

**AVANCES DE LA MICROPROPAGACIÓN *in vitro* DE
PLANTAS LEÑOSAS**

JORGE ELIÉCER RAMOS AMAYA

C.C. 17.127.974

CARLOS OMAR PATIÑO TORRES PhD

ASESOR

**ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA (UNAD)**

NOVIEMBRE DE 2012, BOGOTÁ

Nota aclaratoria

La Universidad (UNAD) y los jurados no se hacen responsables por los conceptos emitidos por el autor.

Nota de aceptación

CARLOS OMAR PATIÑO TORRES
Director del trabajo

MANUEL FRANCISCO POLANCO PUERTA
Firma del jurado

REINALDO GIRALDO DÍAZ
Firma del jurado

Bogotá, Mayo 12 de 2014

Dedicada a:

Eva Matilde Becerra Díaz, por su invaluable ayuda.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus más sentidos agradecimientos a:

Todos los profesores que con sus luces ayudaron a realizar este proyecto, especialmente a los de la Universidad Nacional, Abierta y a Distancia.

ÍNDICE

	Página
PORTADA	i
NOTA ACLARATORIA	ii
NOTA DE ACEPTACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
MICROPROPAGACIÓN <i>in vitro</i> DE LEÑOSAS	3
1. GENERALIDADES	3
1.1 RESEÑA HISTÓRICA	3
1.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	5
1.3 MATERIALES PARA EL CULTIVO <i>in vitro</i>	14
2. CULTIVO DE TEJIDOS DE ESPECIES LEÑOSAS	18
2.1 MICROPROPAGACIÓN <i>in vitro</i>	19
2.2 FUENTE DE EXPLANTES	22
2.3 PRUEBA DE VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS	25
2.4 GERMINACIÓN	26
2.4.1 Tratamientos para la germinación	27
2.5 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	28
2.5.1 Plantas madres	28
2.5.2 Semillas	29
2.5.3 Explantes	30

2.6	DESINFECCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	34
2.7	MEDIOS DE CULTIVO	34
2.8	CONDICIONES DEL CULTIVO	41
2.9	MULTIPLICACIÓN O PROLIFERACIÓN	41
2.10	ENRAIZAMIENTO	42
2.11	ENDURECIMIENTO O ACLIMATACIÓN	44
3.	CONCLUSIONES	51
	BIBLIOGRAFÍA	52
	ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA N° 1. Diferentes tratamientos para germinación de semillas	27
TABLA N° 2. Composición de WPM (<i>Woody Plant Medium</i>)	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Rutas de regeneración en cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	10
Figura 2. Cultivo de meristemas	11
Figura 3. Cultivo de meristemas y yemas	12
Figura 4. Cultivo de tejidos	13
Figura 5. Algunos equipos para el cultivo <i>in vitro</i>	15
Figura 6. Invernadero	16
Figura 7. Algunos instrumentos de vidrio	17
Figura 8. La micropropagación vegetal	19
Figura 9. Corte de los nudos.	21
Figura 10. Preparación de explantes.	23
Figura 11. Prueba por tetrazoilo	26
Figura 12. Desarrollo de brote y raíz <i>in vitro</i>	27
Figura 13. Producción de brotes adventicios a partir de nudos	42
Figura 14. Etapa de enraizamiento	43
Figura 15. Planta micropropagada y enraizada	44
Figura 16. Planta creciendo en condiciones <i>in vitro</i>	45
Figura 17. Invernadero de aclimatación	47
Figura 18. Invernadero de aclimatación y endurecimiento	49
Figura 19. Plantas micropropagadas adaptadas a condiciones <i>ex vitro</i>	49
Figura 20. Resumen de la propagación <i>in vitro</i>	50

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Composición y preparación del medio Murashige y Skoog	65
ANEXO 2. Interacción de las hormonas en la planta	68
ANEXO 3. Principales métodos de micropropagación	70

RESUMEN

Las plantas leñosas además de tener una gran importancia económica, juegan un papel preponderante en el medio ambiente debido a su aporte paisajístico (embellecimiento), y a la descontaminación atmosférica (captación de CO₂). Constituyen un grupo de gran interés dentro del cual se encuentran especies forestales y frutales. La micropropagación es un sistema de propagación asexual a partir de un segmento de una planta madre, que da como resultado plantas genéticamente idénticas, debido a la totipotencialidad. Por este sistema se han propagado más de 140 especies maderables en el mundo. En Colombia se han realizado pocos trabajos al respecto, pero ya hay protocolos que sirven de modelos para futuros estudios, especialmente de plantas autóctonas. La embriogénesis somática es considerada la mejor vía de regeneración de plantas leñosas. Para lograr un excelente trabajo se debe contar con unas buenas instalaciones, excelentes equipos y un personal idóneo. Allí se tratan los explantes al igual que las plantas madres, se colocan en medios de cultivo desinfectados, se realiza la multiplicación o proliferación de explantes, continuación sigue el enraizamiento, luego el endurecimiento y la aclimatación de las plantas. Aunque la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas es difícil, se han logrado grandes avances en los últimos años, obteniendo altos promedios de supervivencia en muchas plantas leñosas (maderables y frutales), debido a las mejoras en las técnicas de asepsia, endurecimiento y aclimatación de las plantas obtenidas en cultivo *in vitro*, pero principalmente el desarrollo y obtención de plantas libres de virus y bacterias, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en los explantes.

ABSTRACT

Woody plants also have great economic importance, playing a leading role in the environment due to its scenic contribution (embellishment), and air pollution control (CO₂ uptake). They are a group of great interest within which forest species and fruit are. Micropropagation is a system of asexual propagation from a segment from a mother plant, resulting in genetically identical plants because totipotency. For this system have spread over 140 timber species in the world. In Colombia there has been little work on the subject, but there are protocols that serve as models for future studies, especially native plants. Somatic embryogenesis is considered the best way of regeneration of woody plants. To achieve an excellent job must have good facilities, excellent equipment and skilled personnel. There explants as mother plants are placed in culture media treated disinfected , multiplication or spread of explants is carried out , is then rooting, and then hardening the plant acclimatization . Although the *in vitro* micropropagation of woody plants is difficult, have made great strides in recent years, obtaining high average survival in many woody plants (timber and fruit) due to improvements in aseptic techniques, hardening and acclimatization plants grown *in vitro* culture, but mainly the development and production of virus-free plants and bacteria, using the chain reaction (PCR) and linked immunosorbent assay (ELISA) in the explants.

INTRODUCCIÓN

El recurso forestal de Colombia se ha deteriorado de manera considerable. Aunque no existe consenso en cuanto al área deforestada anualmente en el país, ni sus tendencias actuales, los estimativos oscilan entre las 360.000 a las 600.000 hectáreas anuales, que, en cualquier caso se encuentran entre las más rápidas del mundo. Una tercera parte de la cobertura forestal del país ha sido eliminada. El propósito principal de este trabajo, es contribuir a la difusión del conocimiento logrado por la propagación *in vitro* de las plantas leñosas

Aunque la biotecnología forestal se ha extendido a las actividades de por lo menos 140 géneros de árboles, la mayoría de los proyectos se ha centrado en sólo siete: Pino, Eucalipto, Abeto, Arce, Álamo, Roble y Acacia, por su gran rentabilidad económica.

En Colombia se han realizado pocos trabajos sobre la propagación de plantas leñosas *in vitro*. Algunos trabajos forestales en guayacán (*Tabebuia serratifolia*), en aliso (*Alnus acuminata*), en ocobo (*Tabebuia rosea*), en encenillo (*Weinmannia tomentosa*), son de gran importancia para la conservación y propagación de especies en peligro de extinción.

Los trabajos relacionados con la micropropagación *in vitro* de leñosas, se consultaron en las bibliotecas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, del Jardín Botánico José Celestino Mutis, de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (Tunja), además de las consultas por Internet.

Por lo tanto esta revisión bibliográfica tiene como objetivos, dar a conocer los avances alcanzados hasta el momento sobre la propagación *in vitro* de plantas leñosas en el mundo y en nuestro país, y especialmente cuáles son las principales ventajas de esta técnica de multiplicación vegetal, para ser implementada en nuestro país, tanto en la multiplicación comercial de especies forestales como en la conservación de muchas especies leñosas nativas con algún nivel de amenaza de extinción.

MICROPROPAGACIÓN *in vitro* DE LEÑOSAS

1. GENERALIDADES

1.1 RESEÑA HISTÓRICA

Del latín *totuspotens*: *totus* (todo) y *potens* (poder o habilidad), el término célula totipotencial, es utilizado en biología para referirse a células que poseen la capacidad de dar origen a diferentes tipos celulares, incluso pudiendo una sola de estas células dar origen a millones de células, tejidos, órganos e incluso embriones (Tobar, 2011).

Una planta al crecer va aumentando su población de células las cuales se especializan en sus funciones. El aumento de la población de células se realiza por medio de la división celular. Antes que una célula madre se divida en dos células hijas, hace una copia exacta de su primer genoma. Como resultado, las dos células hijas generalmente tienen exactamente la misma composición genética como la de su célula madre. Cada célula viva de la planta debe contener todos los genes y por lo tanto tiene la capacidad de generar una planta completa. Esto se llama: célula totipotencial (Tobar, 2011).

En 1838, Matthias Schleiden (1804-1881), un botánico alemán, afirmó que los vegetales son agregados de seres completamente individualizados, independientes y distintos, que son las células mismas. La palabra "célula" había sido usada por primera vez con un sentido biológico en 1665 por Robert Hooke (1635-1701) quien había notado que el corcho y otros tejidos vegetales están constituidos por pequeñas cavidades separadas por paredes. En 1839, el fisiólogo alemán Theodor Schwann (1810-1882), publicó las investigaciones microscópicas

sobre la concordancia de estructura y de desarrollo de los animales y las plantas, obra en la que presentó la idea central de que "hay un principio general de construcción para todas las producciones orgánicas y este principio de construcción es la formación de la célula" (Curtis, *et al.*, 2007).

Gottlieb Haberlandt (1854-1945), botánico austríaco, fue el primero en señalar la posibilidad del cultivo de tejidos aislados. Desde las primeras afirmaciones de Haberlandt, los métodos de cultivo de células y tejidos se han desarrollado, dando lugar a importantes descubrimientos en Biología y Medicina (Despommier, 2009).

La teoría propuesta por Schleiden y Schwann (1838), establece que las células son autosuficientes y, que, en principio son capaces de regenerar una planta completa, lo anterior constituye el núcleo central del cual nace el cultivo de tejidos. Los primeros intentos fueron realizados por Haberlandt en 1902; más tarde otros ensayos fueron realizados por Harrison, Burrows y Carrel entre 1907 y 1909. Nobécourt, Gautheret y White, consiguieron el primer cultivo de tejido auténtico en el año de 1939 (Pierik, 1990). Es decir, tuvieron que pasar 100 años para que la teoría de la totipotencia fuera comprobada. Desde el año de 1939 este tema ha venido en progreso, pero ha tenido un desarrollo extraordinario en los últimos 30 años.

La ciencia del cultivo de tejidos vegetales debe su origen a la investigación sobre hormonas que controlan el crecimiento y el desarrollo vegetal. Este conocimiento se combinó con las técnicas básicas de microbiología por las cuales los microorganismos se hacen crecer en medios estériles para su producción e identificación (Salazar, 2010).

Las plantas tienen un poder regenerativo muy superior a los animales. El hombre ha manipulado durante miles de años el contenido genético de plantas con interés agrícola, por sucesivos cruces y selección de semillas. Lo que ahora puede alterarse es la velocidad de producción de esos cambios al aplicar las nuevas tecnologías que permiten la formación de genomas híbridos de orígenes muy dispares. Para obtener buenos cultivos de células vegetales se debe partir de un explante rico en células capaces de una rápida proliferación, como las células

apicales de la raíz, las yemas o semillas en germinación. A partir de ellas se puede obtener una masa indiferenciada denominada “callo”.

El callo tisular puede propagarse indefinidamente por subdivisiones en un medio nutricional básico con fitohormonas (una auxina, una citoquinina y una giberelina, por ejemplo). El estado de diferenciación puede ser mantenido o alterado variando el tipo y concentración de fitohormonas en el medio: una concentración alta de auxinas frente a citoquininas inducirá la formación de raíces, mientras que concentraciones altas de citoquininas frente a auxinas induce la formación de tallos. Las concentraciones de hormonas adecuadas varían de una planta a otra, por lo que hay que determinarlas en cada caso experimentalmente (Izquierdo, 1999).

La investigación y las aplicaciones de la biotecnología en el sector forestal avanzan rápidamente, pudiéndose identificar cuatro biotécnicas que se utilizan principalmente: La micropropagación y el cultivo de tejidos, la biología molecular y los marcadores, la modificación genética, la genómica y la crioconservación. Entre las 2700 actividades de biotecnología que se realizaron en el mundo en los últimos 10 años, la modificación genética representa alrededor del 19% solamente. El potencial de los rasgos de interés para los árboles genéticamente modificados (GM) son el aumento de la producción y calidad de madera, resistencia a insectos, enfermedades y herbicidas (FAO, 2004).

1.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

En su acepción amplia, el **cultivo de tejidos vegetales** se define como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante, o sea, unas partes separadas del vegetal, tales como protoplastos, células, tejidos u órganos- se cultivan asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas. Cada fragmento origina una planta idéntica a aquella de donde se tomó el fragmento, aunque, también puede ser modificada genéticamente para tener variedades artificiales (Mroginski *et al.*, 2010).

Estas técnicas pueden ser utilizadas en vegetales como herramientas para la micropropagación rápida de clones, eliminación de virus y enfermedades, producción de haploides, aislamiento y utilización de protoplastos, cultivo de embriones, producción de fitoquímicos, ingeniería genética, mutación y selección celular, producción de semillas sintéticas y estudios básicos de anatomía, desarrollo, fisiología y nutrición vegetal (Mroginski *et al.*, 2010).

El cultivo *in vitro* de plantas consiste en reproducir numerosos ejemplares a partir de pequeñas partes de tejido de una planta madre, obteniendo plantas homogéneas, en grandes cantidades, libres de patógenos y en cualquier época del año. Esta técnica permite tener una mayor tasa de reproducción que en los cultivos tradicionales y es de gran ayuda para la conservación de especies que estén en peligro de extinción o en estado de vulnerabilidad. Existe una gran diferencia entre las plantas herbáceas y las plantas leñosas, debido a que estas últimas son difíciles de clonar porque tienen una capacidad regenerativa relativamente lenta (Pierik, 1990). Las arbóreas (recalcitrantes) han presentado mayores dificultades por su condición estructural y porque los procesos morfológicos fisiológicos y biológicos han sido menos estudiados (Perea, 1990).

Las aplicaciones del cultivo *in vitro* de plantas (Salazar, 2010) son:

- Multiplicación masiva de plantas para especies de difícil propagación por otros métodos.
- Rescate de especies en vías de extinción.
- Clonación de individuos de características agronómicas especiales.
- Producción de semillas sintéticas.
- Producción de plantas libres de enfermedades (obtención de plantas libres de virus). Producción de nuevos híbridos.
- Germinación de semillas.
- Generación de variabilidad en mejora genética (incluyendo la obtención de plantas transgénicas).

- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal).
- Selección, cruzamiento, control de enfermedades y producción en masa de cultivos de cosecha e involucra diferentes plantas en agricultura, horticultura, forestales y frutales. Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos diversos.
- Sistema modelo para estudios de fisiología vegetal.
- Producción de metabolitos secundarios.
- Lucha contra enfermedades.

Las ventajas de la multiplicación (Salazar, 2010) *in vitro* son:

- Propagación vegetativa rápida y a gran escala.
- Uniformidad del material obtenido.
- Multiplicación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales.
- Reducción del tiempo de multiplicación y del espacio requerido para tal fin.
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado.
- Introducción rápida de nuevos cultivares.
- Conservación de germoplasma en condiciones seguras.
- Facilidades para el intercambio internacional de material vegetal

La técnica del cultivo *in vitro* para la obtención de especies forestales, ha sido lenta. Se han publicado diversos trabajos de micropropagación de especies maderables en un número superior a 140 especies (Corbino, 2005), entre las especies para fines industriales han sido Álamos (*Populus* spp.), Eucaliptos (*Eucaliptus* spp.), Arces (*Arce* spp.), Abedules (*Betula* spp.), Castaños (*Castanea sativa*), Robles (*Quersus humboldtii*), Pinos (*Pinus patula*). En Colombia se han realizado pocos trabajos sobre la propagación de plantas leñosas *in vitro*. Cabe destacar los trabajos en forestales de bosque húmedo tropical realizados por la Universidad Católica de Oriente (Castro, 1992), en abarco (*Cariniana pyriformis*), almendrón (*Terminalia catappa*), guayacán (*Tabebuia serratifolia*) y comino (*Aniba perulitis*) y el trabajo de Hodson (1998), en aliso (*Alnus acuminata*); Defelipe, (2011) en quina (*Cinchona pubescens*); Schuler *et al.*, (2005) en ocobo (*Tabebuia*

rosea) y nogal cafetero (*Cordia alliodora*); Marulanda *et al.*, (2000) en aliso (*Alnus acuminata*), nogal cafetero (*Cordia alliodora*) y mora (*Rubus glaucus*); Pedroza *et al.*, (2007), en escobo (*Hipericum goyanessi*); en encenillo (*Weinmannia tomentosa*) y rodamonte (*Escallonia myrtilloides*), Villamizar (2005); en guadua (*Bambusa vulgaris*), Hurtado *et al.*, (2010); en tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), Espinosa *et al.*, (2005); en guayaba (*Psidium guajaba*), Ocampo y Núñez (2007); en flormorado (*Tabebuia rosea* Bertold DC) Suárez, *et al.*, (2006); en teca (*Tectona grandis* L), Castro *et al.*, (2002).

