivo *in vitro* con el fin de obtener, a partir del explante inicial transformado, plántulas que lleven el transgén en todas sus células.

La regeneración de plantas en sistemas *in vitro* tiene lugar, básicamente, a través de dos vías: organogénesis y embriogénesis somática. La organogénesis hace referencia a la formación y desarrollo de órganos, tales como raíces y vástagos, a partir de un explante (Minocha y Jain, 2000) y la embriogénesis somática o adventicia al proceso de iniciación y desarrollo de estructuras similares a un embrión a partir de células que no son producto de la fusión de gametos (Tisserat et al., 1979). A su vez, tanto la organogénesis como la embriogénesis somática pueden ocurrir de manera indirecta (mediada por una fase intermedia de callo) o directa (sin una fase intermedia de callo). En ambos sistemas, la factibilidad de regeneración varía con el genotipo y entre las células que constituyen una misma planta. Entre los factores fisiológicos que afectan el proceso de regeneración se pueden mencionar: el explante (tipo de tejido u órgano y el estado de desarrollo del tejido), el medio de cultivo (sales inorgánicas, sustancias orgánicas y complejos naturales de composición indefinida) y las condiciones físicas de incubación humedad, luz, temperatura (Litz y Jarret, 1991).

Regeneración de plantas *in vitro*. Uno de los usos más difundidos del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es la propagación masiva de plantas. Esta técnica es muy utilizada especialmente en especies de importancia económica (hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales) así como en especies con difícil propagación por otros métodos o en vías de extinción. Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a mayor escala de producción. En los protocolos utilizados generalmente pueden distinguirse las siguientes etapas:

- 1) Elección de la planta y/o tejido donante de explantes.
- 2) Establecimiento *in vitro*: que consiste en la desinfección de los explantes (generalmente con hipoclorito de sodio) y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir el desarrollo de callo o la diferenciación de órganos o embriones somáticos, según se desee.

- 3) Multiplicación a partir de los explantes establecidos *in vitro*, para la regeneración del número de plantas necesarias.
- 4) Enraizamiento: en algunos casos es necesaria esta etapa, en la que se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes obtenidos en plantas completas.
- 5) Rusticación: que es la aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones de crecimiento *ex vitro*.

Como se mencionó anteriormente, el éxito de la técnica depende de muchos factores, entre ellos el genotipo, la edad de la planta (a mayor edad, menor potencial de regeneración), el medio de cultivo y las condiciones físicas de incubación.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue adquirir los conocimientos básicos respecto al manejo de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, como ser la formulación de medios basales y de reguladores de crecimiento vegetal, preparación y esterilización de medios de cultivo, desinfección de diferentes explantes, uso de una cabina de flujo laminar de aire estéril y control de las condiciones asépticas de los cultivos para la regeneración de plantas *in vitro*; así como también adquirir nociones referentes a la aclimatación de las plantas regeneradas para su crecimiento en condiciones *ex vitro*.

TAREAS DESARROLLADAS

1. Lugar de Trabajo

La presente pasantía se realizó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNNE)

2. Trabajos en Laboratorio

Preparación de medios de cultivo

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y crecimiento de los cultivos *in vitro*. Se ha descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de tejidos vegetales (Heller, 1953; Murashige y Skoog, 1962; Gamborg, 1968; Schenk y Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo se componen, básicamente, de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, fuente de carbono y reguladores del crecimiento vegetal.

a. Sales minerales. La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (C, H, O, N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (Bo, Mn, Zn, Cu, Co, Cl, Mo, Fe). La concentración de estos elementos

dependerá de los requerimientos de las especies, la finalidad del cultivo o de la formulación a preparar. Representan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas.