La regeneración de plantas a partir de cultivo *in vitro* de ciertas especies leñosas, exige la búsqueda de técnicas complejas (Perugorría, 2005). Estas deben permitir a las plantas sobrevivir a los problemas de oxidación, heterogeneidad de respuesta y sobre todo a la ambientación cuando son trasplantadas a un sustrato y expuestas a las condiciones naturales. Los explantes cultivados *in vitro* pueden dar dos tipos de respuesta: una de diferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células denominada callo o una respuesta morfogénica por la cual o se forman órganos (organogénesis) o embriones (embriogénesis somática) (López, 1996).

La embriogénesis somática está ampliamente considerada como la mejor vía de regeneración que utilizan las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en biotecnología forestal. Los avances actuales en biotecnología-genómica están teniendo un gran impacto en el uso de material selecto en muchos programas de mejora. La embriogénesis somática está contribuyendo a la producción de plantas transgénicas y a la consecución de la silvicultura clonal de alta productividad, con calidad de madera mejorada y menor impacto de enfermedades, en plantaciones forestales (Celestino, 2005). En la embriogénesis somática el enraizamiento es reemplazado por una etapa de maduración y germinación de los embriones para la diferenciación de los ápices caulinares y radiculares.

Las plantas producidas asexualmente a través de organogénesis *in vitro*, son de calidad uniforme, y pueden ser reproducidas más rápidamente que a través de la

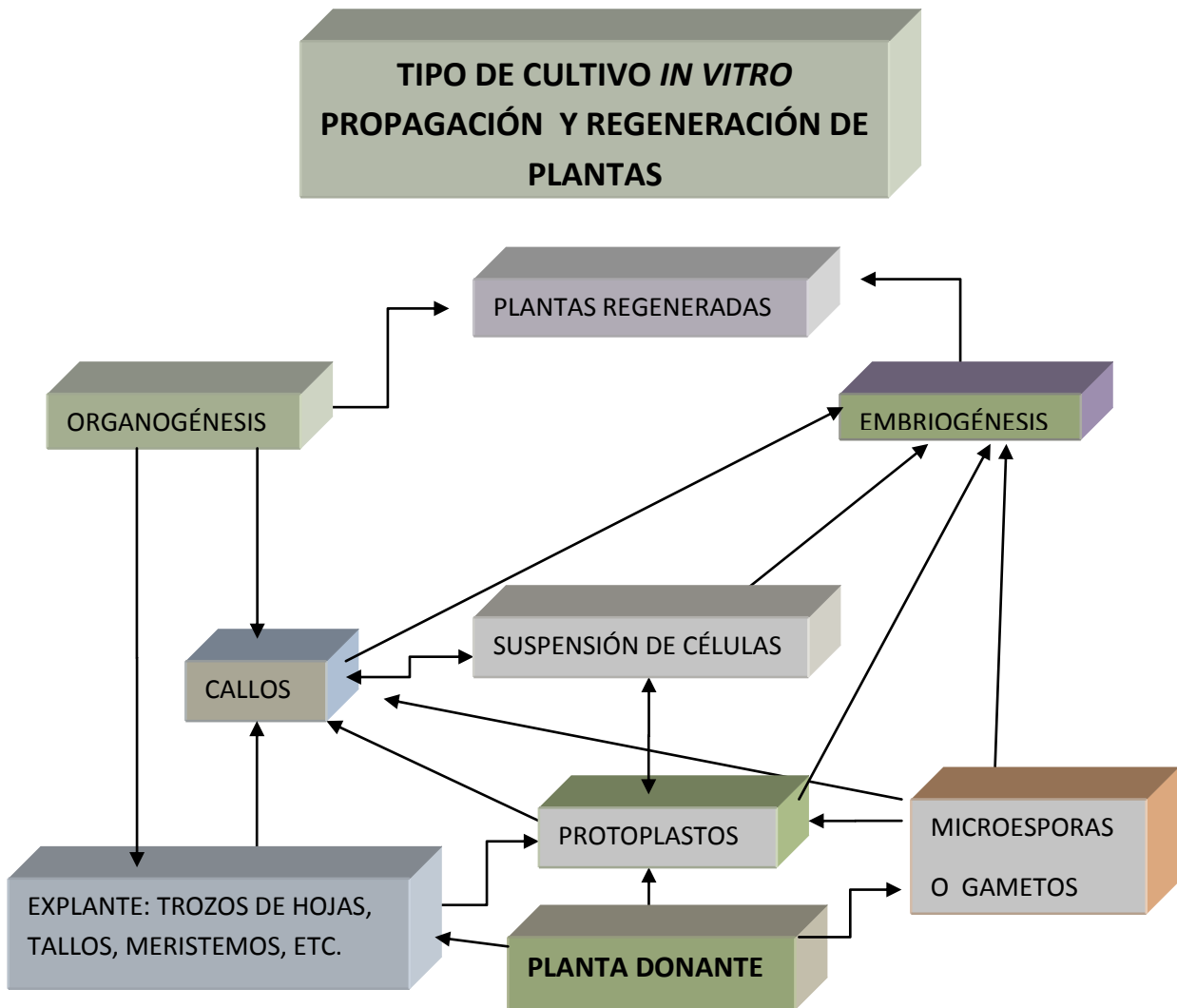
sexual o por técnicas convencionales de propagación. Tales plantas crecen y maduran más rápido que las plantas propagadas por semillas (Vasil y Vasil, 1980).

La multiplicación *in vitro* de especies agroforestales puede lograrse por tres rutas diferentes: 1) por desarrollo de brotes preexistentes, 2) por formación de meristemos adventicios, y, 3) por diferenciación de embriones somáticos (Aguilar *et al.*, 2010).

- 1) Hasta la fecha, la multiplicación de plantas por medio de ápices preexistentes es el método más común para la propagación clonal de maderas duras, siendo el más utilizado en coníferas. En esta técnica se utilizan ápices de yemas terminales, axilares y nudos. Este sistema de propagación tiene la ventaja de que los brotes se multiplican directamente, sin una fase intermedia de callo (masa de células no diferenciadas) siendo en general, las plantas regeneradas, genéticamente estables; sin embargo, el número de plantas que se produce es limitado debido a que depende del número de brotes preexistentes en el explante. Si bien la tasa de multiplicación inicial es baja, ésta se incrementa durante los primeros subcultivos y eventualmente se puede alcanzar una tasa considerable de multiplicación (Thorpe *et al.*, 1991).

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Figura 1. Rutas de regeneración en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

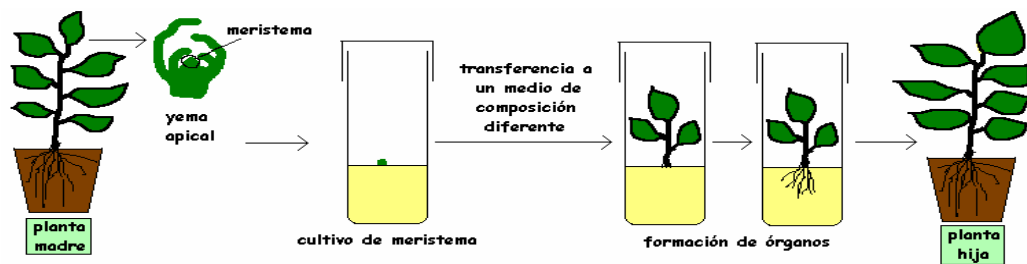


Fuente: El autor, 2012.

- 2) Los meristemos no poseen tejido vascular lo que los mantiene parcialmente aislados del resto de la planta. Dado que los virus y bacterias que son endopatógenos de las plantas, y se movilizan por los haces vasculares, se usa el cultivo *in vitro* de meristemos en la propagación de

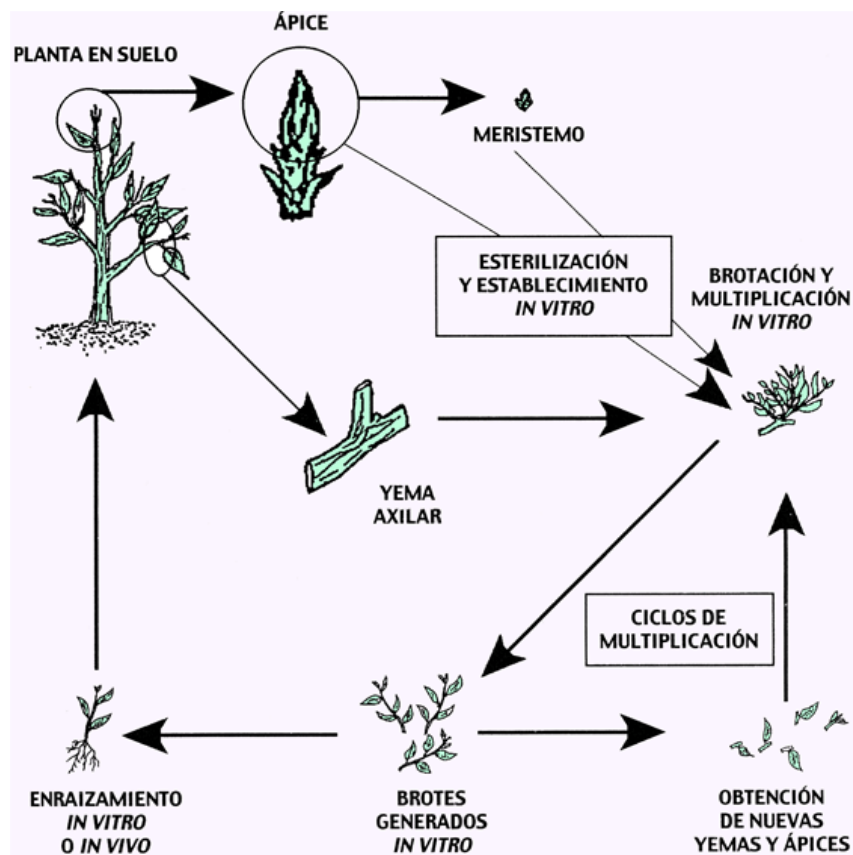
plantas, para que tengan mayor oportunidad de estar libres de patógenos. En el año de 1998, Faccioli y Marani, encontraron que los virus son rápidamente transportados a lo largo de toda la planta por el floema, y así se distribuyen sistémicamente; los meristemos no tienen tejido vascular formado, por lo tanto, el avance es solamente a través del movimiento célula a célula; comprobaron que el *Tobacco mosaic virus* (TMV) y el *Potato virus X* (PVX), avanzan de 1 a 8 cm/h por el tejido vascular y de 5 a 15 $\mu\text{m/h}$ (10^{-6}m/h) célula a célula, por esta razón se supone que las células meristemáticas no están completamente invadidas por virus cuando se encuentran en activo crecimiento. La obtención de meristemos exentos de virus y bacterias, es un proceso probabilístico, que no ocurre en el ciento por ciento de los casos, sino sólo en una alta proporción. Por lo tanto es necesario realizar pruebas de comprobación de los patógenos, para estar seguros de que dicha planta está libre de ellos. Para analizar los patógenos se utilizan ensayos mediante métodos inmunológicos, injertos sobre especies marcadoras, microscopía electrónica, entre otros. El cultivo de meristemos se ha realizado con éxito en plantas leñosas como uvas, eucaliptus, manzanos y cítricos.

Figura 2. Cultivo de meristemos



Fuente: Biotecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina, 2006.

Figura 3. Cultivo de meristemos y yemas



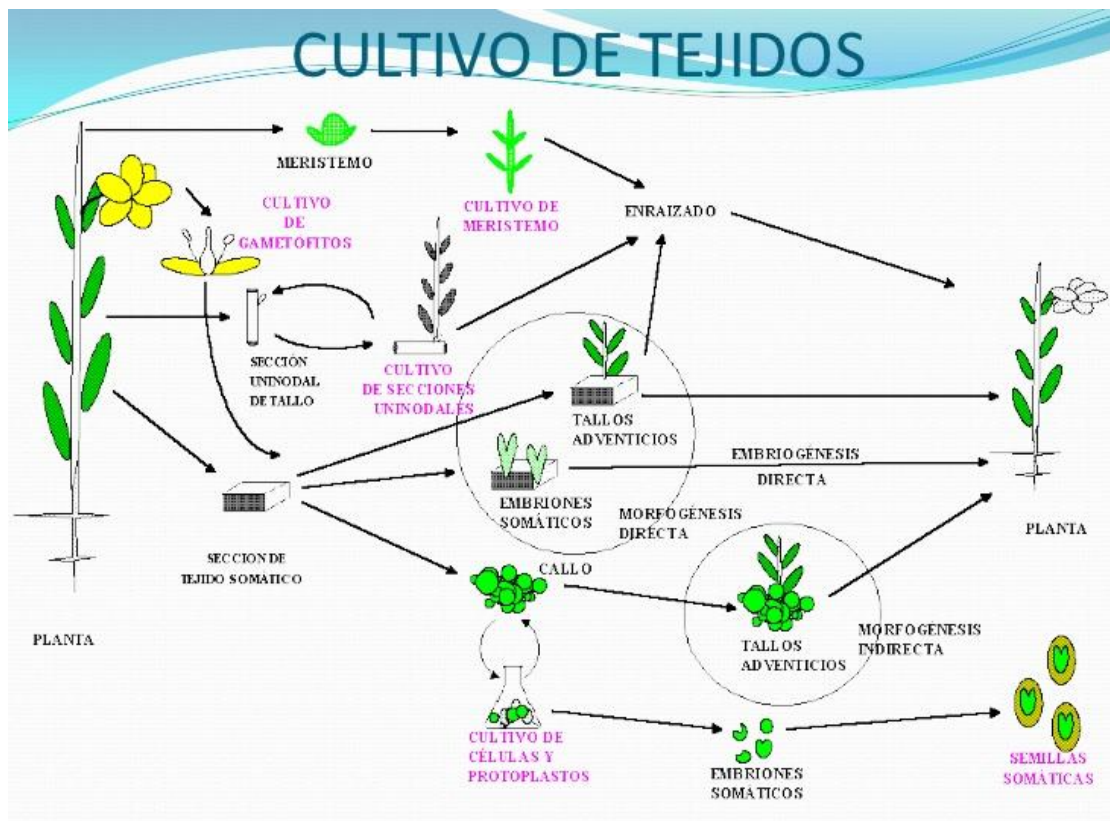
Fuente: Biotecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina, 2006.

El cultivo de meristemos elimina las infecciones virales y es el material preferido para la conservación del germoplasma.

Otra hipótesis propone que la inhibición de la replicación de los virus en la zona meristemática es debida a la alta tasa metabólica del meristemo y a la elevada concentración de reguladores en esa zona (Casado, 2000). Presumiblemente es más difícil para un virus invadir células con alta actividad metabólica, como las células meristemáticas donde está ocurriendo activa mitosis. Se ha observado que altas concentraciones de 2,4-D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético) en el medio de cultivo inhibe la multiplicación de los virus. Por lo tanto se puede suponer que las altas concentraciones de auxinas endógenas existentes en los ápices meristemáticos pueden producir un efecto similar (Patrignani *et al.*, 2008).

3) La embriogénesis somática es una técnica biotecnológica de propagación de plantas que permite obtener embrioides a partir de células somáticas desde cualquier tipo de tejido. Como en este proceso no hay fusión de gametos, no hay combinación genética, por lo tanto el embriode obtenido es idéntico al árbol donador de tejidos. Hay una clonación ciento por ciento del individuo de donde se obtuvo el material (Vargas, 2007). Esta técnica es definida como un proceso en el cual una estructura bipolar, con un eje radical y uno apical, semejante a un embrión cigótico, se desarrolla de una célula somática sin conexión vascular con el tejido original. Estas estructuras son capaces de crecer y formar plantas normales (Litz, *et al.*, 1991; Arnold *et al.*, 2002).

Figura 4. Cultivo de tejidos



Tomado de: www.slideshare.net/.../generalidades-de-cultivos-in-vitro

1.3 MATERIALES PARA EL CULTIVO *in vitro*

La micropropagación *in vitro*, es el conjunto de técnicas y métodos del cultivo de tejidos utilizados para obtener plantas asexualmente en forma rápida, eficiente, libres de enfermedades y en grandes cantidades. El laboratorio de micropropagación de tejidos vegetales debe contar con las instalaciones, el equipo y los reactivos necesarios para realizar investigaciones en diferentes tipos de plantas, permitiendo generar nuevos protocolos de micropropagación de plantas *in vitro*, que logren una propagación masiva, libre de enfermedades.

Las instalaciones del laboratorio deben contar con: Área de oficinas, área de observación y examen, área de preparación de medios de cultivos (material de vidrio e instrumentos como la balanza de precisión, autoclave, guantes, máscara, reactivos como sales minerales, agar, sucrosa, antioxidantes, fitohormonas, desinfectantes como ácido hipocloroso, alcohol etílico, soluciones jabonosas, agitador magnético, criba vibradora, cámara de flujo laminar, vidriería como), área de lavado y esterilización, almacén, área de incubación o de crecimiento *in vivo*, área de flujos laminares o de transferencia, invernadero.

Autoclave: Una autoclave es un recipiente de presión metálico de paredes gruesas con un cierre hermético que permite trabajar a alta presión para realizar una reacción industrial, una cocción o una esterilización con vapor de agua. Su construcción debe ser tal que resista la presión y temperatura desarrollada en su interior.

La esterilización por vapor a presión se lleva a cabo en una autoclave. Estos equipos emplean vapor de agua saturado, a una presión de 15 libras lo que permite que la cámara alcance una temperatura de 121°C. El tiempo de esterilización usualmente es de 15 minutos, sin embargo, en algunas oportunidades, dadas las características del material, es necesario variar el tiempo (Padrique, 1992).

Figura5. Algunos equipos para el cultivo *in vitro*



Autoclave Cámaras de flujo laminar



Cámara de cultivo Micropropagación Medio de cultivo

Fuentes: www.es.wikipedia.org/wiki/Autoclave
www.es.wikipedia.org/wiki/Cabina_de_flujo_laminar
www.articulos.infojardin.com/Frutales/cultivo-invitroreproduccion.htm

Cámara de flujo laminar: Una cabina de flujo laminar, cámara de flujo laminar o campana de flujo laminar, es un recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro de aire y que proporciona aire limpio a la zona de trabajo, libre de partículas de hasta 0.1 micras. Este tipo de equipos se fabrican en forma generalmente prismática con una única cara libre (la frontal) que da acceso al interior, donde se localiza la superficie de trabajo, que normalmente permanece limpia y estéril.

Las cámaras de cultivo: En este tipo de cámaras, no solo se pueden simular condiciones ambientales variables de temperatura y humedad, sino también de

radiaciones solares y atmósferas gaseosas modificadas (ozono, CO₂, etc.) en función de los entornos de investigación que se pretendan estudiar. Los nuevos sistemas de iluminación fotosintéticamente activa, basados en la tecnología optoelectrónica, se seleccionan en base a clorofilas, carotenoides, etc., con controles precisos del espectro de la radiación y la intensidad, fotoperiodo y localización geográfica.

Invernadero: Un invernadero (o invernáculo) es un lugar cerrado, estático y accesible a pie, que se destina a la producción de cultivos, dotado habitualmente de una cubierta exterior translúcida de vidrio o plástico, que permite el control de la temperatura, la humedad y otros factores ambientales para favorecer el desarrollo de las plantas. En la jardinería antigua española, el invernadero se llamaba estufa fría. Según el Diccionario de la Academia de la Lengua, el invernadero es un lugar preparado artificialmente para cultivar las plantas fuera de su ambiente y clima habituales.

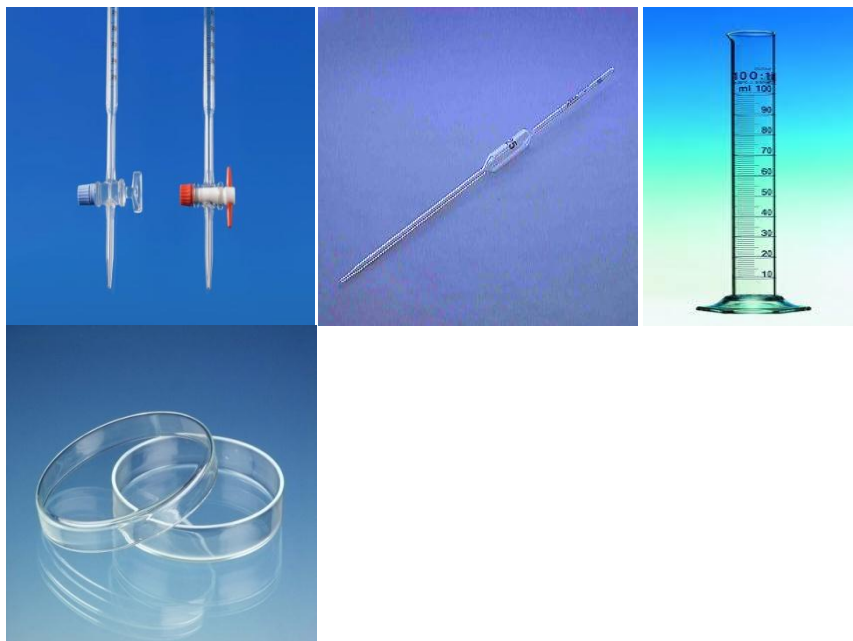
Bureta. Las buretas son tubos cortos, graduados, de diámetro interno uniforme, provistas de un grifo de cierre o llave de paso en su parte inferior llamado robinete. Se usan para ver cantidades variables de líquidos, y por ello están graduadas con pequeñas subdivisiones (dependiendo del volumen, de décimas de mililitro o menos). Su uso principal se da en volumetrías, debido a la necesidad de medir con precisión volúmenes de líquido variables.

Figura 6. Invernadero



Fuente: www.es.wikipedia.org/wiki/Invernadero

Figura 7. Algunos instrumentos de vidrio



Bureta

Pipeta volumétrica

Probeta Caja de Petri

Fuentes: www.es.wikipedia.org/wiki/Bureta; www.es.wikipedia.org/wiki/Pipeta
[www.es.wikipedia.org/wiki/Probeta \(química\)](http://www.es.wikipedia.org/wiki/Probeta_(química)) [www.es.wikipedia.org/wiki/Placa de Petri](http://www.es.wikipedia.org/wiki/Placa_de_Petri)

La **pipeta** es un instrumento volumétrico de laboratorio que permite medir la alícuota de líquido con bastante precisión. Suele ser de vidrio. Está formada por un tubo transparente que termina en una de sus puntas de forma cónica, y tiene una graduación (una serie de marcas grabadas) indicando distintos volúmenes.

La **Probeta** es un **instrumento de laboratorio** que se utiliza, sobre todo en análisis químicos, para contener o medir volúmenes de líquidos de una forma aproximada. Es un recipiente cilíndrico de vidrio con una base ancha, que generalmente lleva en la parte superior un pico para verter el líquido con mayor facilidad.

La **placa de Petri**, o **cápsula de Petri**, es un recipiente redondo, de cristal o plástico, con una cubierta de la misma forma que la placa, pero algo más grande de diámetro, para que se pueda colocar encima y cerrar el recipiente, aunque no de forma hermética. Es parte de la colección conocida como «material de vidrio». Tiene uso en microbiología.

2. CULTIVO DE TEJIDOS EN ESPECIES LEÑOSAS

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto, constituye un problema serio y frecuente, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George, 1996; Leukkanen *et al.*, 2000; Murkute, 2003; Tang, 2004, Cabrera, 2003).

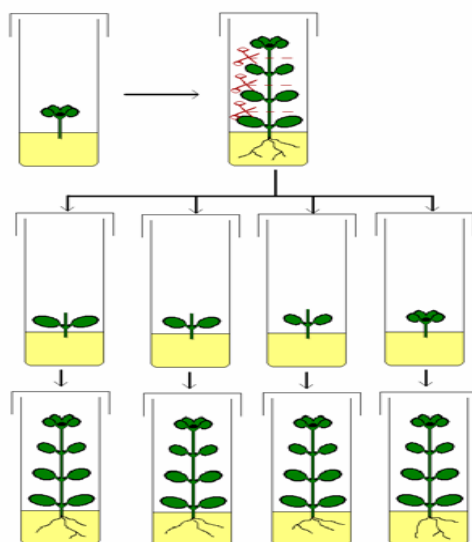
La compleja conformación de las distintas células de la madera en combinación con la rigidez propia de las paredes celulares le confiere al tejido leñoso su fortaleza. Estas especies presentan, en su mayoría, resistencia a ser propagadas *in vitro*. Por esta característica se les conoce como plantas recalcitrantes (Alexander, 2000).

Las especies leñosas se caracterizan por tener un tejido lignificado (Latín: *lignun*, madera), que proporciona rigidez a la pared celular y además, resistencia al ataque de los microorganismos, porque impide la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular. Las plantas leñosas son de crecimiento lento, de ciclo vegetativo largo.

El mejor medio para el desarrollo de brotes es WPM (*Wood Plant Medium*), suplementado con sacarosa (30 g/l); el medio WPM es bajo en concentración de sales, esta combinación favorece notablemente el enraizamiento de los explantes, (Pérez, 2001; Aguilar, *et al.*, 2010; Ocampo y Núñez, 2007, Yaya *et al.*, 2005).

Otros medios utilizados con frecuencia en el cultivo *in vitro* de plantas leñosas son los de sales basales MS con agar y el medio orgánico mínimo Murashige con agar y sucrosa. Para el cultivo de células y protoplastos y en la regeneración de plantas, es muy utilizado el medio B-5 o de Gamborg *et al.*, 1968 y sus derivados. La menor concentración de nitratos en B-5 marca la diferencia con el medio MS, aunque el B-5 posee una mayor concentración de sales en general, por lo que se conoce como el medio de sales mayores (López, 2009). El medio MS es llamado el de sales menores.

Figura 8. La micropropagación vegetal



Fuente: Biotecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina, 2006.

2.1 MICROPROPAGACIÓN *in vitro*

En la micropropagación *in vitro* se utiliza la cámara de cultivo que es un receptáculo diseñado para permitir el control de algunas variables del ambiente físico. Se pueden controlar la temperatura, la iluminación y el fotoperiodo y en algunos casos la humedad del aire y su composición (Griffiths, 2008). En las cámaras de cultivo, la temperatura de incubación oscila entre 20° C y 28° C. El fotoperiodo es importante. Como el cultivo *in vitro* tiene sacarosa, necesita menos luz que el cultivo *in vivo*. La luz es necesaria en los procesos fisiológicos como el

fototropismo, la germinación, la floración y otros (Pedroza, 2008). En la cámara de cultivo, es importante conocer cuál es el espectro que emiten las fuentes de luz y en qué medida se adapta este a las necesidades del cultivo. La irradiación *in vitro* es un 10% menor que el valor de plena insolación. Se utilizan diferentes lámparas entre ellas las lámparas incandescentes y fluorescentes, hay también lámparas de vapor de Hg (mercurio) y Na (sodio) (Morgan, 2011).

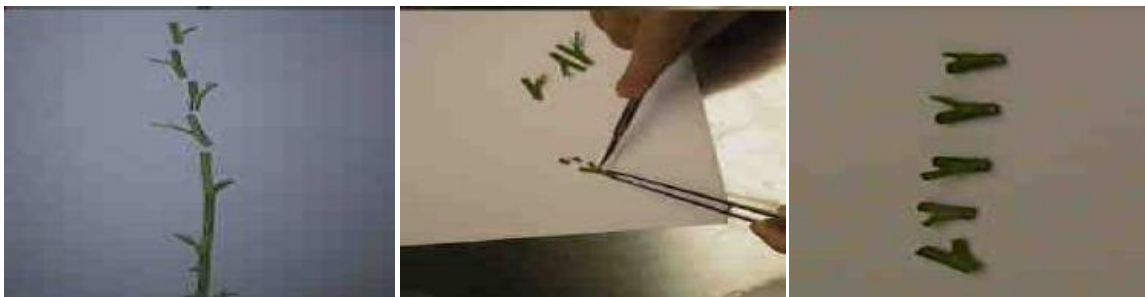
En el caso de la propagación de ocobo (*Tabebuia rosea*) y nogal cafetero (*Cordia alliodora*), Schuler *et al.*, (2005), reportaron el uso de las siguientes condiciones: los explantes se incubaron a una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 5$, 16/8 horas de luz/oscuridad y humedad relativa de 60% durante 30 días. Para la propagación de guayaba (*Psidium guajava* L.), Laffitte *et al.*, (2004), utilizaron un fotoperiodo de 16 horas, una temperatura de 26 ± 1 , durante 45 días

Para la propagación de leñosas, se pueden emplear diferentes fuentes de explantes. Se recomiendan nudos de 0.5 a 1.5 centímetros, provenientes de plantas jóvenes germinadas bajo condiciones controladas, plantas de 15 a 40 centímetros, también árboles adultos provenientes de viveros o de zonas cercanas al sitio donde se sembrarán (Barba, 2001).

El cultivo de segmentos nodales consiste en el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un brote a partir de la yema. Este es el método más natural de la propagación *in vitro* que también puede aplicarse *in vivo*. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *in vitro* (Pierik, 1990).

Los brotes adventicios se pueden producir a partir del explante directamente, o bien, a partir de callos derivados del explante primario. Para fines de propagación actualmente se prefiere producirlos del explante directamente, ya que a partir de callos su formación ha sido muy difícil y frecuentemente genera anomalías. En la diferenciación de brotes adventicios existe una interrelación entre el explante, el medio y las condiciones ambientales del cultivo (Villalobos y Thorpe, 1991).

Figura 9. Corte de los nudos.



Tomado de: www.fagro.edu.uy/~fisveg/docencia/cursos%20posgrado%20y%20...

Una planta que se ha originado *in vitro*, difiere en muchos aspectos de la que se forma *in vivo* (Pierik, 1990), ya que sus condiciones tanto ambientales como del sustrato, la luz, nutrición, son muy diferentes. Además es importante señalar que el crecimiento *in vitro* es heterótrofo y el crecimiento *in vivo* autótrofo. El ambiente *in vitro*, con una alta humedad relativa, bajo o nulo intercambio gaseoso, escasez de CO₂ durante casi todo el período, producción de etileno y baja densidad fotosintética, induce perturbaciones en las plantas desarrolladas bajo esas condiciones.

Tanto los explantes enraizados *in vitro* como *ex vitro* no están en condiciones para desarrollarse en un invernadero. Por lo tanto deben aclimatarse a las condiciones de humedad y luz del invernadero, disminuyendo progresivamente la humedad y aumentando poco a poco la intensidad de la luz (Caro, 2004).

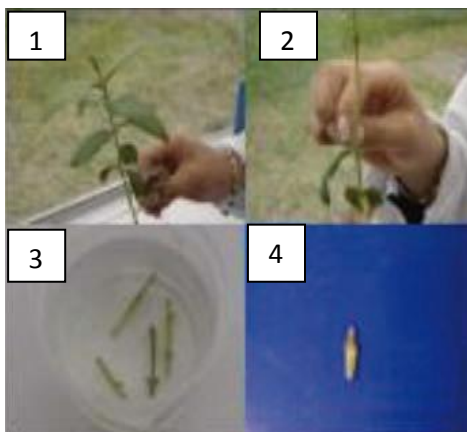
2.2 FUENTE DE EXPLANTES

Explante es cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos, etc.). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticos. Cuando se extrae un explante de la planta se debe tener en cuenta el tamaño, la fuente, la edad fisiológica del mismo. La asepsia de los explantes y las condiciones de esterilidad, donde se desarrolla el proceso de establecimiento del material vegetal *in vitro*, es de vital importancia para el éxito de la técnica de cultivo de tejidos vegetales.

El tamaño del explante es importante porque cuanto más grande sea, mayores serán las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello es posible que traiga 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 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).

Respecto a la fuente de explantes, Marquínez (1998), recomienda utilizar un banco de plántulas *ex vitro* utilizando semilla colectada de árboles sanos y vigorosos. También se puede realizar la germinación *in vitro* de las semillas seleccionadas, pero teniendo cuidado en el cumplimiento estricto de los protocolos de asepsia; además, es recomendable mantener estas plantas madres, es decir, las plantas donadoras, durante un tiempo que puede oscilar entre varias semanas a varios meses, en un invernadero bajo condiciones controladas. En este ambiente se cultiva la planta en un medio sanitario óptimo y con un control de nutrición y riego adecuados, que le van a permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2004).

Figura 10. Preparación de explantes.