Las drogas que se utilizan en la preparación de los medios de cultivo son de calidad analítica o pro-análisis dado que al ser una formulación de composición exacta, deben ser de excelente calidad y no contener otros contaminantes como metales pesados o trazas de otros minerales.

b. Sustancias vitamínicas y aminoácidos. Las vitaminas son utilizadas como catalizadores en varios procesos metabólicos, se añaden al medio de cultivo para estimular el crecimiento de los tejidos. Diversos autores han considerado a la tiamina como esencial para un buen crecimiento de los explantes. La piridoxina, ácido nicotínico, riboflavina (complejo de vitamina B), han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento de cultivos axénicos.

El myo-inositol (isómero del inositol) también ha sido considerado como parte integrante del complejo vitamínico B aunque químicamente es un carbohidrato. Se utiliza ampliamente en el medio de Murashige y Skoog (1962) así como en otras formulaciones, a razón de 100mg/L por su efecto estimulante del crecimiento y división celular en numerosas especies.

Los aminoácidos como la glicina son utilizados como fuentes de nitrógeno reducido y son favorables en procesos de activa división celular (proliferación de callos) y en la regeneración de órganos (organogénesis directa y/o indirecta) en explantes cultivados *in vitro*. El aporte de mezclas de aminoácidos generalmente se logra utilizando peptona de soja, peptona de carne, caseína hidrolizada o extracto de levadura.

c. Fuente de carbono. Las plantas cultivadas *in vitro* son heterótrofas, por lo que la fuente de carbono necesaria debe ser suministrada en el medio básico. En la preparación de un medio de cultivo es de amplia utilización como fuente de carbono la sacarosa en concentraciones de 2 al 5%. También se pueden utilizar glucosa, fructosa, maltosa y galactosa, aunque son menos efectivas y más costosas. En laboratorios de propagación de plantas con fines comerciales, la sacarosa puede ser sustituida por azúcar comercial con buenos resultados y ahorro considerable en los gastos.

d. Sustancias reguladoras del crecimiento. Los reguladores del crecimiento vegetal, también conocidas como hormonas vegetales o fitohormonas, son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas (cercanas a 1 mM).

A medida que se fue identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas y de las interacciones entre reguladores de crecimiento, así como de diversos factores ambientales. Por lo tanto, es riesgoso

generalizar acerca de sus efectos sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury y Ross, 1994).

Los reguladores de crecimiento se agrupan en varias categorías, de acuerdo a su estructura y función en los tejidos; siendo corrientemente utilizados en cultivos *in vitro* los siguientes:

Auxinas: promueven la división celular; entre las más usadas en el cultivo *in vitro* de tejidos se encuentran el ácido 3-indolacético (AIA), el ácido α -naftalenacético (ANA), el ácido 3-indolbutírico (IBA) y ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D). Para solubilizarlas se utiliza un volumen pequeño (2-3 ml) de KOH 0,5 N y luego se agrega agua destilada hasta completar el volumen. Por lo general se usan en concentraciones entre 0,01 y 10 mg/L.

Citocininas: estimulan la morfogénesis y diferenciación celular; entre las más usadas están la cinetina (KIN), benzyl aminopurina (BAP) y zeatina (ZEA). Se disuelven en un volumen pequeño (2-3 ml) de HCl 0,5 N. Se usan en concentraciones entre 0,05 y 10 mg/L.

Giberelinas: estimulan el alargamiento celular. La más usada es el ácido giberélico (GA3). Se usa en el cultivo de meristemas y para elongación de brotes, así como para la germinación de semillas y de embriones cultivados *in vitro*.

e. Agentes gelificantes. Si bien los medios nutritivos pueden ser líquidos o semisólidos, en general son solidificados por medio de un agente gelificante que permite mantener el explante sembrado en la superficie. El agar-agar es el material de soporte más utilizado por proveer al medio de un excelente gel húmedo, permitir una difusión iónica adecuada y una oxigenación correcta en los tejidos sumergidos en el medio nutritivo; presenta apariencia semi cristalina u opaca. Sin embargo, el agar no es fisiológicamente inerte puesto que posee diversas impurezas que deberán ser tenidas en cuenta al momento de su utilización. Generalmente se utiliza en concentraciones 5 a 8 g/L.