1) Ramas jóvenes, 2) Deshoje del tallo, 3) Desinfección superficial y 4) Nudo aislado.
Tomado de: Ocampo y Núñez, 2007.

Los explantes que mejores resultados dan son los tomados de las plantas jóvenes (López, 2010; Mroginski *et al.*, 2002; Roque y Ardisana, 2006; Collado *et al.*, 2004; Marquínez, 1998), debido a que el desarrollo de la morfogénesis (capacidad de regenerar órganos y tejidos a partir de un explante inicial) es más rápido, la extracción de explantes se debe realizar en cabinas de flujo laminar para garantizar la asepsia.

Varios autores entre ellos Villalobos *et al.*, 1984 y Bonga, 1982, han encontrado que la edad del explante es importante en el desarrollo *in vitro* y crítico para las especies maderables; la micropropagación es más fácil empleando tejidos juveniles, y más difícil, con tejidos adolescentes y maduros.

La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles (Bonga, 1980; Dodds, 1982). Es importante por lo tanto, formar un banco de plántulas *ex vitro* utilizando semillas recolectadas de árboles sanos y vigorosos preferentemente cercanos al sitio donde se van a plantar los futuros árboles; los explantes se toman de plantas jóvenes (López, 2010; Marquínez, 1998).

Cuando se utilizan semillas, se recomienda para una mayor germinación, sumergirlas en agua a 75° C por medio minuto y remojarlas en agua a 18° C más

ácido giberélico (AG3), con dosis que pueden ser de 600 mg/L hasta 2300 mg/L, durante 24 horas (Hermosillo *et al.*, 2008).

De acuerdo con el material vegetal utilizado, la técnica la propagación *in vitro* puede ser de: Cultivo de órganos (yemas axilares y apicales, nudos en tallos), cultivo de tejidos (hojas, peciolo, meristemos) y cultivo de células (células y protoplastos), utilizando reguladores de crecimiento. En todos los casos se puede lograr como producto final, plantas enraizadas, que van a ser aclimatadas previamente a la etapa de desarrollo en viveros convencionales, en donde lograrán el crecimiento necesario para su instalación en el campo en forma definitiva (Domínguez, 1997).

Siguiendo las pautas dadas por (Gold *et al.*, 2005; Bacshetta, 2008; Nava *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2004; Rache *et al.*, 2010), se recomienda hacer un banco de plántulas *ex vitro* utilizando semilla recolectada de árboles sanos y vigorosos que se hallen cerca del sitio de la futura siembra.

Según las recomendaciones dadas por la CAR (1990), los frutos deberán recolectarse cuando se tornen de color marrón (o cuando se marchiten las flores) y luego de secarse al sol durante dos días se les extraerán las semillas; estas se sembrarán en semillero a 5 mm de profundidad, a 2 mm entre sí, en líneas separadas 10 centímetros, en tierra finamente tamizada y desinfectada. Posteriormente se cubrirán con una muy delgada capa de paja y se regarán. De acuerdo con la CAR, (1990), Marquínez, (1998), Gómez *et al.*, (1998), Carlson, (2004), el trasplante se deberá efectuar cuando la planta alcance 20 centímetros de altura. Tacaronte *et al.*, (2004), Lopes *et al.*, (2005), Universidad Católica (2006), Ocampo y Núñez, 2007, aconsejan que de este banco de plantas jóvenes que han estado bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, luminosidad, etc., se tomen nudos entre 0.5 cm. y 1.5 cm., (cada nudo tiene un meristemo axilar).

En la actualidad el Grupo de restauración ecológica de una Universidad Nacional (Greunal), posee en el páramo de Sumapaz a 3200 m.s.n.m., un vivero donde se han producido unas 70 especies nativas en diferentes estratos: herbáceo,

arbustivo y arbóreo. Allí se encuentran plantas leñosas como *Polylepis quadrijuga* Bitter (colorado) *Escallonia myrtilloides* (rodamonte) y *Escallonia paniculata* (tíbar) entre otras (García, 2012). El material de este vivero podría utilizarse para obtener los explantes de leñosas. Estas plantas por estar en el páramo a baja temperatura, tienen poca carga microbiana. Existe también la posibilidad de obtener explantes de leñosas en el vivero ubicado en la zona de páramo del Parque Nacional Natural del Cocuy (Muñoz, 2002).

El Jardín Botánico de Bogotá (www.jbb.gov.co), tiene viveros en el Parque de la Florida y en el túnel de propagación de la sede principal, para la producción y el desarrollo de especies vegetales, cuyo propósito es la arborización y jardinería urbana, con garantía la alta calidad de las plantas allí desarrolladas. Hay cerca de 98 especies entre las que se cuentan: arrayán (*Ageratina aristeei*), cajeto (*Cytherexylum subflavescens*), cedro (*Cedrella montana*).

2.3 PRUEBA DE VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS

Según Conci, 2004, los virus de plantas son responsables de importantes pérdidas en los rendimientos, llegando en algunos casos a ser limitantes para el cultivo. La mayoría de ellos no se transmiten por semilla, por lo tanto, las especies que se multiplican por esta vía, tienen la posibilidad de liberarse de estos patógenos en forma natural.

Si se va a constituir el banco de plantas *ex vitro* usando semillas, será necesario hacer la prueba de viabilidad. Los investigadores Bonner *et al.*, (1994), Moya, (2010), Vadillo *et al.*, (2004), usaron para este fin, cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (TZ) que es un indicador para revelar los procesos de reducción que se llevan a cabo en el interior de las células vivas y fue utilizado para diferenciar tejidos metabólicamente activos de aquellos que no lo eran, especialmente en viabilidad de semillas; a la semilla se le hace una pequeña incisión con un bisturí, en la zona alejada de la radícula, luego se le aplica la solución y se observa el resultado a las 12 horas. La solución es del 1% (10 gr de TZ por litro de agua destilada). Son semillas viables, aquellas en las cuales se tiñen de rojo todas las

partes esenciales del embrión. El compuesto blanco de tetrazoilo es reducido enzimáticamente a 1, 3,5-trifenilformazán o simplemente formazán de color rojo. En las zonas de necrosis, el tetrazoilo conservará su color blanco.

Figura 11. Prueba por tetrazoilo. Tejidos muertos de color blanco, alternando con tejidos sanos de color rojo.



Tomado de: www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/19/7AM19.htm

2.4 GERMINACIÓN

Azcón, (2000), recomienda el uso de tratamientos pre germinativos en semillas y embriones de especies leñosas y semileñosas, porque es muy importante para su posterior desarrollo y más aún en cultivos *in vitro*, ya que de esto depende el rompimiento de la dormancia externa e interna de las semillas. Es muy conocida la acción del ácido giberélico como un factor esencial en este proceso. Ramírez *et al.*, (2004), González, *et al.*, (2009), proponen otros tratamientos pre germinativos como son: la hidratación por varias horas-y solo servirán las semillas que absorban el agua (se verán hinchadas)-con agua hirviendo, con agua caliente, la escarificación mecánica, la escarificación química generalmente con ácido clorhídrico o agua oxigenada. La escarificación implica el adelgazamiento del endocarpio óseo de la semilla, que impide la absorción de agua. Este

adelgazamiento puede lograrse mecánicamente (lijando) desgastando la superficie de la semilla hasta que el endosperma se haga visible.

Figura 12. Desarrollo de brote y raíz *in vitro*



Tomado de: www.uhu.es.com

2.4.1 Tratamientos para germinación

Tabla N° 1. Diferentes tratamientos para germinación de semillas

1	2	3	4	5	6
Semilla en medio ácido H₂SO₄	Incisión en la testa y cultivo en la oscuridad	AG3 (3mg/l) Incisión en la testa y cultivo en la oscuridad	AG3 (3mg/l) Incisión en la testa y cultivo con luz	Prueba de imbibición en agua. Cultivo con luz	Prueba de imbibición en agua. Cultivo en la oscuridad

Fuente: Varios autores

Para el tratamiento con ácido sulfúrico (96% de pureza) es necesario hacer la prueba de germinación para diferentes tiempos (10 a 30 minutos) durante los cuales las semillas se encuentren totalmente cubiertas y a una temperatura entre 18°C-27°C. Después se lavan con el fin de eliminar todo el ácido y se colocan a remojar en agua durante 3 días, se desinfectan para posteriormente colocarlas en el sustrato de germinación, que puede ser el medio de cultivo para leñosas *Woody Plant Medium* (WPM) (FAO, 1989). Si se realiza la siembra directa de la semilla para germinación, debe hacerse en el sustrato recomendado por la CAR (1990). El lavado, el remojo y la desinfección serán iguales para los otros cinco tratamientos. El ácido giberélico (AG3), es una fitohormona que se utiliza en un rango de concentración de 0.01mg/litro - 10 mg/litro, para incrementar la germinación de las semillas (FAO, 1991), y estas se deben dejar de uno a tres días en remojo.

2.5 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

2.5.1 Plantas Madres.

Pedroza *et al.*, (2008), lograron excelentes resultados al desinfectar el material vegetal (las ramas de donde se tomarán los nudos) antes de realizar la disección del mismo; este material fue sumergido en Benlate (fungicida sistémico) al 2% durante una hora y luego se realizaron cuatro enjuagues con solución jabonosa y agua destilada estéril; después se hizo una inmersión de las ramas en alcohol al 70% durante un minuto y se lavaron con agua destilada estéril, tres veces.

Fuentes y Chuquillanque, (2003), aseguran que las contaminaciones bacterianas o fúngicas se pueden detectar mediante simples observaciones visuales (Microscopio estereoscópico). Existen bacterias endógenas que permanecen latentes en la planta y aparecen en subcultivos avanzados. Para las contaminaciones virales, el diagnóstico se realizará en las plantas madres, antes de introducirlas en el cultivo *in vitro*. Genberries, (2011), anota que recientemente se han desarrollado herramientas moleculares que permiten una mayor eficacia en el hallazgo de virus presentes en plantas, dirigidas a la detección de material

genético viral en el vegetal y que se basan en las reacciones de PCR (Reacción en cadena de polimerasa).

Robles, *et al.*, (2010) e Iglesias, (2004), recomiendan que se realicen ensayos inmunoenzimáticos (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*: ELISA) para virus. Fuentes y Chuquillanqui, (2003), afirman que este procedimiento inmunoenzimático se basa en la detección de un antígeno o anticuerpo inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción. Robles, *et al.*, (2010), Iglesias, (2004), Genberries, (2011), han comprobado que estos dos ensayos (ELISA y PCR) son los mejores para encontrar cantidades mínimas de agentes infecciosos (micoplasmas, virus y viroides) en plantas leñosas.

El uso de sondas moleculares ha dado buenos resultados. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes son las técnicas de mayor sensibilidad con las que se cuenta hasta el presente. Entre ellas se mencionan: PCR anidado, transcriptasa reversa (RT)-PCR, inmuno captura (IC) RTPCR, entre otras. Esto posibilita detectar los virus, aún en bajísimas concentraciones. Si bien estas pruebas son altamente sensibles, aún no son de uso masivo.

Para obtener resultados confiables es recomendable la combinación de varias pruebas, es decir, aprovechar la practicidad del ELISA y la sensibilidad de las técnicas moleculares u otras. En este caso las plantas que resultan negativas a ELISA pueden ser luego analizadas por una técnica más sensible y disminuir así el número de pruebas complicadas o costosas.

2.5.2 Semillas.

Marquínez, (1998) sugiere el siguiente tratamiento, que elimina todas las bacterias y hongos: Antes de colocar las semillas en el sustrato de germinación, es necesario lavar las semillas con agua destilada esterilizada, más 5 gotas de jabón líquido y antioxidantes como ácido cítrico y ascórbico (50 mg/litro). Enseguida se hacen cuatro (4) enjuagues con agua destilada estéril. A continuación se ejecuta una inmersión en etanol al 70% durante un minuto.

Seguidamente se realiza una inmersión en NaOCl al 5% (p/v) durante 5 minutos. Finalmente se enjuaga con agua destilada esterilizada, más antioxidantes como ácido cítrico y ácido ascórbico (50 mg/litro).

Frank Aponte, en el año 2008, determinó un procedimiento para la esterilización de semillas de Bolaina blanca (*Guazuma crinita*) y Cedro (*Cedrela odorata*), para su germinación *in vitro*. Con hipoclorito de sodio al 2% durante 40 minutos logró cero contaminación para las semillas de cedro (*Cedrela odorata*), mientras que para la Bolaina blanca (*Guazuma crinita*) se necesitaron 30 minutos para similares resultados.

Sánchez, *et al.*, (2012), lograron cero contaminación en semillas de Volantín (*Gyrocarpus americanus* H.), lavándolas primero con jabón líquido, colocándolas posteriormente en una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) al 10% durante 15 minutos y sumergiéndolas más tarde en etanol al 70% durante 5 minutos.

El baño con Hipoclorito de sodio (1% de cloro activo, durante un minuto) arrojó buenos resultados en el tratamiento de semillas de tomate (Walasek, 2012), logrando cero contaminación y germinación del ciento por ciento. Igual resultado obtuvieron Díaz y Hernández, (2003), en semillas de tomate (infectadas con *Fusarium oxysporum*) y baño con hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos.

2.5.3 Explantes.

La desinfección superficial de los explantes se puede realizar mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos con el menor daño posible para el explante. El procedimiento más utilizado consiste en una doble desinfección mediante la inmersión de los explantes en etanol (70%v/v) durante 20-60 segundos seguido de hipoclorito de sodio 1-3%, durante 3-30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante. Algunos procedimientos se basan en el empleo de únicamente etanol o de hipoclorito de sodio. Finalmente, es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua destilada estéril.

Es importante la eliminación de los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) que se encuentran en la superficie del explante y que en el momento de la siembra y del desarrollo establecen competencia con él, disminuyendo los nutrientes que este requiere para su desarrollo, y que producen metabolitos tóxicos que afectan su crecimiento y su enraizamiento. Este procedimiento puede realizarse lavando el explante con desinfectantes como hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata o cloro comercial, estos agentes desinfectantes pueden actuar como bactericidas y/o bacteriostáticos.

En los casos en los cuales no se utilice etanol, la adición de agentes tensoactivos junto con el desinfectante es lo recomendado. El más utilizado es Tween-20. El proceso de desinfección superficial con hipoclorito de sodio es de fácil manejo y no es tóxico para el material de siembra utilizado. Se sumergen los explantes en una solución al 5% (p/v), con dos gotas de Tween 20, durante diez minutos y se enjuagan cuatro veces con agua destilada estéril. Con esta desinfección se obtiene una contaminación cero en todos los explantes utilizados (Revista Corpoica, 2007; Pérez y Ramos, 2012). Un lavado previo de los explantes con agua corriente y detergentes, ayuda a una mejor desinfección.

La esterilización se puede hacer mediante inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos, seguida de 25 minutos en agitación en una solución acuosa al 21% de Hipoclorito de sodio tomada de una solución de lejía comercial. Después se lavan tres veces con agua destilada esterilizada (Zárate R, *et al.*, 1997).

Luego de la desinfección superficial, los explantes (partes de la planta o de semillas) se colocan en un medio de cultivo estéril. En un período de una o dos semanas se inicia el proceso de germinación o regeneración de los nuevos tejidos vegetales. Durante esta fase se espera que los explantes originen brotes con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con un medio de cultivo estéril. Periódicamente estos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo

laminar o en un lugar aislado que permita mantener las condiciones de asepsia. De esta manera se aumentará el número de plantas en cada repique o división de las plantas, que dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2004).

Los explantes se deberán desinfectar (Villamizar, 2005; Suárez *et al.*, 2006; Roca, 1991) para liberarlos de bacterias y hongos y poder realizar posteriormente los cultivos, ya que existe una gama de productos o compuestos químicos que es posible utilizar como desinfectantes, pero en la actualidad, se ha generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 5% (p/v), con menor frecuencia se utilizan el hipoclorito de calcio [Ca (OCl)₂] del 6% al 12% y el cloruro de mercurio (HgCl₂) del 0.1% al 1.5% que es muy tóxico y difícil de remover del explante, en algunos casos, resulta útil emplear un agente tenso activo, por ejemplo Tween-20 del 0.01% al 0.1%. Después de usar los desinfectantes será necesario remover los restos de estos por medio de lavados con agua destilada estéril, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos durante mínimo 5 minutos cada uno (Roca, 1991).

Hay soluciones biocidas que matan bacterias y hongos, previenen la germinación de esporas y a altas concentraciones pueden eliminar contaminaciones de microorganismos endófitos, uno de estos compuestos es el PPM (Plant preaservative Mixture) (Díaz *et al.*, 2005).