Por otra parte, el phytigel es un gelificante sintético de alta transparencia (facilita la detección de contaminantes), con bajo porcentaje de impurezas y gran capacidad gelificante. Aunque se utiliza en menor cantidad (1,5 a 2 g/L), su costo es superior al agar en igualdad de pureza y representa un porcentaje importante en el total del costo del medio nutritivo. El agargel es una mezcla de 3:7 de agar y phytigel.

f. Otros compuestos orgánicos de composición no bien definida. En algunos casos se adicionan al medio de cultivo otros compuestos como ser el carbón activado (CA), el puré de bananas verdes, el agua de coco. De ellos, el CA es ampliamente utilizado en cultivo *in vitro* porque adsorbe en su superficie porosa las sustancias fenólicas y otras sustancias tóxicas excretadas por los explantes y que se acumulan en el medio nutritivo dañando los tejidos, oxidando a los mismos y provocando su muerte. Asimismo, posee un efecto favorable en el desarrollo radicular al promover el oscurecimiento del medio de cultivo. El CA se utiliza a razón de 250 a 5.000 mg/L y es muy importante conocer la calidad química del mismo. Otra sustancia muy utilizada es el agua de coco, por su rico contenido de auxinas y citocininas naturales, así como vitaminas y azúcares.

Ensayos Realizados

En el desarrollo de esta pasantía se trabajó con el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962), un medio de cultivo de uso generalizado en diferentes laboratorios del mundo dado que contiene los micronutrientes y macronutrientes necesarios para el cultivo de diversos tejidos vegetales. En el Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Cátedra de Fisiología Vegetal (FCA-UNNE), debido al gran consumo de este medio basal, se adoptó la metodología de prepararlo 10 veces más concentrado (MS x 10) y conservarlo en un freezer a -20 °C (con la sacarosa incorporada dado que impide la precipitación de sales, probablemente por disminuir el potencial osmótico de la solución haciéndola más estable). De esta manera se reduce significativamente el espacio necesario para su almacenamiento y se optimiza el tiempo de preparación de los medios de cultivo.

Se prepararon medios de cultivo constituidos por MS en su formulación completa o diluida al 50%. El primer paso consiste en retirar del freezer el medio basal concentrado (MS x 10) y descongelarlo en un microondas (3-4 min). Mientras se realiza el descongelado se procede a rotular los vasos de precipitado que serán usados para la preparación, indicando la composición correspondiente del medio de cultivo. Para preparar 2.000 mL de MS en su formulación completa se miden 200 mL de MS x 10 y se colocan en el vaso de precipitado, agregando luego 1.800 mL de agua desmineralizada. Por otra parte, cuando se prepararon medios que contenían el medio básico MS diluido al 50% de su concentración, se utilizaron 100 mL de MS x 10 para un volumen final de 2.000 mL. Puesto que en todos los casos se utilizó sacarosa al 3%, en los medios diluidos al 50% se adicionó sacarosa a razón de 15 g/L para corregir su concentración final. En algunos casos también se incorporó carbón activado (CA) en concentración de 250 o 500 mg/L. A continuación, se ajusta el pH del medio (usando un pHchímetro marca ALTRONIX® modelo TPX1) a 5,8 con el agregado de HCl y/o K(OH) y luego se agrega el agente gelificante (en general se usó agar Sigma® A1296 de calidad ultra en una concentración de 6,5 g/L)

Para la disolución del agar, los vasos de precipitado conteniendo los medios de cultivo se colocan dentro de un microondas hasta un incipiente hervor realizado 2 veces, vigilando periódicamente para evitar derrames dentro del microondas. Una vez disuelto el agar, el medio de cultivo se vierte en los tubos o frascos con la ayuda de un dosificador automático, cuyo funcionamiento se detalla más adelante (ver Anexo). Los recipientes más usados a lo largo de esta pasantía fueron frascos de vidrio de 100 o 300 cm³ de capacidad conteniendo respectivamente 25 o 60 ml de medio nutritivo semisólido (en los cuales se cultivaron semillas, protocormos y plántulas de diferentes especies de orquídeas) y tubos de 15 ml conteniendo 4 ml de medio nutritivo en los que se cultivaron principalmente microestacas de *Vanilla planifolia*, híbridos del género *Turnera* y diversas especies del género *Arachis*.



Fig 1a: Disolución de MS a 1000ml



Fig 1b: Preparación de tubetes para autoclave

Esterilización de los medios nutritivos.

Finalmente, los medios de cultivo se esterilizan en autoclave a $1,45 \text{ kg cm}^{-2}$ y 120°C durante 20 min. En el laboratorio de la Cátedra de Fisiología Vegetal, esta tarea se realizó utilizando una autoclave manual modelo Chamberlain de 60 cm de profundidad y de 40 cm de diámetro. Primeramente se controla el nivel de agua destilada en el fondo de la misma y luego se colocan en su interior los diferentes recipientes de vidrio (tubos y frascos) tapados conteniendo los medios nutritivos. A continuación, se cierra la tapa de la autoclave y se enciende el mechero controlando que la válvula de escape o espita esté abierta. Cuando se observa la salida suficiente de vapor a través de ella, se la cierra y controla que la presión en el manómetro llegue a 1 atm. Luego se baja la llama y se controló que la presión se mantenga constante durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, se apaga el mechero y se espera a que la presión en el interior se iguale con la presión atmosférica externa para abrir la espita. Finalmente, se abre la tapa de la autoclave y se procede a retirar los recipientes con los medios de cultivo recientemente esterilizados. Los mismos se dejan enfriar a temperatura ambiente, procediendo a agitarlos suavemente en aquellos medios nutritivos que contienen carbón activado en suspensión para mantenerlos lo más homogéneos posible.

Los frascos conteniendo los medios de cultivo completamente gelificados se trasladan al área de siembra donde se encuentran las cabinas de flujo laminar de aire estéril, donde pueden permanecer durante 10 a 15 días posteriores al esterilizado. Debe evitarse un almacenamiento muy prolongado para evitar contaminaciones y deshidratación en los medios de cultivos envejecidos.

Desinfección superficial de material vegetal para su establecimiento in vitro

La primera fase de la operación es la obtención del material vegetal a cultivar, procurando si fuera posible el uso de tejidos jóvenes y en buen estado fitosanitario. Dependiendo de la especie y el objetivo del trabajo, este puede consistir en semillas, embriones, ápices

caulinares o radicales, segmentos de hojas y tallos, anteras, óvulos. En segundo lugar, evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto de suma importancia para el éxito, no solamente en el establecimiento *in vitro* de los cultivos sino también en su ulterior incubación y manipulación durante las etapas de crecimiento y multiplicación.

En esta pasantía se realizó la desinfección superficial de cápsulas cerradas de *Cohniella cepula* y *C. jonesiana* mediante su inmersión en una solución de NaClO 2,5% + Triton[→] X-100 0,1% durante 45 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. A continuación, trabajando bajo condiciones asépticas, las cápsulas fueron abiertas sobre placas de Petri y se tomaron muestras de semillas para realizar su cultivo.



Fig 2: Detalle de desinfección de una capsula de orquidea

Uso de una cabina de flujo laminar de aire estéril

El Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Cátedra de Fisiología Vegetal (FCA-UNNE) dispone de un área de transferencia que cuenta con 3 cabinas de flujo laminar de aire estéril, las cuales son de la firma CASIBA, modelo HL3, de 196 cm de ancho de mesada x 60 cm de profundidad x 60 cm de alto. Al iniciar una jornada de trabajo, cada cabina de flujo laminar debe encenderse y desinfectarse superficialmente mediante un algodón embebido en alcohol 70%. Asimismo, antes de comenzar a trabajar se procede a limpiarse las manos cuidadosamente con agua y jabón desinfectante para mejorar la asepsia del operario.

En el interior de la cabina se cuenta con un mechero a gas de llama regulable con la que se esterilizan las pinzas, mangos de bisturí y las cajas de Petri empleados para realizar los cortes y manipulación de los diferentes explantes usados.