Para la desinfección de los nudos, se recomienda aplicar tratamientos mediante el uso de Alcohol al 70% y NaOCl en concentraciones de 2.5% y 5% durante diferentes lapsos que podrán ser de 1, 2, 3, 4 y 5 minutos, donde se evalúan los siguientes parámetros: porcentaje de contaminación, porcentaje de oxidación y porcentaje de supervivencia, siendo este último, la variable respuesta definitiva, para escoger el mejor tratamiento de desinfección. Para todos los tratamientos se establecen las siguientes variables: supervivencia (número de explantes vivos), desarrollo (longitud de los brotes diferenciados), presencia de contaminantes (número de unidades experimentales contaminadas), tipo de contaminación

(hongos o bacterias) y presencia de oxidación fenólica. La determinación de la oxidación fenólica se efectúa en forma visual (Microscopio estereoscópico).

Una de las mayores limitantes en el desarrollo de las plantas leñosas, es la dificultad para erradicar las enfermedades endógenas y la excreción de sustancias como polifenoles y taninos que en la etapa de adaptación *in vitro* crean oxidación (Villamizar, 2005, Hernández y González, 2010). El establecimiento de cultivos *in vitro* de tejidos procedentes de plantas leñosas, se verá impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos. El fenómeno de ennegrecimiento ocurre por la acción de enzimas tipo polifenoxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren lesiones o heridas. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse, afectar las proteínas y en consecuencia inhibir el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Hernández y González, 2010). Los tejidos adultos de especies leñosas, particularmente de angiospermas, liberan al medio de cultivo pigmentos constituidos principalmente por polifenoles y taninos; es por eso que la oxidación fenólica es un problema grave en el cultivo *in vitro* de las especies leñosas. Se recomienda no utilizar tejidos adultos y utilizar sombra para disminuir la oxidación. Pérez y Jiménez, (1995), recomiendan la incubación en condiciones de oscuridad como método para evitar la síntesis de fenoles, porque los productos de la oxidación fenólica se forman bajo condiciones de iluminación, que se manifiestan en la zona basal del corte del nudo, y en las lesiones que dejaron las hojas al ser retiradas de los nudos).

Hernández y González, (2010), encontraron que la oxidación en plantas leñosas, puede ser controlada por los niveles de irradiación recibidos por las plantas madres, debido a que la actividad de muchos sistemas enzimáticos que participan en la síntesis y oxidación de los fenoles, es inducida por la luz. Por lo tanto, es conveniente, que los explantes permanezcan en la oscuridad unos días, antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja.

2.6 DESINFECCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La cámara presurizada utilizada generalmente en los laboratorios es la autoclave. Una vez los medios de cultivo han estado el tiempo suficiente en la autoclave, se tienen que dejar enfriar hasta alcanzar unos 60°C. Esta temperatura permite coger los matraces con la mano. Cuando se ha alcanzado la temperatura adecuada, se procede a la adición de los componentes termolábiles que han sido esterilizados previamente por filtración (Del Campo *et al.*, 2007). Para establecer cultivos asépticos será necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizando los medios de cultivos en una autoclave a una presión de 15 libras (aproximadamente una atmósfera), durante 15 a 20 minutos. A esta presión la temperatura del vapor de agua será de 121°C, suficiente para eliminar eficazmente todas las formas microbianas (Azofeifa, *et al.*, 2008).

2.7 MEDIOS DE CULTIVO

Luego de la desinfección superficial, el material vegetal seleccionado se coloca en un medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo del cultivo *in vitro*.

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* varían con la especie, son específicos de acuerdo con la parte de la planta que se esté cultivando y la respuesta que se desee obtener. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones para los medios de cultivo.

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los explantes vegetales. Estos medios son esenciales en el laboratorio de tejidos de cultivo *in vitro* por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y

uso, asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Se han creado numerosos medios de cultivo cuyas diferencias estriban en las cantidades y tipos de sales empleadas. Entre los más conocidos se encuentran: Murashige y Skoog (MS) (1962); Linsmaier y Skoog (LS) (1965); Borgin y Nitsch (BN) (1967); Gamborg (B5) (1970); White (1963), Miller y Oyima (1968).

Los componentes de los medios de cultivo han sido objeto de estudios extensivos. Generalmente se agrupan en cinco clases de compuestos: a) macro y micro elementos; b) fuentes de carbono, generalmente sacarosa; c) vitaminas; d) nitrógeno reducido, y e) reguladores del crecimiento (Villalobos *et al.*, 1984).

El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas, se deben incluir los macro elementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, y Mg) y los micro elementos (B, Zn, Cu, Mo, Fe, Cl); pero, para determinar la formulación adecuada, que le brinde al tejido la mejor oportunidad de desplegar su capacidad intrínseca para crecer, se debe hacer a través de la experimentación (Roca, 1991). El Nitrógeno (N), forma parte de los aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos, se suministra el nitrógeno en forma de nitrato y amonio; el Magnesio (Mg), es parte de la molécula de clorofila y de los ribosomas; el Calcio (Ca), es constituyente de la pared celular e interviene en la respuesta del crecimiento; el Fósforo (F), forma parte de las moléculas que almacenan y transfieren la energía química de los ácidos nucleicos, de él depende la energía celular; el Potasio (K), desempeña un papel importante en la regulación osmótica y en la actividad enzimática; el Azufre (S), es necesario para la síntesis de algunos aminoácidos (García, 2000); el Hierro (Fe), forma el núcleo del citocromo y parte de la ferredoxina; el Molibdeno (Mo), es fundamental para la actividad de la nitroreductasa; el Manganeseo (Mn), induce la síntesis de clorofila que se requiere para la formación del O₂ en la fotosíntesis; el Boro (B), es necesario para el sostenimiento de la actividad meristemática y hace parte de la síntesis de bases nitrogenadas como el uracilo; el Cobre (Cu), permite la oxidación respiratoria final y está ligado al proceso de lignificación; el Zinc (Zn), es requerido para la oxidación y la hidroxilación de compuestos

fenólicos; el Cobalto (Co), es un componente de la vitamina B₁₂; el Cloro (Cl), es fundamental para las reacciones que llevan a la evolución del O₂ en la fotosíntesis (García, 2000).

Los azúcares son productos de la fotosíntesis de las plantas, proceso por medio del cual la planta convierte el dióxido de carbono y agua en carbohidratos con la ayuda de la clorofila y la luz. Sin embargo las plantas que crecen *in vitro*, debido a la baja intensidad lumínica no pueden fabricar el azúcar que requieren, por lo que es necesario adicionar al medio de cultivo, la sacarosa. La sacarosa es la más utilizada para propósitos de micropropagación. Generalmente se usan concentraciones de 1%-6% de sacarosa en el medio de cultivo, aquí es convertida rápidamente en glucosa y fructosa; la glucosa es la que primero se utiliza seguida de la fructosa. El azúcar blanco refinado, puede resultar adecuado para la micropropagación en muchos casos. Se trata de un producto purificado y de acuerdo con los análisis se compone de 99,94% de sacarosa, 0,02% de agua y 0,04% de otras sustancias (no hay indicaciones de que estas últimas puedan causar toxicidad *in vitro*) (Pierik, 1990).

Para lograr un buen crecimiento de las plantas *in vitro*, es necesario suplir el medio con una o más vitaminas. La más utilizada es la B1 (Tiamina) y se la considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro* tales como: B2 (Riboflavina), B3 (ácido nicotínico), B5 (Ácido pantoténico), B6 (Piridoxina), B9 (ácido fólico), vitamina H (Biotina), vitamina E (α - tocoferol), vitamina C (Ácido ascórbico), con un rango de concentración de 1-100 mg/l.

El uso de nitrato exige una mayor demanda energética para la asimilación del nitrógeno si se compara con el amonio, algunos explantes crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido, recomendándose en este caso la adición de un ácido orgánico. Las fuentes de nitrógeno reducido son los aminoácidos, que están rápidamente disponibles, por ejemplo la glutamina. El papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales es complejo, ya que los tejidos responden en forma diversa a su suplemento (Krikorian, 1991).

Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1 mM (milimolar: 0.001 moles por litro de solución). Cada uno de los reguladores no solo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y diversos factores ambientales. Por lo tanto es muy riesgoso generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo de un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury & Ross, 1994).

Las sustancias reguladoras de crecimiento vegetal son las auxinas, las citoquininas y las giberelinas como inductoras de crecimiento y el ácido abscísico y el etileno, como inhibidores del crecimiento (Rodríguez *et al*, 2009).

Las auxinas son una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*. En las plantas las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales, y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies, 1995). Las auxinas más utilizadas son el AIA (Ácido Indol-3- Acético), el ANA (Ácido α -Naftalenacético), el 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), el AIB (Ácido Indol Butírico), el pCPA (Ácido p-clorofenoxiacético) y el BTOA (Ácido Benzotiazol-2-oxiacético).

El ácido indol-3- acético o AIA es la auxina más conocida, es una hormona natural que se produce en los ápices de los tallos, meristemos y hojas jóvenes de yemas terminales, de allí migra por el floema al resto de la planta en forma basipétala (de arriba para abajo), durante su circulación, la auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical (Suárez, 2011).

En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula. La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros (Cleland, 1995).

Las citocininas o citoquininas son derivados de la adenina que promueven la división celular. Entre las más utilizadas están: BA (Bencil Adenina), KIN (Cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea (Zeatina), 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citoquininas sintéticas y las dos últimas naturales. Las citoquininas producen efectos fisiológicos como división celular, regulación de la morfogénesis, rompimiento de la dominancia apical, retraso de la senescencia foliar, promoción de la maduración de los cloroplastos. Las citoquininas en interacción con las auxinas, regulan la diferenciación *in vitro*. La relación elevada de citoquininas/auxinas produce tallos, la relación baja de citoquininas/auxinas produce raíces (Krikorian, 1995). Las citoquininas son producidas en las zonas de crecimiento como los meristemos, en la punta de las raíces (zonas próximas del ápice) y son transportadas vía acropétala (de abajo hacia arriba), moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema desde el ápice de la raíz hasta el tallo o brote, estimulando la división celular en tejidos no meristemáticos (Suárez, 2011).

Las giberelinas son fitohormonas reguladoras del crecimiento de las plantas. La giberelina usualmente utilizada en cultivos vegetales es GA3, conocida también como ácido giberélico. En un cultivo de tejidos GA3 se usa para estimular la elongación de los tallos o la conversión de brotes a tallos. Puede reducir la formación de brotes *in vitro* si se aplica a cultivos de tejido vegetal en la etapa de

iniciación. GA3 generalmente reduce la formación de raíces y la embriogénesis *in vitro* (Paredes, 2009).

El ácido abscísico es un inhibidor de crecimiento, el cual reprime la embriogénesis somática y reduce la frecuencia de anomalías de desarrollo como son formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos y la germinación precoz. El ácido abscísico (ABA) en la mayor parte de los casos produce un efecto negativo en los cultivos *in vitro*, pero en determinados casos promueve la maduración de embriones, y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular (Quemada, 2006).

El etileno, interviene en procesos como: liberación de la dormancia, crecimiento y diferenciación de brotes y raíces, formación de raíces adventicias, abscisión de hojas, flores y frutos, inducción de floración en algunas plantas, senescencia de hojas, flores y maduración de frutos (Méndez, 2012). Ver: Anexo No. 1. Medios de cultivo.

Después de agregar todos los componentes del medio de cultivo, se procede a ajustar el pH final, añadiendo NaOH 0.1N, para obtener un pH de 5.8. Los valores bajos, inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos (Rossi, 2003).

La temperatura a la que está expuesto el explante cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de los procesos fisiológicos y por lo tanto es un factor fundamental que se debe controlar. Cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo (20°C-28°C). Este intervalo puede variar de acuerdo con el genotipo, tipo de explante, época del año, edad de la planta madre, fotoperiodo, etc. La humedad relativa debe estar entre 80% y 90%. El ciclo de luz oscuridad generalmente es de 16/8 horas. La luz es uno de los factores determinantes del desarrollo de los organismos autótrofos, por ello es importante controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*. La luz proporciona la energía para la fotosíntesis. Las necesidades de luz *in vitro* son menores que *in vivo*, dado que el medio de cultivo tiene cantidades importantes de sacarosa, los cultivos *in vitro* se portan parcialmente como autótrofos (Rossi, 2003).

El medio de cultivo recomendado por Rossi, (2003); Corredoira *et al.*, (2011), Tapia, (2010), Lopes, *et al.*, (2005), Ocampo y Núñez, (2007), para el desarrollo de explantes de plantas leñosas es: WPM (*Woody Plant Medium*).

Tabla N° 2. Composición de WPM (*Woody Plant Medium*)

MACRONUTRIENTES	mg/l	MICRONUTRIENTES	mg/l
Nitrato de amonio NH ₄ NO ₃	400	Ácido Bórico H ₃ BO ₃	6.2
Cloruro de Calcio CaCl ₂ ·2H ₂ O	96	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	37.2
Sulfato de Magnesio MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	Sulfato Cúprico CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25
Sulfato de Potasio K ₂ SO ₄	990	Sulfato Ferroso FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
Fosfato Potásico KH ₂ SO ₄	170	Sulfato de Manganeseo MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
Nitrato de Calcio Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	556	Sulfato de Zinc ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
		Molibdato de Sodio Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Aditivos	Myo-Inositol 100mg/l	Piridoxina-HCl 0.5mg/l	Glicina 2.0 mg/l
Sucrosa 20 g/l	Ácido Nicotínico 0.5 mg/l	Tiamina- HCl 1.0 mg/l	Agar 6 g/l

Tomado de: Instituto Tecnológico Superior de Misantla. México.

2.8 CONDICIONES DE CULTIVO

De acuerdo con Atares, (2007), Castillo, (2009), Salazar, (2008), los explantes se colocarán en una cámara de crecimiento controlado, para su desarrollo y crecimiento. Las condiciones ambientales durante el período de incubación deberán ser mantenidas en el fotoperiodo de 14:10 (luz/oscuridad), temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, lámparas fluorescentes de luz blanca de una intensidad de 3000 Lux, Humedad Relativa del 70% y pH de 5.8. Contando con total esterilidad.

2.9 MULTIPLICACIÓN O PROLIFERACIÓN

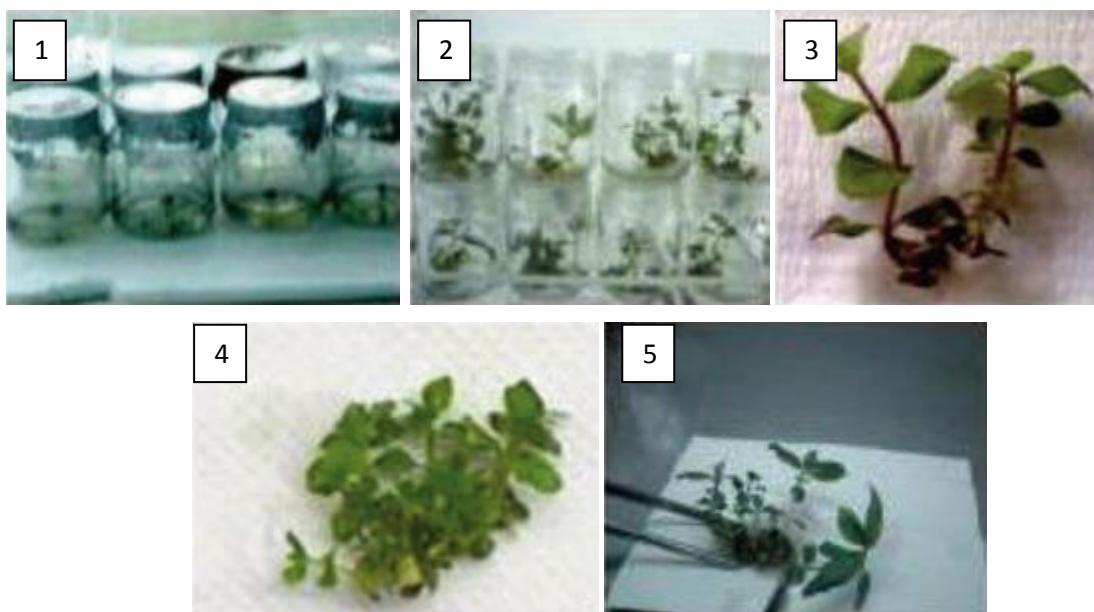
Una vez que el explante se ha adaptado a las condiciones del laboratorio, sin presentar algún tipo de contaminación endógena o exógena, es pasado a un nuevo medio de cultivo, agregándole algunas fitohormonas necesarias en el proceso de organogénesis. A medida que el explante comienza a crecer y multiplicarse es subdividido y cada nuevo explante es cultivado individualmente en un nuevo medio de cultivo, una vez multiplicado y desarrollado, nuevamente es subdividido y a esta parte se le llama subcultivo; el número de subdivisiones depende de la especie (Suárez, 2011).

Para disminuir las contaminaciones se debe realizar una adecuada preparación de la planta donadora de explantes, cultivándola preferentemente en invernaderos tratados con productos químicos que eliminen patógenos y eventuales microorganismos endófitos particularmente los hongos (Gamboa, 2006).