Previo a su ingreso al flujo laminar, los tubos y frascos conteniendo los medios nutritivos se rocían con alcohol 70% y luego se procede a retirarles su tapa y calentar levemente el

borde del tubo o frasco para eliminar posibles contaminantes y evaporar el agua de condensación que se forma en esa zona. Luego se realiza la siembra de los diferentes explantes en la superficie de los medios nutritivos e inmediatamente se procede a obturar los recipientes con doble capa de film de Resinite®.



Fig 3: Procedimiento de cultivo de orquideas en cabina de flujo laminar

Incubación

En la producción de plantas *in vitro* la incubación es el tiempo que el explante permanece en la solución nutritiva bajo condiciones ambientales controladas. Este ambiente controlado se logra mediante el uso de cámaras de incubación, áreas designadas del laboratorio donde se monta el equipamiento necesario para lograr mantener la luminosidad, temperatura y humedad controladas. En el caso de esta pasantía los explantes se incubaron en un cuarto climatizado a 27 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 horas e intensidad lumínica de $116 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.



Fig 4: Etapa de incubación de explantes en cuarto climatizado

Labores de mantenimiento in vitro del material vegetal.

Parte de las plantas de *Cohniella cepula*, *C. jonesiana*, *Gomesa bifolia* y *Vanilla planifolia* obtenidas a partir de la germinación asimbiótica de semillas son mantenidas *in vitro* a fin de contar con material vegetal para futuros experimentos (conformando el stock de plantas de trabajo). Para ello, se realizaron labores periódicas como ser la multiplicación del material vegetal (mediante su transferencia a medios de cultivo frescos) y limpieza de explantes contaminados o secos.

3. Trabajos en invernadero

Aclimatación de plantines a las condiciones de crecimiento ex vitro.

La etapa de aclimatación involucra la transferencia de las plantas regeneradas *in vitro* a condiciones de crecimiento *ex vitro*, donde las plantas son sometidas a una fase de rusticación. Esta es una de las etapas más crítica en el proceso de micropropagación, debido a que durante la fase de rusticación las plantas sufren un estrés acentuado a causa de la modificación en las condiciones de crecimiento: que pasan de ser óptimas mientras se encuentran *in vitro* (humedad relativa cercana al 100%, intensidad de luz baja, nutrientes y azúcar disponible) y una vez transferidas a condiciones *ex vitro* esta situación cambia drásticamente a causa de la variabilidad ambiental y por su cambio de condición de heterótrofas a autótrofas.

A lo largo de esta pasantía se realizó la transferencia a condiciones *ex vitro* de plántulas de *C. cepula*, *C. jonesiana*, *G. bifolia* y *V. planifolia*. Las plántulas fueron removidas de los frascos y lavadas cuidadosamente con agua corriente para eliminar completamente el medio de cultivo, evitando dañar las hojas y raíces. Se seleccionaron plántulas de diferentes tamaños: pequeñas (4 a 6 cm) y grandes (8 a 10 cm). Para el transplante se utilizaron vasos de plástico de 200 cm³ conteniendo en el fondo una capa de piedra de cantera de grano fino (para mejorar el drenaje del agua en exceso), seguida de una capa de musgo *Sphagnum* (para incrementar la retención de humedad) y, finalmente, otra capa de piedras sobre la que se colocaron las plantas (para permitir la sujeción de las mismas). Una vez transplantadas, un lote de plantas fue llevado directamente a las condiciones ambientales externas en un umbráculo (Figura 3D) mientras otro lote fue colocado en una cámara húmeda (la cual consistía en una estructura de madera cubierta con un plástico transparente para conservar en un nivel elevado la humedad relativa del ambiente) y mantenido en un cuarto de incubación a 27±2 °C bajo un fotoperíodo de 14 horas e intensidad lumínica de 116 $\mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por un período de 2 meses. A continuación, las plantas fueron transferidas a las condiciones externas en un umbráculo.