Los reguladores del crecimiento vegetal son compuestos orgánicos distintos a los nutrientes, que en cantidades pequeñas aumentan, evitan o cambian de alguna manera el proceso natural y fisiológico en la planta. Es necesario conocer el agente inductor del mayor porcentaje de brotes, y, aplicarlo a los segmentos nodales. Estos brotes se individualizarán y se establecerá una nueva fase de multiplicación bajo las mismas condiciones iniciales de inducción. Se puede hallar el agente inductor, realizando un tratamiento con reguladores de crecimiento tipo

citoquinina: 6-Bencilaminopurina (BAP), Benciladenina (BA) y 6-furfurilaminopurina (KIN), cada una con tres concentraciones diferentes (0.1, 0.5 y 1.5 mg/l) y un tratamiento testigo sin reguladores.

Figura 13. Producción de brotes adventicios a partir de nudos.



1) Segmentos nodales en medio de cultivo. 2) y 3) Brotes a los 15 días. 4) Brotes a los 30 días. 5) Brotes para nueva multiplicación. Tomado de: Ocampo y Núñez, 2007.

2.10 ENRAIZAMIENTO

La edad de la planta madre influye en la capacidad de enraizamiento y se recomienda la aplicación de hormonas para la propagación de plantas (Rodríguez, 2012). En castaño (*Castanea dentata*) y roble (*Quercus humboldtii*), también se ha comprobado la pérdida de la capacidad de enraizamiento *in vitro* de material adulto con relación al material del mismo genotipo que retiene características juveniles (Greenwood, 1987; Bonga *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2000).

En general, la evidencia demuestra que la facilidad de enraizamiento de tejidos juveniles es más función de la facilidad de formar raíces que de una restricción física para la emergencia radicular. Algunos de los factores que pueden ser determinantes en el éxito del enraizamiento de los explantes, son el tipo y cantidad de auxinas aplicadas para favorecer la formación de raíces adventicias porque modifican la extensibilidad celular, al producir factores que ablandan la pared. El ácido indolbutírico (AIB) es un fitorregulador auxínico sintético comúnmente utilizado por su estabilidad, ya que es muy resistente a la oxidación por la luz, enzimas u otros agentes (Azcón, 2000). La concentración de AIB varía con la especie que se esté utilizando.

Después de la fase de multiplicación, los brotes obtenidos nuevamente, se individualizan y se llevan a la fase de enraizamiento. Para el enraizamiento se pueden evaluar seis concentraciones diferentes de Ácido indolbutírico AIB (0, 1, 2, 4, 6, 8 mg/l), y también Ácido naftalenacético (ANA) con iguales concentraciones que el AIB. Luego de conocer el mejor sustrato para el enraizamiento, se hará el cultivo de los brotes en él, y cuando las plántulas ya estén enraizadas se transferirán a las condiciones de la cámara húmeda.

Figura 14. Etapa de enraizamiento



Tomado de: www.webapp.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo6

Figura 15. Planta micropropagada y enraizada



Tomado de: Suárez *et al.*, 2006.

2.11 ENDURECIMIENTO Y ACLIMATACIÓN

Las plantas formadas en condiciones *in vitro*, crecen bajo un ambiente controlado y si son llevadas a su ambiente natural, pueden deshidratarse fácilmente y morir, por lo tanto, es muy importante que sean sometidas a un acondicionamiento previo llamado endurecimiento o aclimatación (Suárez, 2011).

Después de transferir las plantas al ambiente *ex vitro*, estas deben modificarse para lograr la adaptación al nuevo ambiente, ya sea en el invernadero o en el campo, algunas posibles adaptaciones a las condiciones *in vitro*, que inducen perturbaciones en las plantas que se están desarrollando, son por ejemplo: alta humedad relativa, bajo o nulo intercambio gaseoso, escasez de CO₂ durante casi todo el período, producción de etileno y baja densidad fotosintética. Por otra parte, la anatomía de la hoja es influenciada por la luz y la humedad, diferenciándose anatómicamente de las originadas *in vivo* (Brainerd *et al.*, 1981).

Figura 16. Planta creciendo en condiciones *in vitro*



Tomado de: www.moradelacastilla.blogspot.com

La aclimatación es un factor importante en la posterior supervivencia de la planta, ya que es una etapa crítica dentro del proceso, en la que se produce la mayor pérdida de plantas. En ella es importante comenzar reduciendo gradualmente la humedad relativa, para permitir con esto además del cierre estomático, una mejor formación de cutícula y disminuir la pérdida de agua. Por otra parte, para tener mejores resultados en el establecimiento *in vivo* es necesario el desarrollo radicular *in vitro* (Pierik, 1990).

En las evaluaciones realizadas (Rosenberg, 2005) en plantas de vid (*Vitis vinífera*) y cerezo (*Prunus cerasus*), se observó que una planta que se ha originado *in vitro*, difiere en muchos aspectos de la que se forma *in vivo*, confirmando la apreciación de Pierik (1990), ya que sus condiciones tanto ambientales como del sustrato, la luz, nutrición, son muy diferentes. Además es importante señalar que el crecimiento *in vitro* es heterótrofo y el crecimiento *in*

vivo autótrofo. El ambiente *in vitro*, con una alta humedad relativa, bajo o nulo intercambio gaseoso, escasez de CO₂ durante casi todo el período, producción de etileno y baja densidad fotosintética, induce perturbaciones en las plantas desarrolladas bajo esas condiciones.

Las plantas obtenidas *in vitro* tienen: hojas delgadas, tallos débiles, raíces débiles y poco funcionales, conexión tallo-raíz incompleta, baja tasa fotosintética. El proceso de adaptación debe ser gradual, con disminución de la humedad relativa, crecimiento autotrófico y condiciones sépticas. Las plantas *in vitro* presentan poca capacidad de retención de agua. El desarrollo de las plantas *in vitro* permite una elevada humedad relativa en el interior de los frascos, baja intensidad luminosa, bajo intercambio gaseoso, abundante disponibilidad de nutrientes y carbono (generalmente en forma de sacarosa) y una pequeña variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo (Aloísio, 1997).

Durante las dos primeras semanas después del trasplante, es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y prácticamente se requiere simular las condiciones del ambiente *in vitro*, para que las plantas se adapten a las nuevas condiciones; para evitar el exceso de transpiración de las jóvenes plantas, y lograr un adecuado desarrollo de sus estomas y cutícula, es necesario mantener una elevada humedad relativa (Haggman *et al.*, 1999; Sánchez, 2000).

Las plantas cultivadas *in vitro* micorrizadas enfrentan mejor la fase de aclimatación. La simbiosis mejora en las plantas la captación y asimilación de nutrientes de baja movilidad como el fósforo. Además reduce el estrés hídrico causado por el deficiente desarrollo de la raíz y mejora el funcionamiento fotosintético y estomático. Los hongos micorrícicos arbusculares establecen en la planta un sistema de defensa frente a patógenos, incrementan el crecimiento foliar y radicular e inducen la producción de hormonas en la planta (Espín, *et al.*, 2010).

Después de 30 días, se trasladan las plantas al exterior de la cámara húmeda donde las condiciones son: humedad relativa del 40 al 60%, riego a capacidad de campo, sombra del 70%. Esta fase puede durar 30 días. El sustrato de

endurecimiento es de tierra abonada con escoria finamente pulverizada y cascarilla de arroz (2:1:1), todo esterilizado; bolsas de polietileno, y humedad relativa alta durante las primeras semanas, para obtener un porcentaje alto de supervivencia de plantas adaptadas (Osorio, 2005). La planta desarrollada *in vitro* tendrá una primera aclimatación en el laboratorio (invernadero), y una segunda en el campo (Garner, 2008).

Como último paso, se siembran las plantas en el sitio definitivo. Allí, se prepara, con dos o tres meses de anticipación a la siembra, una mezcla de tierra negra sin guijarros 89%, aserrín 10% y abono orgánico 1% (gallinaza), en huecos de 60 x 60 cm (CAR, 1983).

Figura 17. Invernadero de aclimatación



Tomado de: www.vipesa.arquitecturaweb.com

Rache *et al.*, (2010), recomiendan que cuando las plantas *in vitro* ya estén listas para la aclimatación (tres o más raíces con la raíz principal de 5 cm a 7 cm y altura de la planta de 6 cm a 7 cm), se deben limpiar con agua destilada estéril, eliminando completamente el agar, para evitar la aparición de hongos y la deshidratación en el proceso de cambio de sustrato; además, se debe

proporcionar inicialmente a las plantas trasplantadas una sombra del 70% en la cámara húmeda cuya humedad relativa es cercana al 100%. La temperatura es de $12 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La aplicación del riego es por nebulización (Si no se cuenta con cámara húmeda, las plantas después de eliminarles todo el agar que tengan, se trasplantan a recipientes con suelo estéril y se cubren con bolsas de polietileno, que se irán perforando gradualmente hasta cuando queden eliminadas completamente en un período de 15 a 20 días, lo que ayudará a las plantas a adaptarse paulatinamente a las condiciones del invernadero). Suárez *et al.*, (2006), advierten que después de 30 días en la cámara húmeda, las plantas deben trasladarse a condiciones de invernadero: Riego a capacidad de campo, sombra del 70% y temperatura de 12°C . Esta fase puede durar unos 30 días. Martínez *et al.*, (2006), sostienen que las plantas se deben pasar a bolsas de polietileno negro de 20x11 cm que contendrán: tierra negra abonada, escoria finamente pulverizada y cascarilla de arroz (2:1:1), todo esterilizado. Cuando las plantas tengan más de 30 centímetros de altura se pueden plantar en el sitio definitivo.

Muñoz, (2002), afirma que no necesariamente se debe enriquecer el suelo de páramo agregando abonos, ni elementos correctivos; es importante mantener, eso sí, las condiciones naturales del suelo donde se desarrollarán las especies a propagar; y también asegura que, las plantas propagadas en alturas superiores presentan mejor aclimatación y adaptación al páramo, que las producidas en condiciones de inferior altitud y permiten mayores porcentajes de crecimiento y desarrollo.

Figura 18. Invernadero de aclimatación y endurecimiento



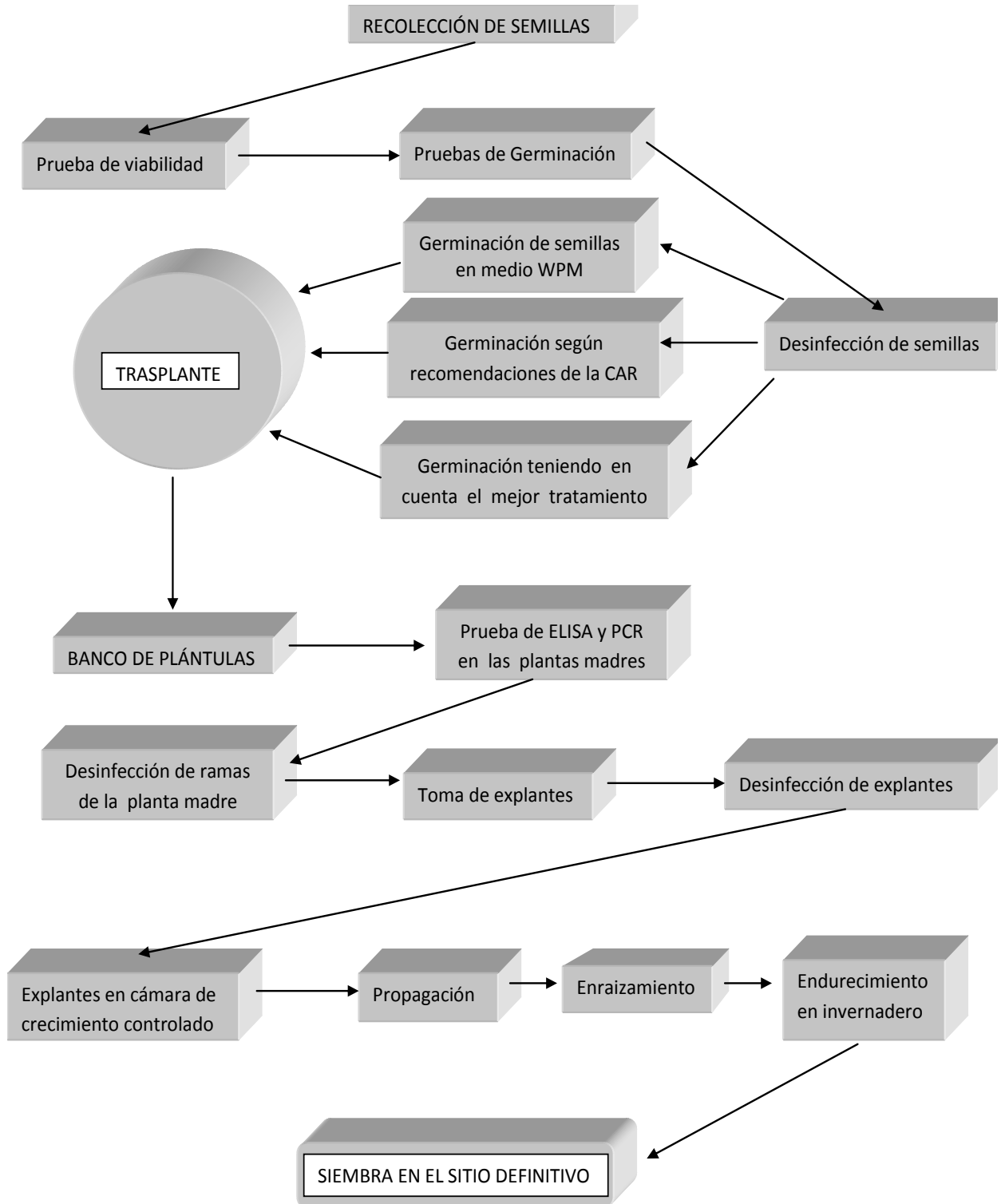
Tomado de: www.produccion-paulownias.c...

Figura 19. Plantas micropropagadas adaptadas a condiciones *ex vitro*.



Tomado de: Suárez *et al.*, 2006.

Figura 20. Resumen de la propagación *in vitro*



Fuente: El autor, 2012.

CONCLUSIONES

Las actividades de micropropagación *in vitro* de especies leñosas y forestales se iniciaron con estudios de la organogénesis y la embriogénesis de diferentes especies tales como, cafeto (*Coffea arabica* cv. Caturra rojo, *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, *Coffea canephora* var, Robusta), guayaba (*Psidium guajava*L.), teca (*Tectona grandis* L.), pino (*Pinus caribaea*), caoba (*Swietenia macrophylla*), majagua (*Hibiscus elatus* L.), morera (*Morus alba* L.) y Eucaliptus spp). Hoy en día esta técnica se aplica a más de 140 especies leñosas con mucho éxito, siendo la técnica más importante para este tipo de plantas la embriogénesis somática con la cual se logra un gran número de plantas en un corto tiempo.

La micropropagación *in vitro* es una de las técnicas más usadas para: erradicar patógenos de las plantas, propagar clones sanos en grandes cantidades y en corto tiempo, multiplicar plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales, facilitar el transporte del material *in vitro* de un lugar a otro, posibilitar la multiplicación rápida de una variedad de la cual existan pocos individuos y esté en peligro de extinción.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M., Villalobos, V., y Salgado, R. (2010). *Cultivo in vitro de Paulownia tomentosa*. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Campo experimental Uruapan, México. Recuperado el 25/08/12: <http://agroforestal.com.mx/content/cultivo-vitro-de-paulonia>
- Alexander, P., Bahret, M., Chaves, J., Courts, G., y D'Alessio, N. (2000). *Biología*. Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey. Needham, Massachusetts. USA.
- Aloísio, X. (1997). Enraizamiento *in vitro* de gemas de *Eucalyptus* multiplicados me alargados. *Revista Scientia Forestalis*. 51:29-26 pp. Brasil.
- Aponte, F. (2008). *Determinación del protocolo de desinfección de semillas de Bolaina blanca (Guazuma crinita Matr.) y Cedro (Cedrela odorata L.) para germinación in vitro*. Universidad Nacional de Ucayali. Facultad de Ciencias Forestales. Pucalca, Perú.
- Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., y Filonova, L. (2002). *Developmental Pathways of Somatic Embryogenesis Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Volumen 69, número 3. Suecia.
- Atares, A. (2007). *El cultivo in vitro de plantas. Ventajas y aplicaciones*. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Azafeifa, A., Guevara, Eric., y Jiménez, V. (2008). *Uso de abonos foliares comerciales en la elaboración de medios de cultivo in vitro*. Agronomía Costarricense. Recuperado el 5/05/12: www.mag.go.cr/rev_agr/v32n02-149.pdf
- Azcón, J., y Talón, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Ediciones Mc GrawHill, Interamericana. Barcelona, España.
- Baccheta, G., Ballesteros, D., Bueno, A., y Prada, A. (2008). *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Obra social La Caixa y Gobierno del Principado de Asturias. España.
- Barba, A. (2001). *Micropropagación de plantas*. Editorial Trillas. México
- Bonga, J. (1980). Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. In: plant cell culture: results and perspectives (F. sala, B. parisi, R. cell y O. ciferrieds). Elsevier/North Holland Biomedical.Press.