Durante los primeros cuatro meses posteriores a la transferencia de las plantas a las condiciones de crecimiento *ex vitro*, se realizó la fertilización semanal de un lote de plantas asperjándolas con una solución de Inicium® (Bioibérica S.A., Argentina) al 0,6% (v/v), un bioestimulante órgano-mineral compuesto por péptidos de bajo peso molecular

al 40% p/p, N total al 5,5% p/p y P (P₂O₅) al 5,5 % p/p. Se realizaron además tres riegos semanales con agua, manteniendo así un alto nivel de humedad de las plantas.

Un variante de aclimatación que debe mencionarse es el caso de plántulas de un híbrido artificial del género *Turnera* multiplicadas *in vitro*, puesto que las mismas mostraban dificultad en la producción de raíces durante su estancia *in vitro* y por lo tanto la fase de enraizamiento y aclimatación a las condiciones de crecimiento *ex vitro* debieron hacerse simultáneamente. La tarea consistió en tomar vástagos de 3 a 5 cm de altura, lavarlos adecuadamente con agua corriente para eliminar cualquier resto del medio de cultivo para luego espolvorearlas con ANA o IBA en una concentración de 1.000 partes por millón en la base del tallo. Una vez hecho esto las plantas se colocaban en un sustrato bien humedecido el cual se encontraba en un contenedor de plástico con tapa que actuaba como cámara húmeda. Las plantas permanecieron en esta condición por alrededor de 30 días, siendo pulverizadas con agua cada 5 días para mantener una elevada humedad relativa en el interior del contenedor. Una vez enraizadas, las plántulas fueron transferidas individualmente a macetas y mantenidas en un invernadero hasta completar el proceso de aclimatación.

IMPACTO EN EL PASANTE:

Con la realización de esta pasantía, pude adquirir la práctica y conocimientos necesarios para desenvolverme en la preparación y esterilización de soluciones nutritivas que serán utilizadas en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. El funcionamiento del equipamiento e instrumental utilizados en un laboratorio de biotecnología vegetal, esto me permitió integrar los conocimientos previamente adquiridos en diferentes asignaturas durante el cursado e interactuar en el campo profesional

Referencias bibliográficas

- De Fossard R. 1976. Tissue culture for plant propagators. Department of Botany, University of New England. 409 pp.
- Gamborg O.L., Miller R.A. y Ojima K. 1968. Plant Cell Cultures 1. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Heller R. 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives in vitro. *Annales des Sciences Naturelles (Botanique) Biologie Vegetale* 14: 1-223.
- Knudson L. 1922. Non symbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*.
- Knudson L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- Krikorian A.D. y Berquam D.L. 1969. Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt. *The Botanical Review* 35: 59-88.
- Litz R.E. y Jarret R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca W.M. y Mroginski L.A. (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 143-172.
- Minocha R. y Jain S.M. 2000. Tissue culture of woody plants and its relevance to molecular biology, pp. 315-339. En: Jain S.M. y Minocha R. (eds.). *Molecular Biology of Woody Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Mroginski L.A. y Roca W.M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. En: Roca W.M. y Mroginski L.A. (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. CIAT, Cali, Colombia.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Salisbury F.B. y Ross C.W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica S.A., México, 759 p.
- Schenk R.V. y Hildebrandt A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- Steward F.C. 1958. Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *American Journal of*

Botany 45: 709-713.

Tisserat B., Esan B.B. y Murashige T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms.
Horticultural Reviews 1: 1-78.

A.D. Krikorian. Cultivo de Tejidos en la Agricultura , Capitulo 3 (pag 44-49)

ANEXO

Instrumental y equipamiento utilizados en un laboratorio de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Un laboratorio de cultivo de tejidos puede dividirse esquemáticamente en áreas separadas para las diferentes funciones que se desarrollan en él; sin embargo, en la práctica algunas de las funciones pueden desarrollarse en un mismo ambiente. Las áreas o sectores principales son:

1 Área de preparación: Se utiliza principalmente para preparar los medios de cultivo, pero debe proveer también un espacio para almacenar los materiales de vidrio y de plástico, así como los reactivos químicos. En este sector del laboratorio de la Cátedra de Fisiología Vegetal (FCA-UNNE) encontramos mesadas de trabajo para la preparación de medios de cultivo y diferentes soluciones, donde además se colocan la balanza de precisión, los medidores de pH, hornos de microondas y otros elementos. Asimismo, incluye estanterías y cajones donde se colocan los utensilios básicos para la realización del trabajo (tanto de vidrio como de plástico) y equipos de refrigeración.

- **Balanza Analítica.** Se utilizó una balanza analítica de marca Precisa 240® con una sensibilidad de 0,001 g que me permitió pesar las drogas utilizadas con gran precisión.

- **pHímetro.** En esta pasantía he aprendido a utilizar el pHímetro marca ALTRONIX® modelo TPX1, el cual se usó para corregir el pH de los medios de cultivo. Especial cuidado se debía tener de golpear el electrodo de vidrio y el sensor térmico. Siempre se debe enjuagar con agua destilada toda vez que se cambia de medio de cultivo para no provocar contaminación de sustancias entre los diferentes medios de trabajo. Las correcciones se realizaron con soluciones de diferentes concentraciones normales de HCl y KOH para disminuir o aumentar el pH y ajustarlo a 5,8 para así asegurar que todos los macro y micronutrientes se encuentren en estados disponibles para el explante.



Fig 5: Instrumental de Laboratorio, balanza y phimetro

- **Hornos de microondas.** Se utilizaron microondas cuando se necesitaba calentar el agua destilada usada en la solubilización de drogas analíticas, en el descongelado de medios basales y en el hervor de los medios de cultivo para la disolución del agar.

- ***Elementos de laboratorio.*** Los instrumentos básicos para la realización del trabajo incluyen: vasos de precipitado (de 100 a 4.000 ml), probetas (de 25 a 1.000 ml, pipetas (de 0.01 a 10 ml), varillas de teflón, cajas de Petri, tubos de ensayo, matraces aforados De Erlenmeyer (de 100 a 1.000 ml), frascos de vidrio (de 100 a 500 ml).

- ***Dosificador automatizado o Bomba Peristáltica.*** El equipo dosificador automático permite cargar los diferentes recipientes en forma rápida y efectiva ya que podemos variar la cantidad de medio de cultivo a suministrar en cada tubo o frasco utilizado. Utiliza

mangueras de silicona de fácil manipulación en el llenado de grandes cantidades de medios nutritivos. Es de fácil programación y limpieza.

- **Desionizador de agua.** Un laboratorio debe incluir una fuente de agua de alto grado de pureza. El agua utilizada durante toda esta pasantía fue tratada con un deionizador marca Solución Química SRL modelo MS-1, que consta de una columna de carbón activado y una columna de resinas de intercambio, un medidor de electro-conductividad que nos permite ir controlando en tiempo real la calidad del agua que estamos obteniendo. Con esta agua se realiza la preparación de todos los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento y enjuagues de los explantes que son desinfectados.



Fig 6: Desionizador de agua

-**Refrigeradores y freezers.** Son necesarios para el almacenamiento y conservación del stock de medio basal concentrado, reguladores de crecimiento vegetal y diferentes reactivos.

2. Área de lavado y de esterilización: Puede estar constituida por dos áreas conectadas entre sí, o por un solo ambiente.