- Bonga, J; Klimaszewska, K; Aderkas, P.(2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. Volume 100.Issue 3. Canada.
- Bonner, F.T., Vosso, J. A., Elam, W.W., y Land, S.B. (1994).Tree Seed Technology Training Course. Instructor's Manual. USDA, Forest Service. New Orleans, Louisiana.
- Brainerd, K., y Fuchigami, L. (1981). Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal American Society Horticultural Science*. 106 (4): 515-518.
- Cabrera, A. (2003). *Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento, en la propagación in vitro del cultivo de yemas axilares de melocotón (Prunus pérsica L.) Batsch var. Salcajá*. Universidad de San Carlos. Guatemala.
- CAR. (1990). *El manto de la tierra*. Bogotá. Ediciones Lerner.
- CAR. (1984). *Flora de los Andes*. Bogotá. Benjamín Villegas Editores.
- Carneros, E., Celestino, C., Hernández, I., López-Vela, D., y Toribio M. (2005). *La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal*. Instituto Madrileño de investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Alcalá de Henares. Madrid. España.
- Caro, M. (2004). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*. Bogotá. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia.
- Casado, M., y González, R. (2000). *Los retos de la genética en el siglo XXI: Genética y bioética*. España. Ediciones: Universidad de Barcelona.
- Castillo, Alicia. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*. Una biotecnología que nos acompaña hace tiempo. Unidad de biotecnología INIA, Las Brujas. Uruguay. Recuperado el 10/05/13: www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf
- Castillo, A. (2009). *Multiplificación in vitro de especies vegetales*. Unidad de Biotecnología. Universidad ORT. Uruguay.
- Castro, D., Jiménez, C., Ríos, D., Restrepo, A., y Giraldo. (1992). *Utilización de la técnica de cultivo de tejidos vegetales in vitro para la propagación y conservación de germoplasma de comino (Aniba perulitis), abarco (Cariniana pyriformis), almendrón (Terminalia catappa) y guayacán (Tabebuia serratifolia)*. Bogotá. Colciencias.
- Castro, D., Díaz, G., y Linero, J. (2002). Propagación clonal *in vitro* de árboles élite de teca (*Tectona grandis* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología* 4 (1): 49-53.

- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D., y Toribio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. Recuperado el 4/10/13 de: [http://www.inia.es/gcontrec/pub/CELESTINO-HERNANDEZ-CARNEROS \(y otros\) \(SRF14-3\) 1162282779875.pdf](http://www.inia.es/gcontrec/pub/CELESTINO-HERNANDEZ-CARNEROS_y_otros_(SRF14-3)_1162282779875.pdf)
- Cleland, R. E. (1995). Auxin and Cell Elongation. In: Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Davies, P.J. 2ed. New York, U.S.A.
- Collado, R., Bardón, R., Agramonte, E., Jiménez, F., Pérez, M., Gutiérrez, O., y Ramírez, D. (2004). Establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de Caoba (*Swietenia macrophylla* King). *Biotecnología Vegetal* Vol. 4, No. 3. Julio-Septiembre. Recuperado el 15/08/12: www.revista.ibp.co.cu/component/docman/doc_download/1184-v4-n3...
- Conci, C. (2004). *Obtención de plantas libres de virus*. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones INTA. Buenos Aires. Argentina.
- Corbino, G.B. (2005). *Micropropagación de plantas leñosas*. Instituto de Ingeniería Rural del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina.
- Corredoira, E., Janeiro, L., y San José, M. (2011). *Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación del Aliso (Alnus, sp) con vistas a su conservación*. Instituto de Biodiversidad y desarrollo rural (IBADER). Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Curtis, Barnes, Schnek, Massarini, Biología. Recuperado el 27/09/13: <http://www.curtisbiologia.com/p1883-1839>
- Davies, P. J. (1995). *The Plant Hormones: Their nature, occurrence and factors in plant physiology, biochemistry and molecular biology*. 2nd Edición, Kluwer Academic Publishers.
- Defelipe, G. C. (2011). *Regeneración de Cinchona pubescens mediante el cultivo de tejidos vegetales in vitro*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Del Campo, F., Alférez, S., y Hernández, L. (2007). *Módulos de cultivo in vitro*. Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Despommier, D. (2009). *A Farm on Every Flor*. The New York Times. 16 de Octubre de 2009. Recuperado el 27/09/13 de: <http://www.nytimes.com/2009/08/24/opinion/24Despommier.html>
- Díaz, T y Hernández, A. (2003). Comportamiento de la germinación de semillas de tomate tratadas con cloro. Instituto de Investigaciones Hortícolas: Liliana Dimitrova. La Habana. Cuba.
- Díaz, L; Carrizo, S; Dignonzelli, P. (2005). Uso de PPM (Plant preservative Mixture) para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación *in vitro*

de caña de azúcar. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*. Volumen22, No.1. Venezuela.

Dodds, J.H., y Roberts, L. (1982). *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press, Cambridge England, UK.

Domínguez, G. (1997). *Uña de gato (Uncaria tomentosa) y producción sostenible*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú.

Echenique, V., Rubinstein C., y Mroginski, L. (2004). *Bioteología y mejoramiento vegetal*. INTA, Argentina.

Espín, E., Medina, M., Jadán, M., y Proaño, K. (2010). Utilización de hongos micorrícicos arbusculares en plántulas de limón (*Citrus aurantifolia*) cultivadas *in vitro*: Efectos durante la fase de aclimatación. *Revista Ciencia*. Volumen 13, 1, 87-93.

Espinosa, J., González, O., Hoyos, R., Afanador, L., Correa, G. (2005). Potencial de propagación *in vitro* para el tomate de árbol partenocárpico (*Cyphomandra betacea* Cav). *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía*. Medellín. Vol. 58. No. 1.

Faccioli G. and Marani F.(1998).Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: *Plant VirusDisease Control* (A. Hadid, R.K. Khetarpal, H. Koganezawa,ed.), The American Phytopathological Society,St Paul, MN, USA, 346–380.

FAO. (1989). *Manual sobre semillas de acacias en zonas secas*. FAO. Roma.

FAO. (1991). *Guía para la manipulación de semillas forestales*. Centro de semillas forestales de DANIDA. Roma. Italia.

FAO. (2004). *Biotechnology in forestry, including: Forest Genetic Resources Working Paper FGR/59E*.Roma. Recuperate el 5/10/13: www.fao.org/docrep/008/ae574e/ae574e00.htm

Fracioli G. and Marani F. (1998).Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi A., Khetarpal R.K. and Koganezawa H. (eds). *Plant virus deasease control*. The American Phythopathology Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp 346-380.

Fuentes, S., y Chuquillanqui, C. (2003). *Las enfermedades causadas por virus y su control*. Centro Internacional de la papa. Lima. Perú.

Gamboa, M. (2006). *Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas*. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

García, F. (Domingo 8 de Abril de 2012). En aula viva se rescata el páramo de Sumapaz. *Medioambiente. UN periódico*. Bogotá. Número 154. p.7.

- García, M. (2000). Propagación clonal *in vitro* del Eucalipto Saligna. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Forestales. Ministerio de Educación Superior. Pinar del Río. Cuba.
- Garner/Simmons/Snustad. (2008). *Principios de genética*. México. Limusa Wiley.
- Genberries. (2011). Análisis viral. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Chile. Recuperado el 14/04/13: www.genberries.cl/servicios.htm
- George, E. (1996). Plant propagation by culture tissue; part 2. In practice. 2 ed. Exegetics Limited. England.
- Gold, K., León-Lobos, P., and Way, Michel. (2005). *Manual de recolección de semillas de plantas silvestres*. Ministerio de Agricultura. Chile.
- Gómez, M., y Andramunio Z. (1998). *Micropropagación masiva de Tuno Roso (Centronia mutabilis) bajo condiciones in vitro*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá.
- González, Y., Reino, J., y Machado, R. (2009). Dormancia y tratamientos pregerminativos en las semillas de *Leucaena spp*, cosechadas en suelo ácido. *Pastos y forrajes*. Volumen 32, Nº 4. Matanzas, Cuba.
- Greenwood, M.S. (1987). Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation*. Volume 6. Issue 1-2. Printed in the Netherlands.
- Griffiths, A. (2008). *Genética*. México. McGrawHill-Interamericana.
- Haggman, H., Jokela, A., Krajnakova, J., Kauppi, A., Niemi, K., and Aronen, T. (1999). Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Journal of Experimental Botany* 50:
- Hermosillo, Y., Aguirre, J., Rodríguez, R., Ortega, C., Gómez, A., y Magaña, R. (2008). Métodos inductivos para maximizar la germinación de semilla germoplasma nativo en vivero para sistemas silvo pastoriles en Nayarit, México. *Revista Zootecnia tropical*. Volumen 26 (3). México.
- Hernández, Y., y González, M. (2010). Efectos de la contaminación bacteriana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*. Volumen 31, Nº 4. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana. Cuba.
- Hodson, E., Rodríguez, C., y Chemas, A. (1998). Programación vegetativa de *Alnus Acuminata* KBK por cultivo de tejidos vegetales. Bogotá. *Rev. Facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana*. Vol. 1, Nº 2.
- Hu, C., y Wang, P. (1983). Meristem, shoot tip, and bud cultures. *Handbook of plant cell culture*. MacMillan Publishing, Nueva York. Volumen 1.

- Hurtado, O., Freire, M., Leiva, M., García, J. (2011). Influencia de las características de las plantas cultivadas *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. Ex Wendl en su aclimatización. *Biología Vegetal. El bambú en Colombia*. Volumen 11, No 3, 2011 (julio-septiembre). Cuba.
- Iglesias, I. (2004). *Desarrollo de técnicas de control sanitario e identificación varietal y su aplicación en el sistema de certificación de material vegetal de frutales*. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalim entèries. Madrid. España.
- Instituto Tecnológico Superior de Misantla. Manual de Prácticas de Técnicas de Cultivos Vegetales. Recuperado el 23/04/13: www.scribd.com/doc/17000375
- Izquierdo, M. (1999). *Ingeniería Genética y Transferencia génica*. Editorial Pirámide. Madrid. España.
- Kao, N., y Michayluk, M. (1980). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* 96: 135- 141.
- Krikorian, A. (1991). Medios de cultivo: generalidades y preparación. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, W., y Mroginski, L. (eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT, Cali pp 41-59.
- Krikorian, A. (1995). Hormones in tissue culture and micropropagation. En: *Plant hormones physiology biochemistry and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers. Dordrech, Boston, London.
- Laffitte, O., Borrero, N., Pérez, A., Peralta, N., Trujillo, R. (2004). Regeneración de brotes adventicios en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro*. *Revista Colombiana de Biología*. Volumen 6, No. 2, 2004.
- Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E., y Hohtola, A. (2000). Changes of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology*. England.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L. (2004). *Biología y mejoramiento vegetal II*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.
- Litz, R., y Jarret, R. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. En CIAT. Roca, W., y Mroginski, L. (eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Palmira, Colombia.
- Lopes, L., Zanette, F., Kulchetscki, L y Guerra, M. (2005). Micropropagación de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba rosa) a partir de segmentos nodales de material juvenil. *Revista Árvore*, 29 (4). Brasil. Recuperado el 12/05/13: www.redalyc.org/articulo.oa?id=48829403

- López, M. (1996). *Estudio de la expresión genética durante la embriogénesis somática en Saccharum officinarum y su relación con el ácido abscísico y la sequía*. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. España.
- López, R. (2009). *Micropropagación vegetal*. Armenia, Quindío. Arte Imagen.
- López, R. (2010). *Micropropagación in vitro de cultivos de Gulupa (Passiflora edulis Sims) por meristemos y yemas*. Tesis de grado. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia.
- Luteyn, J. L. (1999). *Paramos: a checklist of plant diversity, geographical distribution, and botanical literature*. Mem. New York Bot. Gard. New York, USA.
- Marquínez, J. (1998). *Aporte a la recuperación de especies vegetales en extinción por micropropagación: Raque (Vallea stipularis)*. Bogotá. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. CAR.
- Martínez, M., y Pacheco, J. (2006). *Protocolo para la propagación de Furcraea macrophylla Baker*. *Agronomía Colombiana*. Vol. 24, N° 2, julio-diciembre. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Marulanda, M. L., Gutiérrez, G., y Vallejo, A. (2000). *Selección y propagación de Nogal cafetero (Cordia alliodora), Aliso (Alnus acuminata) y Mora (Rubus glaucus) por cultivo de tejidos in vitro*. Colciencias.
- Méndez, A. (2012). *Etileno*. La guía de Química. Recuperado el 8/05/13: www.quimica.laguia2000.com/quimica-organica/etileno
- Monnier, M. (1976). *Culture in vitro de l'embryon immature de Capsella bursapastoris Moench*. *Rev. Cyt. Biol. Végét.* 39: 1-120.
- Montes, J. (2002). *Embriogénesis somática en Epidendrum ruizianum (Orchidaceae)*. Bogotá. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia.
- Morgan, W. et al. (2011). *Cultivo de tejidos vegetales*. Universidad Nacional del Noroeste. Argentina.
- Moya, M. (2010). *Análisis de semillas. Reglas ISTA. Volumen 3, Tomo IV, N° 15*. Argentina.
- Mroginski, E., Rey, H., y Mroginski, L. (2002). *Establecimiento in vitro de Explantes y Regeneración de plantas de Toona ciliata*. Recuperado el 14/04/13: www.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-003.pdf
- Mroginski, L., Sansberro, P., y Flaschland, E. (2010). *Establecimiento de cultivos Vegetales*. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argenbio. INTA. Pags: 70-84.

- Muestreo. Pasos del RT-PCR para el análisis de virus y viroides. Recuperado el 17/05/13: www.concitver.com/.../citricos%20ver%20tef/16.%20Muestreo%20y tecnicas%20en%20citricos.pdf
- Muñoz, F. (2002). Propagación de flora endémica de páramo o en peligro de extinción en el parque Nacional Natural del Cocuy. *Publicación del Parque Nacional Natural del Cocuy*. Boyacá.
- Murkute, A., y Shanti-patil, M. (2003). Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science Digest*. India.
- Nava, R., Vegas, A., Marín, C., y Villegas, Z. (2011). Propagación de plantas élite de *Carica papaya* L., usando microinjertación *in vitro* e *in vivo*. *Interciencia*. Volumen 36. Nº 7. Venezuela.
- Ocampo, F., y Núñez, V. (2007). Propagación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajaba*), mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. Ciencia y tecnología agropecuaria. *Revista ICA*. Bogotá.
- Ortega, H. (2001). *Establecimiento de yemas de valeriana (Valeriana officinalis) y Polylepis (Polylepis incana)*. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Ecuador.
- Osorio, J. (2005). Estudio para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Neoregelia sp.*, de la familia *Bromeliaceae*. Bogotá. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia.
- Paredes, I. (2009). Utilización de Giberelinas en explantes vegetales. Seminario de crecimiento y desarrollo. Universidad de América. Santiago de Chile. Recuperado el 07/05/13: www.es.scribd.com/doc/35592184/Giberelinas
- Patrignani, A; Bueno, M; Feldman, S. (2008). Micropropagación de plantas de *Spartina argentinensis* a partir de meristemas. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Número XIII. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.
- Pedrique, M. (1992). *Microbiología. Manual de métodos generales*. Segunda edición. Facultad de farmacia. Universidad Central de Venezuela.
- Pedroza, J. (2008). *Aplicaciones de cultivos de tejidos vegetales en condiciones in vitro*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá.
- Pedroza, J., y Montes, M. (2008). *Micropropagación de Hypericum goyanesii, una especie en vía de extinción*. Centro de Investigaciones y Desarrollo. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá.