-**Área de limpieza.** En esta área se realiza el lavado de los elementos del laboratorio. Debe incluir al menos un lavadero grande con agua caliente y fría, además de estanterías donde se colocan los diferentes materiales que deben ser lavados (frascos, cajas de petri, tubos de ensayos, etc), autoclaves y estufas de secado. Los frascos y tubos que están contaminados por hongos y/o bacterias, se los lleva a una autoclave para su esterilización destinada para tal propósito y así evitar posteriores contaminaciones. En el lavatorio se encuentran unas cubetas con detergente donde se dejan en remojo los frascos y otro material de vidrio, aflojando todo resto de medio de cultivo en su interior para facilitar su limpieza con el cepillo. Luego de enjuagar bien el detergente con agua corriente, se realiza un último enjuague con agua destilada para eliminar todo resto de sales. Una vez lavados, los frascos y tubos de ensayo se llevan a una estufa a temperatura de 100-120°C

para secarlos completamente y realizar su posterior almacenamiento en las repisas y cajones. Este sector también debe disponer de basureros adecuados para el material vegetal, inorgánico y de vidrio que se descarte.

-Área de esterilización. Debe tener espacio para autoclaves y estufas. En esta pasantía he aprendido a utilizar autoclaves verticales de tipo manual (modelo Chamberlain), con los cuales se cuenta en el laboratorio de la Cátedra de Fisiología Vegetal (FCA-UNNE).



Fig 7: Autoclave de bronce

3. Área de transferencia: En esta área del laboratorio se realiza el trabajo de escisión, inoculación y transferencia de los explantes a los medios de cultivo. Dado que este trabajo demanda los más altos niveles de limpieza ambiental, se recomienda la instalación de gabinetes de flujo laminar de aire filtrado bajo presión. En lo posible, los gabinetes de flujo laminar deben ubicarse en un lugar alejado de las puertas y con un mínimo de corriente de aire, con el propósito de prolongar la vida útil de los filtros.

-Gabinetes de flujo laminar. El laboratorio de la Cátedra de Fisiología Vegetal (FCA-UNNE) dispone de un área de transferencia que cuenta con 3 cabinas de flujo laminar, las cuales son de la firma CASIBA, modelo HL3, de 196 cm de ancho de mesada x 60 cm de profundidad x 60 cm de alto.



Fig 8a: Camara de Flujo Laminar



Fig 8b: Trabajos en la camara de Flujo Laminar

-Elementos varios para el cultivo: Para la ejecución de las tareas de cultivo y transferencia de los explantes se utilizaron pinzas de disección, mangos y hojas de bisturí, agujas histológicas, tijeras, bandejas porta tubos, recipientes con alcohol, barbijos y/o máscaras, guantes, marcadores indelebles.

4. Área de incubación: Los cultivos se incuban en un cuarto apropiado para el crecimiento *in vitro*. Esta área debe proporcionar un buen control de la temperatura, de la iluminación y, de ser posible, de la humedad relativa. En el laboratorio de la Cátedra de Fisiología Vegetal (FCA-UNNE) la cámara de incubación consta de un cuarto climatizado con temperatura (a 27 ± 2 °C), fotoperiodo (14 h luz / 10 h oscuridad) e intensidad lumínica ($116 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD) controlados. Estas condiciones ambientales fueron reguladas de acuerdo al tipo de cultivos realizados habitualmente en este laboratorio, ya que las respuestas a estos factores varían entre las diferentes especies. La cámara de incubación cuenta con estanterías con iluminación para colocar los diferentes recipientes de cultivo e incluye, además, un espacio para cultivos en agitación y para cultivos estáticos en oscuridad.

5. Área de observación y examen: El objetivo de esta área es realizar observaciones periódicas de los cultivos y las diferentes respuestas obtenidas. El laboratorio de la Cátedra de Fisiología Vegetal cuenta con microscopios estereoscópicos así como con microscopios ópticos normal e invertido.

6. Área de crecimiento *ex vitro*: Las plantas regeneradas *in vitro* se pueden acondicionar y luego transplantar en macetas o bandejas apropiadas. Estas operaciones se pueden llevar a cabo en invernaderos, umbráculos o casas de malla, dependiendo de las condiciones climáticas del lugar donde está ubicado el laboratorio y de los requerimientos de aislamiento de los materiales por razones fitosanitarias. Después del transplante, las plantas generalmente necesitan un acondicionamiento gradual a las condiciones de campo, lo cual se puede lograr usando nebulización, cámaras húmedas de