- Perea, D. (1990). Biotecnología agrícola mediante la utilización de los sistemas *in vitro*. *Agricultura de las Américas*. Bogotá.
- Pérez, J., Mesén, F., Hilje, L., y Aguilar, M. (2001). Método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata*. Costa Rica. Recuperado el 24/05/13: www.orton.catie.ac.cr/repdoc/A3295E/A3295E.PDF.
- Pérez, J., y Ramos, M. (2012). *Establecimiento in vitro de Abies guatemalensis (Pinabete) a partir de embriones cigóticos*. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano. Honduras.
- Perugorría, M. (2005). *Desarrollo de una técnica para la micropropagación de especies leñosas en biorreactores*. Facultad de Ciencias. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay.
- Pierik, R. (1990). *In vitro*. Culture of higher plants. Holland. Kluwer Academic Publisher.
- Prueba de ELISA para el diagnóstico de virus en las plantas. Recuperado 12/05/13: www.es.scribd.com/doc/57714878/Prueba-de-Elisa-para-el-diagnostico-de-virus-en-las-plantas. Universidad del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Quemada, L. (2006). Ácido abscísico. Recuperado 20/04/13: www.unioviado.es/bos/Asignaturas/Fvca/Apuntes/Tema28.doc
- Rache, Y., y Pacheco, C. (2010). Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionales (Ericaceae)*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de BIOPLASMA, Tunja, Boyacá, Colombia. Publicada en Acta Botánica Brasilica, volumen 24, no. 4. Feira de Santana. Oct/Dec.
- Ramírez, N., Camacho, A., y González, M. (2004). *Guía para la propagación de especies leñosas nativas de los altos y montañas del norte de Chiapas*. Colegio de la Frontera Sur. Editorial Fray Bartolomé. México.
- Revista Corpoica. (2007). Ciencia y Tecnología Agropecuaria. Tibaitatá. Mosquera.
- Robles, L., González, A., Langarica, M., Moreno, L., y López, J. (2010). Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. *Tecnociencia Chihuahua*. Volumen 4, N° 2.
- Roca, W., y Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Colombia. CIAT. Palmira. Valle.
- Rodríguez, D. (2012). *Capacidad de enraizamiento en estacas de setos provenientes de tres poblaciones de Pinus patula*. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana. México.

- Rodríguez, A., y Carvajal, A. (2009). *Cultivo de Tejidos*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá, D.C. Colombia.
- Roque, A., y Ardisana, E. (2006). Obtención de posturas de papaya (*Carioca papaya* L) cv. Maradol roja, por cultivo *in vitro* de segmentos nodales de plantas jóvenes. Universidad Agraria de La Habana, Facultad de Ciencias Agrícolas, Departamento de Biología. Las Tunas. Cuba. Recuperado el 30/04/13 de: www.forumcyt.cu/UserFiles/forum/Textos/1050511.pdf
- Rosenberg, G. (2005). Etapa de preaclimatación de plantas de vid (*Vitis vinífera*) y cerezo (*Prunus cerasus*). Laboratorio de propagación de la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Chile. Recuperado el 14/05/13 de: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r73859.PDF>
- Rossi, L. (2003). Cultivo *in vitro*. Fotosíntesis reseña histórica. Microsoft PowerPoint. Recuperado el 26/05/13 de: www.upch.edu.pe/facien/fc/dcbf/bioaplicada/CULTIVO%20IN%20VITRO.ppt
- Salazar, M. (2008). Cultivo *in vitro*. Recuperado el 25/05/13: www.mrsalazar.blogspot.com
- Salazar, R. (2010). Historia del cultivo de tejidos vegetales. Recuperado el 27/09/13 de: CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES ROBINSON SALAZAR DÍAZ. www.calameo.com/subscriptions/632868
- Salisbury, F., y Ross, C. (1994). *Fisiología vegetal*. Cuarta edición. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. México. D.F.
- Sánchez, O. (2000). *Micropropagación de algunas leñosas nativas*. Editorial Trama. Universidad de Concepción, Chile.
- Sánchez, C; Vieitez, A; Ballester, A. (2000). Anatomical, biochemical and molecular markers of root differentiation in juvenile and adult chestnut and oak shoots cultured in vitro. In: Abstracts of the Meeting of the COST Action 843; Developmental Biology of Regeneration. Geisnheim. 40-41. Kansas, City. USA.
- Sánchez, L., Rozo, G., y Montiel, J. (2012). *Cultivo in vitro de Gyrocarpus americanus (Hernandiaceae)*. Universidad del Tolima. Ibagué.
- Schuler I., Baquero, S., Gaona, D., Vega, E., Rodríguez, J., Ramírez, C., Nieto, V., y Hodson, E. (2005). Propagación *in vitro* de material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Nogal cafetero). *Revista Colombiana de Biotecnología*. Volumen VII, Julio. Número 001. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Street, H. (1977b). Cell (suspension) cultures-techniques. En Street, H. (ed.). *Plant tissue and cell culture*. University of California Press, Berkeley, California, E.U.

- Suárez, F. (2011). *Micropropagación in vitro de piña (Ananas comosus L. Merrill) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales*. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
- Suárez, I., Jarma, A., y Ávila, M. (2006). *Desarrollo de un protocolo para la propagación in vitro de roble (Tabebuia rosea Bertol DC)*. Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural. Montería. Córdoba.
- Tacaronte, M., Vielma, M., Mora, A., y Valecillos, C. (2004). Propagación *in vitro* de Caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares. *Acta Científica Venezolana*. Volumen 55, N°1. Caracas.
- Tang, W., and Newton, R. (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*. USA.
- Tapia, M. (2010). *Evaluación de métodos de micropropagación vegetativa de arándanos (Vaccinium corymbosum) in vitro*. Universidad de Talca. Chile.
- Thorpe, A., Harry, I., y Kumar, P. (1991). Application of micropropagation to forestry. In: P.C. Deberghy, R.H. Zimmerman (eds). *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers (Netherlands): pp. 311-33.
- Tobar, C. (2011). Totipotencialidad. Recuperado el 24/09/13, de <http://www.buenastareas.com/ensayos/Totipotencialidad/1499061.html>.
- Universidad Católica. (2006). *Metodología de micropropagación de Segmentos nodales de Cedro (Cedrela odorata L.) y Caoba (Swietenia humilis), obtenidos a partir de semilla seleccionada, establecidos bajo condiciones de laboratorio*. Laboratorio de Cultivos Vegetales. República de El Salvador.
- Vadillo, G., Suni, M., y Cano, A. (2004). Viabilidad y germinación de semillas de *Puya raimondii* Harms. (*Bromeliaceae*). *Revista peruana de biología*. Volumen 11, N°1. Lima. Perú.
- Valderrama, S., y Verhelst, J. (2007). *Avifauna asociada a bosques de Polylepis en Colombia*. Proyecto *Polylepis* de American Bird Conservancy y Fundación ProAves. Bogotá, Colombia.
- Vargas, O. (2007) *Guía metodológica para la restauración ecológica del bosque altoandino*. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Vasil, I., and Vasil, V. (1980). Clonal propagation. In: *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*. *Int. Rev. Cytol. Supp.* 11A. Ed: I. K. Vasil. pp. 143-173.

- Villalobos, A., Leung, D.W., y Thorpe, A. (1984). Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. Universidad Católica de Occidente. República de El Salvador.
- Villalobos, M., y Thorpe, A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp127-141.
- Villamizar, E. (2005). *Estandarización del protocolo in vitro para el establecimiento de Encenillo (Weinmannia tomentosa) y de Rodamonte (Escallonia myrtilloides) en el laboratorio de cultivos de tejidos del Jardín Botánico José Celestino Mutis de Bogotá*. Universidad Francisco de Paula Santander. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. Cúcuta. Norte de Santander.
- Walasek, Diego. (2012). Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*). *Revista Agrociencia Uruguay*. Volumen 16, N°1. Montevideo. Junio.
- Walpole R., y Myers, R. (2000). *Probabilidad y Estadística*. Editorial McGraw-Hill. México.
- Xu, Z., y Sunderland, N. (1982). Inoculation density in the culture of barley anthers. *Scientia Sinica (ser. B)* 25: 961-969.
- Yaya, L; Rodríguez, O; Usaquén, W; Chaparro, A. (2005). Inducción de organogénesis indirecta de Abarco (*Cariniana pyriformis* Miers.). *Revista Agronomía Colombiana*. Volumen 23, N° 1. Bogotá, Enero/Julio.
- Zárate R., Aparicio A., Cantos M., y Troncoso, A. (1997). *Regeneración de plantas mediante organogénesis adventicia*. Facultad de Farmacia. Sevilla. España

ANEXOS

ANEXO 1

COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO MURASHIGE Y SKOOG

COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO MURASHIGE Y SKOOG

Constituyente	Concentración de la Solución madre (g/L)	Volumen de la solución madre por litro de medio
Macros		100 ml
NH ₄ NO ₃	16,5	
KNO ₃	19	
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4	
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7	
KH ₂ PO ₄	1,7	
Micros		10 ml
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86	
H ₃ BO ₃	0,62	
KI	0,083	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025	
CuSO ₄ .5H ₂ O 10 ml de solución 25 mg/100 ml		
CoCl ₂ .6H ₂ O 10 ml de solución 25 mg/100 ml		
Fuente de hierro		10 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,00556	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,00746	
Vitaminas		10 ml
Inosol	10	
Nicotínico	0,05	
HCl-Piridoxina	0,05	
Glicina	0,2	
HCl-Tiamina	0,01	

Agregar al medio 3% de sacarosa y 0.7% de agar

Tomado de: www.wikipedia.org/.../Murashige_and_Skoog_medium

OTRAS FORMULACIONES

Nutriente mM	MS (1962)	WPM (1981)	White (1963)
NH ₄ ⁺	20.61	4.94	--
K ⁺	20.04	12.61	1.67
Ca ⁺⁺	2.99	3.00	1.27
Mg ⁺⁺	1.50	1.50	2.92
SO ₄ ⁻²	1.76	7.44	5.81
PO ₄ ⁻²	1.25	1.25	0.144
NO ₃ ⁻	39.40	9.64	3.33
Total mM	60.01	14.58	3.33
Total mM	94.25	42.39	19.04

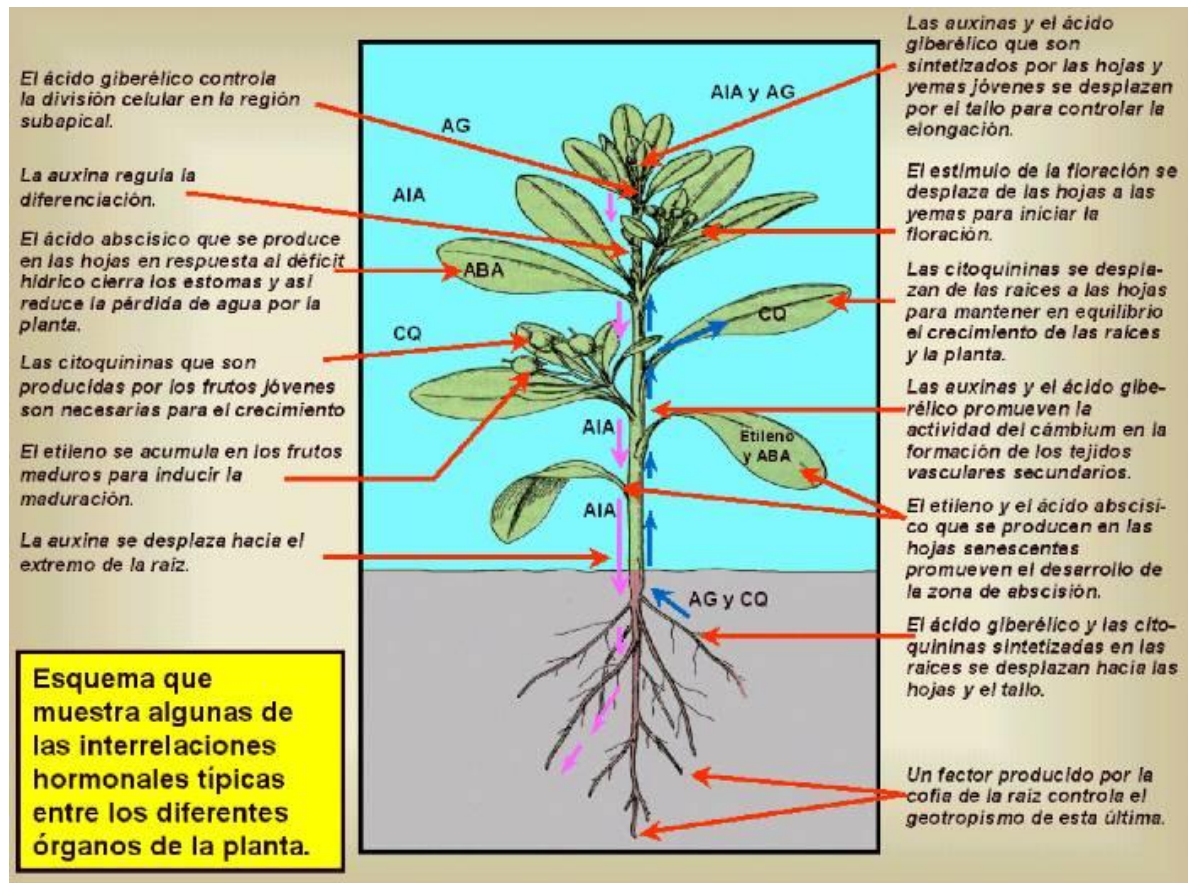
MS: Morashige y Skoog; **WPM:** Medio de cultivo para plantas leñosas.

Tomado de: www.fagro.edu.uy/.../matoricos/Medios%20de%20cultivo.pdf

ANEXO 2

INTERACCIÓN DE LAS HORMONAS EN LA PLANTA

INTERACCIÓN DE LAS HORMONAS EN LA PLANTA

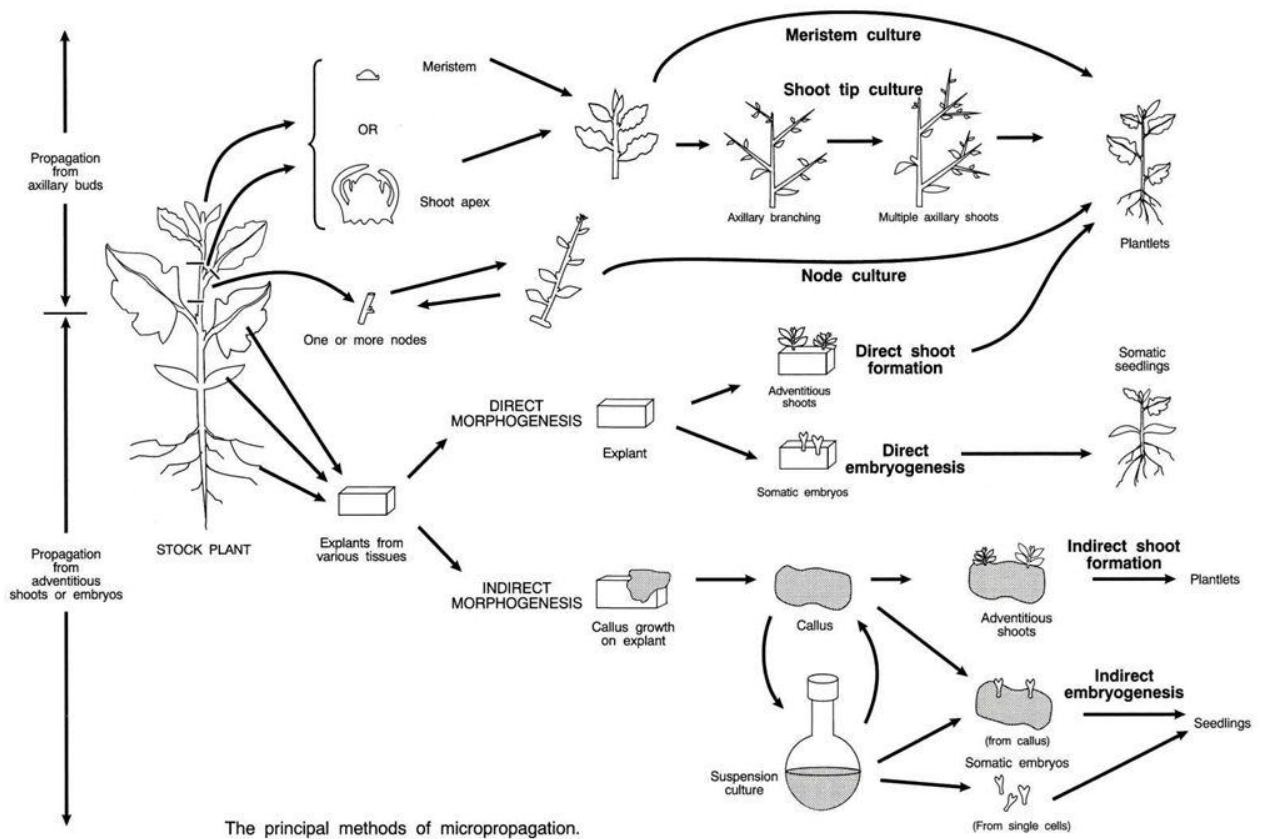


Tomado de: www.euita.upv.es

ANEXO 3

PRINCIPALES MÉTODOS DE MICROPROPAGACIÓN

PRINCIPALES MÉTODOS DE MICROPROPAGACIÓN



Tomado de: www.agrosalmir.blogspot.com